

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659519

研究課題名(和文) 表皮特異的転写因子からのアプローチによる誘導性表皮幹細胞(iES細胞)の樹立

研究課題名(英文) Induction of keratinocyte stem cell based on epidermal transcription factors

研究代表者

石井 良征(Ishii, Yoshiyuki)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：90455931

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞を誘導するために使われる4種類の遺伝子が全て転写因子であることからわかるように、転写因子は幹細胞を未分化状態に保つのに必須の役割を果たしている。本研究では、転写因子PTTG1が、表皮角化細胞の幹細胞としての未分化な形質を保つ上で重要な役割を果たしていることを見出した。すなわち、PTTG1遺伝子を導入し、恒常的にPTTG1を強発現する表皮角化細胞を用いて、3次元培養を行ったところ、構成された表皮組織は肥厚し、個々の角化細胞の増殖能は亢進していた。さらに、表皮組織における分化マーカーの発現は減弱し、未分化マーカーの発現が亢進していた。

研究成果の概要(英文)：PTTG1 is the transcription factor involved in the control of cell growth, differentiation, and apoptosis. The present study was performed to examine the role of PTTG1 in proliferation and differentiation of keratinocytes with formation of a stratified epidermoid structure in air-liquid interface 3-dimensional culture. PTTG1 was expressed specifically in undifferentiated normal keratinocytes and downregulated during differentiation. The constitutive overexpression of PTTG1 in keratinocytes during air exposure-induced differentiation resulted in an undifferentiated phenotype, i.e., thickening of the stratified layers, suppression of differentiation marker expression, and retention of proliferative activity with activation of cell cycle regulatory proteins in the S and G2/M phases. These findings suggested that PTTG1 may play an important role in maintenance of the undifferentiated phenotype of keratinocytes.

研究分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：角化細胞 転写因子 分化

1. 研究開始当初の背景

生体組織は、その機能や恒常性を維持するために、常に未熟な幹細胞から分化し、機能的にコミットした成熟細胞となり、やがて役割を終えて脱落するというターンオーバーを繰り返している。表皮は、生体の最外層にあって外界から生体内を保護するバリア機能を担う重要な臓器であるが、表皮もこのようなターンオーバーにより恒常性を保っている代表的な臓器である。表皮は主として角化細胞(ケラチノサイト)から構成され、最も下層の未分化な基底細胞から、上層の有棘細胞、顆粒細胞へ分化し、最終的に強力なバリア機能を形成する角層細胞に分化し、やがて外界へ脱落してゆく。すなわち、表皮の角化とは、機能層である角層を形成するためのケラチノサイトの分化過程そのものである。表皮の角化過程の理解は、幹細胞システムや細胞の分化・増殖・癌化などの現代医学生物学のメインテーマの理解に直接つながるものであり、表皮角化に関する研究は、細胞・組織分化・増殖のモデルとして皮膚科学のみならず医学生物学全体に貢献し、高いインパクトを与えうる研究である。

2. 研究の目的

これまで表皮ケラチノサイトの分化を分子生物学的に研究し、特に転写因子がケラチノサイトの幹細胞性をどのように維持しているか、さらには、転写因子がケラチノサイト分化をどのように制御しているかを解析してきた。この研究過程で、最近 cDNA クローニングされた転写因子で、ケラチノサイトでその発現が未知であり、Ca 依存性に発現がダイナミックに変化する転写因子で、且つ一般的にも機能が未確定の分子を探索した。その結果、いくつかの新規転写因子がスクリーニングされてきたが、その中でも PTTG1 は、培養正常ケラチノサイトにおいて、Ca switch による分化誘導の前後で 20 倍という劇的な発現増強が得られた。また、プレリミナリーな正常表皮の免疫組織学的染色では、PTTG1 は基底層には発現がほとんどなく、有棘層以上、特に顆粒層と角層の最終分化細胞で強い発現が検出された。さらに、最近の海外の研究により、PTTG1 は幹細胞誘導に深く関わっていることが示唆されており、ケラチノサイトでも従来知られている機序とは全く異なる分子機構でケラチノサイトの幹細胞性・細胞分化を制御していることが予想される。本研究では、このケラチノサイト分化特異的な発現を示す PTTG1 が、ケラチノサイトの発生・分化・増殖をどのように制御しているかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト線維芽細胞を、タイプ I コラーゲンゼル(Cellmatrix 1A、新田ゼラチン)に混入し、6well プレート(3mL/well)に注ぎ、37

