

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893260

研究課題名(和文)表皮角化細胞におけるヘムオキシゲナーゼの発現と抗ストレス作用に関する検討

研究課題名(英文)The expression and function of Heme Oxygenase in epidermal development and stress regulation

研究代表者

藤田 春美(Fujita, Harumi)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：30736971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヘムオキシゲナーゼ(HO)はヘムを分解する酵素であり、酸化ストレスに対する細胞保護作用を持つことが知られている。本研究では皮膚表皮におけるHOの発現と機能の解析を行った。HO-1は表皮の角質層直下の細胞に特異的に発現していた。しかし表皮特異的HO-1/2ダブルノックアウトマウスは、生理的条件下、およびUV照射や手術創形成などのストレス条件下のいずれにおいても皮膚に異常を認めなかった。表皮の分化および酸化ストレス制御にHOは必須ではなく、他のタンパクが代償性に機能すると考えられた。現在、表皮における鉄イオンの再利用にHOが寄与している可能性を考え検討を行っている。

研究成果の概要(英文)：Heme Oxygenases (HOs) are heme-catabolizing enzymes known as cytoprotective molecules against oxidative stresses. We analyzed the expression and function of HO in the epidermis. HO-1 is specifically expressed in the uppermost layer of stratum granulosum, however, epidermal-specific HO-1/2 double knockout mice had no phenotype in both physiological and stressed conditions, e.g. UV irradiation and wound healing. These results suggested the function of HOs in epidermal development and stress regulation are compensated by other unidentified proteins. Now we are investigating the function of HO in the iron recycling in the epidermis.

研究分野：皮膚科学

キーワード：皮膚 酸化ストレス 鉄 表皮 ヘム

1. 研究開始当初の背景

皮膚は生体と外界のインターフェースをなす臓器であり、外環境からの刺激や病原体などのストレスから生体を保護している。皮膚の表層を覆う細胞は表皮角化細胞と呼ばれ、基底膜側から基底層・有棘層・顆粒層・角質層により構成されている。基底層の細胞は有糸分裂を行い、有棘層・顆粒層と移行しつつ分化し、やがて角化と呼ばれる特殊なプロセス(細胞膜やオルガネラの消失・細胞骨格・接着を担う蛋白質群の架橋を伴う)を経て角質となり、最終的には皮膚表面から剥がれ落ちる。

申請者の属する研究グループは、表皮においてバリア機能を担う分子を探索するため、表皮の角質層直下の細胞層である顆粒層第一層(SG1層)を用いてDNAマイクロアレイ解析を行い、抗酸化ストレス因子ヘムオキシゲナーゼ(HO)-1がSG1層特異的に発現することを見出した。HOは、ポルフィリン環と鉄原子で構成される錯体であるヘムを分解する酵素である。ヘムはヘモグロビン・ミオグロビン・シトクロムをはじめとする種々のタンパクに組み込まれ、酸素運搬や電子伝達の活性中心として機能するが、遊離のヘムは活性酸素種となるため、体内ではすみやかに分解される必要がある。HOにはストレスで発現誘導されるHO-1と、構成的に発現するHO-2が存在する。過去、全身的HO-1欠損マウスやHOのアクチベーターであるヘミンを用いた検討により、HO-1が種々の細胞・臓器において酸化ストレスに対する細胞保護機能を持つ事が報告されてきており、表皮の恒常性維持においてもHO-1が重要である可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

- (1)表皮におけるHO-1およびHO-2陽性細胞のキャラクタライゼーションを行う。
- (2)表皮におけるHO-1/HO-2の機能を検討する。

3. 研究の方法

- (1)マウス全身の重層角化上皮から作成した凍結切片、また表皮シート whole-mount を用いた免疫組織染色法により、重層角化上皮におけるHO-1/HO-2の発現様式の検討を行った。
- (2)Keratin5-プロモーター-Cre トランスジェニックマウスとHO-1/HO-2各遺伝子がloxP配列で挟まれているfloxedマウスを交配し、表皮角化細胞特異的HO-1/HO-2ダブルノックアウトマウスを作出した。生理的条件下および酸化ストレス条件下における表皮の状態を、同齢の正常コントロールマウスと比較検討した。

4. 研究成果

- (1)凍結切片を用いた免疫組織染色により、HO-1はマウス全身の表皮および硬口蓋、食道、前胃などの重層角化上皮において、角質直下のSG1層特異的に発現することが確認された。

