

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461678

研究課題名(和文) 選択的遺伝子欠損マウスを用いた表皮ヘムオキシゲナーゼ1の機能解析

研究課題名(英文) Function analysis of epidermal heme oxygenase-1 in selective knockout mice.

研究代表者

水芦 政人 (Mizuashi, Masato)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：20400369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はheme oxygenase-1 (HO-1)の表皮細胞での役割を明らかにすることを目指し研究を進めてきた。同時に、鉄輸送膜タンパクであるferroportinの発現を検討した結果、ferroportinがHO-1と同様に表皮細胞の分化に伴い発現が誘導されることを見いだした。それぞれの表皮特異的遺伝子欠損マウスを作成すると、前者のマウスでは定常状態において皮膚での炎症が惹起されるだけでなく体重減少がみられ、後者のマウスでは貧血が徐々に進行し、両者が全身状態に影響することが分かった。今後は2つの分子が表皮においてどのように協調して機能を果たしているのが検証していきたい。

研究成果の概要(英文)：We have been studying the role of heme oxygenase-1 (HO-1) in the epidermis. At the same time, we investigated the expression of ferroportin (Fpn), an iron transport membrane protein, in the murine epidermis and discovered that Fpn expression was induced as epithelial cells (EC) differentiate, which was correlated with HO-1 expression. To further investigate the role of both molecules in the epidermis, we created EC-specific HO-1-deficient mice and EC-specific Fpn-deficient mice. In the EC-specific HO-1-deficient mice, we found that the mice developed not only skin inflammation in the steady state but also weight loss. In the EC-specific Fpn-deficient mice gradually suffered from anemia. These results indicated that these two molecules affected the whole body condition as well as the epidermis. Further examination on the molecular basis of cooperation between these two molecules will provide the mechanism by which the skin metabolism affects the whole body metabolism.

研究分野：皮膚科学

キーワード：heme oxygenase-1 ferroportin 表皮細胞

1. 研究開始当初の背景

Heme oxygenase-1 (HO-1)は、図1に示すとおり細胞内に多量存在する heme 含有タンパク質 (hemoprotein) から酸化など様々な機序で遊離された free heme を Fe²⁺、一酸化炭素(CO)、biliverdin に分解する酵素である。HO-1 とその産物の機能は極めて多岐にわたる。代表的なものに)鉄分子のリサイクリング、) free heme の Fenton 反応を介する活性酸素(ROS)産生の回避、)シグナル伝達物質の一種である CO 介する様々な生物学的作用、) biliverdin とその代謝産物である bilirubin による抗酸化作用、) 抗炎症作用があげられる (Alam J, et al. Am J Resp Cell Mol Biol 2007)。また、HO-1 は、reactive oxygen species (ROS)、重金属、紫外線刺激など種々のストレスに応じて転写制御されている。HO-1 遺伝子欠損マウスにおいて、種々の臓器に慢性炎症が生じることから、HO-1 が炎症反応制御に何らかの役割を果たしていることは良く知られているが(Yachie A, et al. J Clin Invest 1998;Poss KD, PNAS 1997)、表皮における HO-1 の炎症反応制御における役割は不明であった。

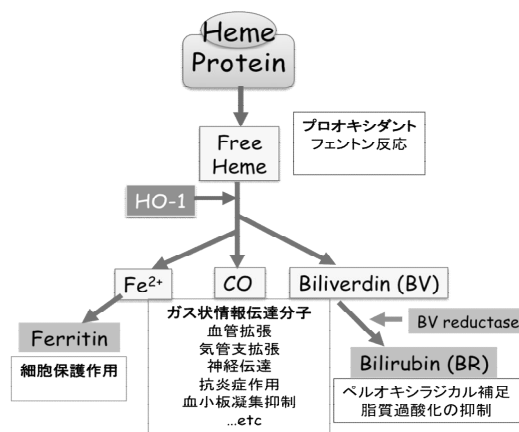


図1. HO-1の機能

我々もこの HO-1 分子に着目しこれまでに、ヒトとマウス(Numata I, et al. J Invest Dermatol, 2009, Okada S, et al. J Biol Chem 2010)のいずれにおいても表皮細胞がその分化に伴い HO-1 を発現することをみいだした。一般に、HO-1 がストレス刺激により発現が誘導される際には、Nrf2 という転写因子が関与することがよく知られているが、私たちがみいだした表皮細胞の分化にともなう HO-1 誘導には Nrf2 は関与していなかった。すなわち、表皮細胞においては、ストレス Nrf2 依存性の HO-1 誘導系と表皮細胞分化依存性/非 Nrf2 依存性の生理的 HO-1 誘導系が存在する(図2)。そこで、このストレス刺激とは無関係な生理的 HO-1 発現が、表皮細胞の増殖、分化、ホメオスタシス維持にどのような役割を果た