で 30 分インキュベートした。その後、HaCaT 細胞をゲル上に均一に撒き、一晚おいた。使用する培地は、MCBD153 と DMEM を 1:1 で混合した上で、抗生物質や 10%FBS、10ng/mL EGF などを混合し作製した。翌日、培養ゲルを滅菌された注射針でプレートから分離させ、ゲルが適当な大きさに収縮するまで、2 日に 1 回の培地交換を 1 週間から 2 週間続けた。その後、セル・ストレイナーを逆にセットし、収縮したゲルをメッシュ上に置いた。培地はゲルの下端に触れる程度で、表面は空気に触れる状態とした。細胞は、3D 培養に使用した HaCaT 細胞に PTTG1 を形質導入し、PTTG1 蛋白が過発現したものを使用した。行った実験は、結果で得られた表皮肥厚の程度を実測で評価し、ウエスタン・ブロッティング法や免疫組織染色を用い、分化マーカーの発現状況を調べた。また、細胞分裂能の変化を評価するために、MTT 法、セルカウント法、BrdU 取り込み法を用いた。

4. 研究成果

(1) 図 1 に示したように、上列のコントロールは時間経過とともに、層状構造を構築し、表皮構造に擬態している状態を示した。4-7 日では 3 層程度であったものの、徐々に肥厚し 14 日目では 7-8 層となった。分化過程を経るにつれ、基底細胞層は立方的な形態を示し、表層の細胞はより扁平な形状となり、角化を示した。他方、PTTG1 を過発現している HaCaT 細胞の 3D 培養組織は、著しく増殖し、表皮肥厚を示しました(図 1 下列)。実測では、コントロールと比較して約 3 倍以上の表皮肥厚を示しました。

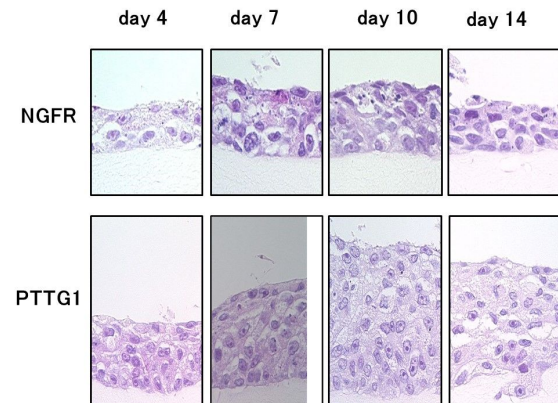


図 1: コントロールと PTTG1 過発現 HaCaT 細胞の 3D 培養組織による比較

(2) 表皮ケラチノサイトの分化における PTTG1 の影響を評価するために、免疫プロット法を利用して、分化マーカーの評価を行った。未分化な表皮ケラチノサイトで発現するマーカーである K5、分化の初期段階で発現する K1、K10 を抗体として使用しました。図 2 で示すように、分化段階で発現するマーカー遺伝子である K1 と K10 は、コントロールと比較して PTTG1 が過発現している HaCaT 細胞

で著しく減少した。

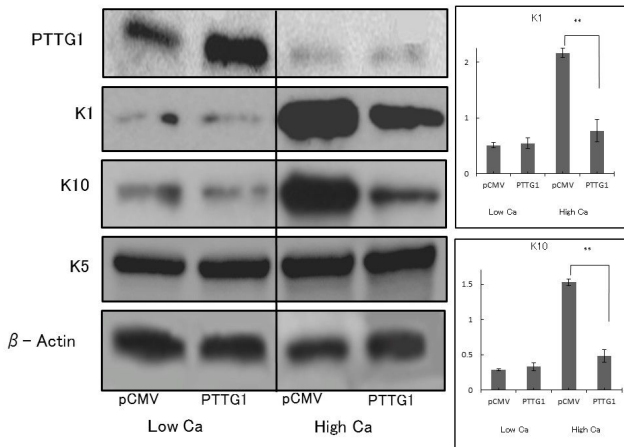


図 2: PTTG1 過発現が HaCaT 細胞の分化マーカー遺伝子に与えるの影響

(3)各層での表皮ケラチノサイトの分化状況を評価するために、免疫組織染色を利用して、分化マーカーの評価を行った。使用した分化マーカーは図 2 と同じ K1, K10、K14 を抗体として使用した。K14 は両者とも染色されていたが、PTTG1 を過発現した細胞がほぼ全層で染色されていたのに対し、コントロールでは基底層付近で強く染まっていた。コントロールでは K10、K1 が表皮上層のそれぞれ本来発現する層で染まっていた(図 3 上列)のに対し、PTTG1 を過発現した細胞ではごく弱くしか染色されなかった(図 3 下列)。