またマウス耳介からディスペパーゼ酵素処理で表皮シートを単離し、HO-1と種々の表皮分化マーカーを共染色し共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、HO-1が表皮顆粒層の分化の進行に応じて発現誘導され、角化に伴いシグナルが消失する様子が確認された。タイトジャンクションマーカーであるZO-1のシグナルは、表皮角化細胞が顆粒層第3層(SG3)から第2層(SG2)に分化する際に現れ、SG2からSG1への分化に伴い消失する。HO-1をZO-1と共染色したところ、SG1への分化とほぼ同時にHO-1の発現が誘導され、時間の経過に伴い発現が上昇する様子が確認された。また、角化がさらに進行し核が分解された細胞においてはHO-1のシグナルは認められなかった。これより、HO-1の発現は、表皮の分化、特に角化の過程に伴い厳密に調整されていることが示唆された。角化はミトコンドリアなど細胞内オルガネラの消失を伴う

ことから、角化過程で生じる遊離のヘムを分解するため H0-1 の発現が誘導される可能性が考えられる。

一方、H0-2 は表皮の組織染色で明確なシグナルが認められず、cDNA を用いた定量 PCR でも H0-1 に比べると発現がわずかであることから、生理的条件下の表皮では H0-1 が dominant に機能していると推測された。

(2) 表皮基底層で Cre リコンビナーゼを恒常的に発現する Keratin-5 プロモーター-Cre トランスジェニックマウスと H0-1/H0-2 各遺伝子に loxp 配列を導入した floxed マウスを交配し、表皮角化細胞特異的 H0-1/H0-2 ダブルノックアウトマウスを得た。H0-1/H0-2 遺伝子の発現の消失は免疫組織染色および定量 PCR で確認された。

ダブルノックアウトマウスはメンデルの法則に従って出生し、肉眼的観察と、全身の重層角化上皮の HE 染色切片の観察により、生理的条件下では表現型を示さないことが確認された。

そこで、表皮に外的に酸化ストレスを与えることによる表現型の導出を試みた。体毛を剃ったマウス背部皮膚に紫外線(UVB)を照射し、炎症反応および炎症治癒過程における表現型の違いを観察したが、正常コントロールとの間に違いは認められなかった。また、マウスに麻酔下で背部皮膚に手術創を形成し、治癒過程を正常コントロールと比較したが、創面積の縮小速度や治癒後の表皮の状態に違いは認められなかった。過去の報告では、H0 が種々の組織において酸化ストレス障害に対する細胞保護機能を持つことが示されてきたが、本解析により、表皮に発現する H0 は生体防御・炎症制御に必須ではなく、他の酸化ストレス制御タンパクが代償性に機能している可能性が考えられた。

一方、H0 は、ヘムを分解することでヘムに組み込まれている鉄イオンを遊離させ、体

内の鉄イオン再利用に寄与することが知られている。これより、表皮においても、H0 が細胞内のヘムを分解し、角層からの鉄排出を抑制している可能性が想定され、現在検討を行っている。これまでに、マウス耳介から単離した角層シートを用いた質量分析により、ダブルノックアウトマウスの角層に含まれる鉄が4倍程度に増加することを示唆するデータが得られている。

一般に、体内からの鉄分排出の約 20~25% が角層の落屑によるとされており、本マウスでは角層からの鉄分排出が過剰となり、鉄の代謝状態が個体レベルで変化している可能性がある。今後、本マウスを用いて、表皮における鉄代謝調節が個体の恒常性維持にどのような意義を持つか、検討を行う予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

(1)

Kazue Yoshida, Akiharu Kubo, Harumi Fujita, Mariko Yokouchi, Ken Ishii, Hiroshi Kawasaki, Toshifumi Nomura, Hiroshi Shimizu, Keisuke Kouyama, Tamotsu Ebihara, Keisuke Nagao, Masayuki Amagai

Distinct behavior of human Langerhans cells and inflammatory dendritic epidermal cells at tight junctions in patients with atopic dermatitis.

Journal of Allergy and Clinical Immunology

査読あり

134 (2014) 856-864

10.1016/j.jaci.2014.08.001

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.derma.med.keio.ac.jp/derma/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤田 春美 (FUJITA, Harumi)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：30736971