しているかを明らかにすることは、単に HO-1 の表皮における機能を明らかにするのみではなく、表皮細胞の新たな機能を見いだす可能性があり、同時に同様の挙動を示す分子を探索することで未知の表皮生理機能が明らかになると考えた。

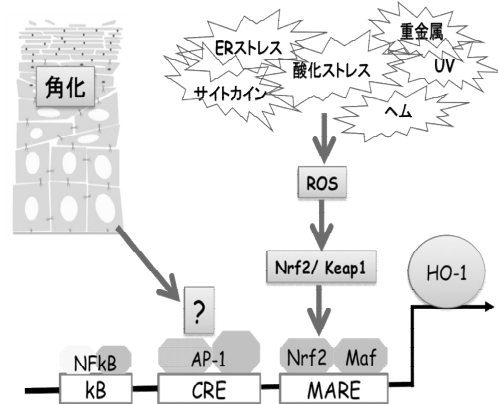


図2. HO-1の転写誘導

2. 研究の目的

最近、私たちは、Heme の代謝、抗酸化、ストレス応答など多彩な機能を有する hemoxygenase-1 が、表皮においては、以前からよく知られていたストレス Nrf2 依存性の誘導系以外に表皮細胞分化依存性/非 Nrf2 依存性の生理的誘導系が存在することを明らかにした。そこで、これまで知られていなかった表皮における生理的 HO-1 発現の表皮細胞の増殖、分化、ホメオスタシス維持における役割、また、炎症性皮膚疾患の際に様々な刺激により誘導される表皮 HO-1 の機能を明らかにする目的で、遺伝子工学的技術を用いることで表皮のみで HO-1 遺伝子を欠損させたマウスを作成する。さらに本研究では、このマウスを用いて、生理的ならびにストレス刺激により誘導される表皮 HO-1 の表皮の増殖分化および炎症性皮膚疾患制御における機能を明らかにすると同時に HO-1 の変化に関連する分子の探索も行う。

3. 研究の方法

(1)ケラチン 5 promotor を用いた HO-1 conditional knockout mouse の作成

第2イントロンと最終エクソンの下流に loxP サイトが挿入された HO-1 遺伝子をホモで有するマウス(HO-1 hR/hR)(Mamiya T et al. Tohoku J Exp Med 2008;216:331-339)と阪大・竹田潤二教授より供与されたケラチン5のプロモーターにより Cre recombinase を発現するマウス(K5-Cre)を交配することにより keratin 5 promotor を用いた表皮特異的 HO-1

ノックアウトマウス(HO-1 hR/hR::K5-Cre)を作成する。

(2)角化に伴い表皮で生理的に発現する HO-1 の機能解析

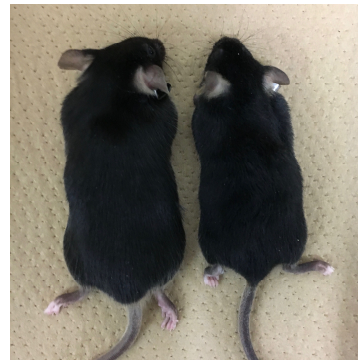
HO-1が欠損した表皮においては、表皮上層でのfree hemeの代謝の遅延が想定される。free hemeはFenton反応によりhydroxy radical を産生する(McNally SJ, et al. Int J Mol Med 2007)。従って、HO-1欠損マウスにおいては、表皮上層においてDNAの酸化や脂質の過酸化が亢進している可能性が考えられる。そこで、表皮上層、角層のDNAの酸化や脂質の過酸化状態をHO-1 CKOマウスとHO-1 +/+マウスで比較し、HO-1の酸化ストレス制御における関与を明らかにする。