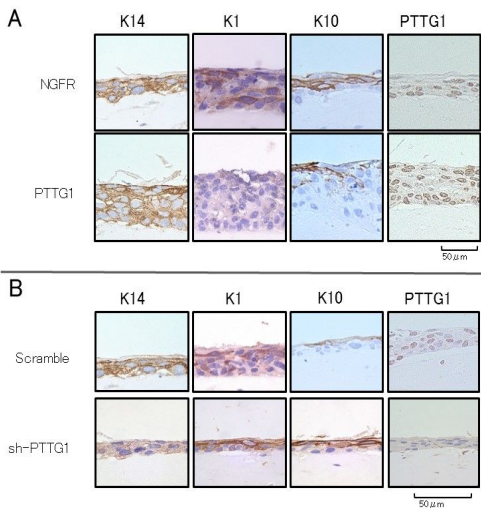


図 3:3D 培養を用いた PTTG1 が各層の分化に与える影響を免疫組織染色にて評価

(4)表皮の著明な肥厚は、細胞増殖能の増加を示唆する。そこで PTTG1 による細胞増殖への影響を調べるために、単層の HaCaT 細胞による BrdU 取り込み分析とセルカウント法を行った。図 4 上段で示すように PTTG1 を過発現させた HaCaT 細胞は、コントロールと比較して、10倍以上高いBrdU取り込みを示した。

また、4 日目の 3D 培養組織を細胞増殖のマーカーである Ki-67 で染色し、コントロールは基底層付近で染色したのに対し、PTTG1 では全層で細胞増殖が亢進していた(図 4 下段)。これらの結果により、PTTG1 が分化過程の初期に表皮ケラチノサイト増殖を促進していることが明らかとなった。

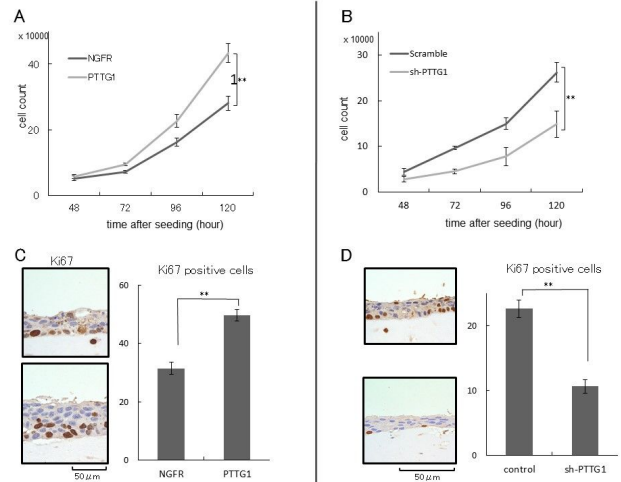


図 4:セルカウントによる PTTG1 が HaCaT 細胞の増殖能に与える影響と細胞増殖マーカー Ki-67 による組織染色

(5) 細胞増殖や細胞周期に関するセルシグナル関係のタンパク質発現量をウエスタン・ブロッティングにて評価した。図 5 に示すように、コントロールと比較すると、PTTG1 を過発現している HaCaT 細胞は細胞周期の進行が阻害され、細胞分裂の G2/M 期の促進因子であるサイクリン B1、CDK1、c-Myc の発現が増加していた。以上より、PTTG1 により細胞分裂と増殖が起こりやすい状態にあることが明らかとなった。

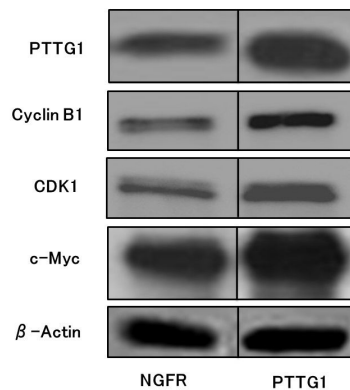


図 5: 細胞周期・分裂能に対する PTTG1 の影響の評価

以上の結果より、PTTG1 が表皮ケラチノサイトを幹細胞に特徴的な未分化な状態に維持するために重要な役割を果たしていること

が明らかとなった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 25 件)

1: Maruyama H, Fujisawa Y, Nakamura Y, Kawachi Y, Otsuka F. Penile preservation surgery in a case of erythroplasia of Queyrat involving the glans penis and distal urethra. *Int J Dermatol.* 2014;53(3):e177-80. doi: 10.1111/ijd.12103. (査読有)

2: Fujisawa Y, Nakamura Y, Kawachi Y, Otsuka F. Docetaxel was effective in the management of metastatic angiosarcoma associated with disseminated intravascular coagulation syndrome. *Int J Dermatol.* 2014; 53(2): e138-40. doi: 10.1111/j.1365-4632.2012.05671.x. (査読有)

3: Fujisawa Y, Nakamura Y, Kawachi Y, Otsuka F. Comparison between taxane- based chemotherapy with conventional surgery-based therapy for cutaneous angiosarcoma: a single-center experience. *J Dermatolog Treat.* 2014; 25(5): 419-23. doi: 10.3109/ 09546634.2012.754839. (査読有)

4: Taguchi S, Kawachi Y, Fujisawa Y, Nakamura Y, Furuta J, Otsuka F. Psoriasisiform eruption associated with graft-versus-host disease. *Cutis.* 2013; 92(3):151-3. doi: 10.1684/2011.1536. (査読有)

5: Nakamura Y, Nakamura Y, Saito A, Fujisawa Y, Kawachi Y, Otsuka F. High-grade mucopidermoid carcinoma of the columella successfully reconstructed using bilateral nasolabial flaps set up in a sandwich shape and an auricular cartilage graft after surgical resection. *J Dermatol.* 2013; 40(11): 911-4. doi: 10.1111/1346-8138.12274. (査読有)

6: Nakamura Y, Kawachi Y, Nakamura Y, Iino Y, Fujisawa Y, Otsuka F. Linear lupus erythematosus profundus involving the muscle with an intractable deep ulcer, successfully treated with surgical excision. *Eur J Dermatol.* 2013;23(4):535-6. doi: 10.1684/ejd.2013.2068. (査読有)

7: Kawachi Y, Obara S, Nakamura Y, Fujisawa Y, Nakamura Y, Ishii Y, Ichikawa E, Otsuka F. Ischemic leg ulcer due to vasculopathy associated with neurofibromatosis type 1. *Eur J Dermatol.* 2013;23(4):522-3. doi:10.1684/ejd.2013.2064(査読有)

8: Ishitsuka Y, Kawachi Y, Maruyama H, Taguchi S, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Ishii Y,

Otsuka F. Pituitary tumor transforming gene 1 induces tumor necrosis factor- α production from keratinocytes: implication for involvement in the pathophysiology of psoriasis. *J Invest Dermatol.* 2013;133(11):2566-75. doi:10.1038/jid.2013.189. (査読有)

9: Nakamura Y, Fujisawa Y, Nakamura Y, Maruyama H, Furuta J, Kawachi Y, Otsuka F. Improvement of the sentinel lymph node detection rate of cervical sentinel lymph node biopsy using real-time fluorescence navigation with indocyanine green in head and neck skin cancer. *J Dermatol.* 2013;40(6):453-7. doi: 10.1111/ 1346-8138.12158. (査読有)

10: Kawachi Y, Maruyama H, Ishitsuka Y, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Ichikawa E, Furumura M, Otsuka F. NF1 gene silencing induces upregulation of vascular endothelial growth factor expression in both Schwann and non-Schwann cells. *Exp Dermatol.* 2013; 22(4): 262-5. doi: 10.1111/exd.12115. (査読有)

11: Kawashima H, Kawachi Y, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Ishii Y, Ichikawa E, Otsuka F. Circumscribed palmar hypokeratosis: implication of suppression of early epidermal differentiation. *Eur J Dermatol.* 2013; 23(2): 261-2. doi:10.1684/ejd.2013.1963. (査読有)

12: Ishitsuka Y, Kawachi Y, Taguchi S, Maruyama H, Nakamura Y, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Ishii Y, Otsuka F. Pituitary tumor-transforming gene 1 as a proliferation marker lacking prognostic value in cutaneous squamous cell carcinoma. *Exp Dermatol.* 2013; 22(5):318-22. doi: 10.1111/exd.12118. (査読有)

13: Nakamura Y, Iino Y, Nakamura Y, Fujisawa Y, Kawachi Y, Otsuka F. Intraneural granular cell tumor of the dorsal ramus of a thoracic nerve. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2013; 79(2): 258-60. doi: 10.4103/0378-6323.107659. (査読有)