(3)ストレス刺激依存性に発現する表皮 HO-1 の炎症性皮膚疾患病態形成における役割

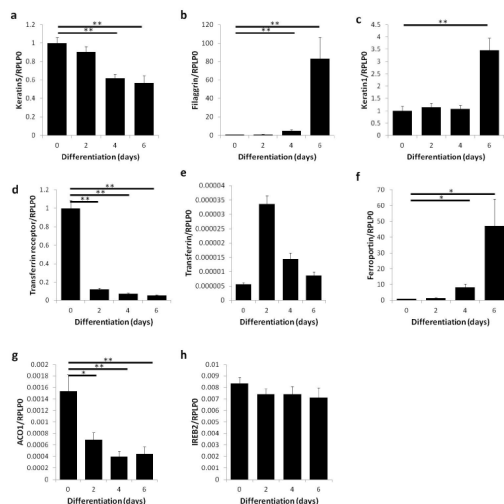
最近、乾癬やアトピー性皮膚炎病変部皮膚(Wojas-Pelc A et al. Int J Exp Pathol 207; Kirino M, et al, J Allergy Clin Immunol 2008)におけるHO-1発現の増強が報告された。私たちの研究でも(Numata I, et al. J Invest Dermatol, 2009;129:2594-603)、乾癬表皮でHO-1発現の亢進が認められた。これまでに、免疫、炎症反応におけるHO-1の役割は、主に樹状細胞、好中球、T細胞を中心として研究が進められてきた。そこで、様々な皮膚炎惹起モデルを用いて炎症性皮膚疾患病態系形成におけるHO-1の機能を明らかにする。

4. 研究成果

我々は、これまでにHO-1が表皮細胞の最終分化に伴い発現することを見だし、その役割を明らかにすることを目指し研究を進めてきた。初年度は、表皮特異的HO-1ノックアウトマウスを作成し、その役割を解析した。まず初めに解析を行ったアレルギー接触皮膚炎モデルにおいては野生型と比較して明らかな差は認められなかった。その一方、表皮特異的HO-1ノックアウトマウスでは定常状態において皮膚炎を発症するだけでなく、個体体重もコントロールである野生型と比して減少することを見出している。このことは皮膚においてHO-1が欠損することにより、DNAの酸化や脂質の過酸化が亢進することで皮膚炎が惹起され、さらには全身状態まで影響を及ぼすことを示唆している。



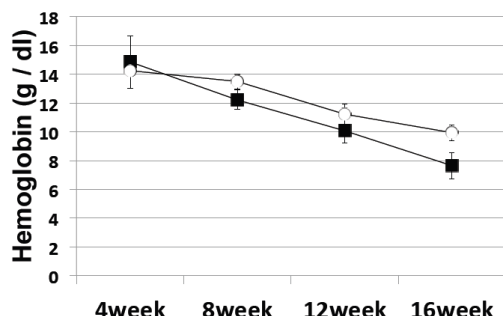
加えて本研究では、ヒト生体内で唯一知られている鉄輸送膜タンパクであるferroportinの発現を検討した。その結果、ferroportinがHO-1と同様に表皮細胞の分化に伴い発現が誘導されることを見いだした。



この観察は、ヘムに取り込まれた鉄がHO-1によりヘムから取り出され、それがferroportinにより細胞外に放出されることを示唆している。Ferroportinに関しては、腸上皮細胞やマクロファージにおける解析が進められている一方、表皮における機能の解析はこれまで行われてこなかった。そこで我々は表皮特異的ferroportinノックアウトマウスを作成することに成功し、表皮にお

る鉄代謝制御の解明にあたった。表皮において ferroportin が欠失されるとマウスの貧血が徐々に進行することが判明した。

コンディショナルノックアウト vs コントロールヘモグロビン比較



これまでに鉄代謝に関連する重要臓器としては、骨髄、腸管、肝臓、脾臓などが挙げられるが、今回我々の解析した結果からは皮膚も鉄代謝に重要な臓器として挙げられることが分かった。この結果は現在論文投稿中である。鉄代謝は細胞内における DNA の酸化や脂質の過酸化に密接に関連しているため、今後 H0-1 と Ferroportin というふたつの分子が表皮においてどのように協調して機能を果たしているのかについてさらに検証していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Asano M, Yamasaki K, Yamauchi T, Terui T and Aiba S.

Epidermal iron metabolism for iron salvage.

J Dermatol Sci. 2017 Apr 14. doi: 10.1016/j.jdermsci.2017.04.003. 査読有.

〔学会発表〕(計 1 件)

Asano M, Yamasaki K, Yamauchi T and Aiba S.

Epidermal iron metabolism to prevent iron loss by desquamation.

Society for Investigative Dermatology 75th Annual Meeting.

2016 年 5 月 11 日～14 日、Scottsdale(アメリカ)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水芦 政人 (MIZUASHI, MASATO)

東北大学・病院・助教

研究者番号： 20400369

(2) 研究分担者

伊藤 由美子 (ITOU, YUMIKO)

東北大学・病院・臨床検査技師

研究者番号： 00375057

相場 節也 (AIBA, SETSUYA)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号： 80159269

木村 裕 (KIMURA, YUTAKA)

東北大学・病院・助教

研究者番号： 90375056

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()