14: Kawachi Y, Ishitsuka Y, Maruyama H, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Ishii Y, Ichikawa E, Otsuka F. The POU domain transcription factors Oct-6 and Oct-11 negatively regulate loricrin gene expression in keratinocytes: association with AP-1 and Sp1/Sp3. *Arch Dermatol Res.* 2013;305(5):371-8. doi:10.1007/s00403-013-1317-x. (査読有)

15: Fujisawa Y, Miyazono Y, Kawachi Y, Otsuka F. A case of sterile transient neonatal pustulosis presenting with large flaccid pustules. *Pediatr Dermatol.* 2013; 30(6): e238-9. doi: 10.1111/pde.12063. (査読有)

16: Kawachi Y, Ishitsuka Y, Maruyama H, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Otsuka F. GATA-3 regulates differentiation-specific loricrin gene expression in keratinocytes. *Exp Dermatol*. 2012; 21(11): 859-64. doi: 10.1111/exd.12023. (査読有)

17: Nakamura Y, Nakamura Y, Fujisawa Y, Obara S, Furuta J, Kawachi Y, Otsuka F. Multiple inguinal and pelvic lymph node metastases of malignant melanoma of the heel identified by common iliac lymphadenopathy. *Lymphat Res Biol*. 2012; 10(3): 118-21. doi: 10.1089/lrb.2012.0006. (査読有)

18: Nakamura Y, Fujisawa Y, Ishikawa M, Nakamura Y, Ishitsuka Y, Maruyama H, Furuta J, Kawachi Y, Otsuka F. Usefulness of sentinel lymph node biopsy for extramammary Paget disease. *Br J Dermatol*. 2012;167(4):954-6. doi: 10.1111/j.1365-2133.2012.11017.x. (査読有)

19: Ishitsuka Y, Kawachi Y, Taguchi S, Maruyama H, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Otsuka F. Pituitary tumor-transforming gene 1 enhances proliferation and suppresses early differentiation of keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2012; 132(7): 1775-84. doi: 10.1038/jid.2012.74. (査読有)

20: Kawachi Y, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Ishii Y, Otsuka F. Pruritic poikilodermatous eruption associated with dermatomyositis: successful treatment with dapsone. *Eur J Dermatol*. 2012; 22(2): 289-90. doi: 10.1684/ejd.2012.1669. (査読有)

21: Nakamura Y, Satomi K, Noguchi M, Shibata-Ito M, Fujisawa Y, Kawachi Y, Otsuka F. Incidental gastric signet-ring cell carcinoma metastasis to the skin in basal cell carcinoma. *Acta Derm Venereol*. 2012; 92(6): 635-6. doi: 10.2340/00015555-1295. (査読有)

22: Nakamura Y, Shibata-Ito M, Nakamura Y, Ishitsuka Y, Fujisawa Y, Kawachi Y, Otsuka F. Malignant blue nevus arising in a giant congenital cellular blue nevus in an infant. *Pediatr Dermatol*. 2012; 29(5): 651-5. doi: 10.1111/j.1525-1470.2011.01662.x. (査読有)

23: Fujisawa Y, Nakamura Y, Kawachi Y, Otsuka F. Indocyanine green fluorescence-navigated sentinel node biopsy showed higher sensitivity than the radioisotope or blue dye method, which may help to reduce false-negative cases in skin cancer. *J Surg Oncol*. 2012; 106(1): 41-5. doi: 10.1002/jso.23045. (査読有)

24: Kawachi Y, Furuta J, Fujisawa Y, Nakamura

Y, Ishii Y, Otsuka F. Indolent subcutaneous panniculitis-like T cell lymphoma in a 1-year-old child. *Pediatr Dermatol*. 2012; 29(3): 374-7. doi: 10.1111/j.1525-1470.2011.01658.x. (査読有)

25: Nakamura Y, Nakamura Y, Ishitsuka Y, Maruyama H, Fujisawa Y, Kawachi Y, Otsuka F. Facial nerve morbidity following facial nerve preservation surgery for the treatment of skin cancer of the head and neck. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012; 26(10): 1323-5. doi: 10.1111/j.1468-3083.2011.04322.x. (査読有)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石井 良征 (ISHII YOSHIYUKI)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号：90455931

(2)研究分担者

川内 康弘 (KAWACHI YASUHIRO)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：00272196