

## 論文の内容の要旨

論文題目 表皮分化を誘導する転写因子(hSkn-1a)の発現によって変動する遺伝子群の解析

指導教官 新家 眞 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 榎本喜久子

### 要旨

表皮は人体と外界との隔壁としての機能を果たしている層状の組織で、大部分は角化細胞から構成されている。角化細胞は基底層で表皮の幹細胞 (基底細胞)として分裂し、ケラチンを形成しながら上行していき (有棘細胞、顆粒細胞)、最終的には核や小器官を自己消化により失って表層から脱落していく (角質細胞)。基底層から角層に至る分化の様子は連続的な変化を捉えるのに最適な研究素材であり、組織学的に良く調べられている。分化の過程では、各層に特徴的な蛋白質の発現がみられる。基底層ではケラチン 5(K5)、ケラチン 14(K14)、有棘層ではインボルクリン、トランスグルタミナーゼタイプ 1(TG1)、顆粒層ではケラチン 1(K1)、ケラチン 10(K10)、ロリクリン、インボルクリン、プロフィラグリン、TG1、small proline-rich proteins (SPRR)などが発現しており、マーカー蛋白質とされている。

角化細胞の分化に伴う遺伝子群の発現変動は、極めて厳密に制御されていると考えら

れるが、その実体はほとんど明らかになっていない。マーカー蛋白質の発現に AP-1、AP-2、SP1、等の転写因子が関わることが知られているが、これらの転写因子群が表皮の形成過程を制御しているわけではない。最近、表皮に特異的な POU ドメイン転写因子である hSkn-1a が、表皮の分化・形成の調節因子であることを示す報告がなされた。不死化した未分化な角化細胞である HaCaT 細胞に、レトロウイルスを用いて hSkn-1a を強制発現させると、3 次元立体培養の状態では表皮様の構造を形成すること、さらに、ドミナントネガティブとして働く C 末欠損 hSkn-1a を初代角化細胞に導入すると、正常な分化が妨げられることが報告された。また、hSkn-1a のノックアウトマウスの解析から hSkn-1a が表皮の正常な分化と創傷治癒過程に不可欠であることが示された。すなわち、hSkn-1a は分化開始の引き金を引き、その後の細胞分裂の一時的な促進と最終課程での細胞死、及びマーカー蛋白質群の発現に至る一連の過程を誘導すると考えられる。従って、hSkn-1a が転写を直接支配している伝子群を明らかにすれば、分化カスケードの上流を解析する糸口を得ることができる。本研究では、hSkn-1a の発現に呼応して、速やかに発現量が変動する遺伝子群を探索した。

分化過程を詳細に研究するうえで最も大きな技術的制約となるのは、最終分化にいたる細胞は本質的に培養不能なことである。実際、hSkn-1a 発現プラスミドを HeLa に導入すると細胞増殖の停止を引き起こし、hSkn-1a を発現し続ける細胞株を作ることはできなかった。この制約を克服するために、hSkn-1a 発現カセットを組み込み、培養液中にテトラサイクリンまたはドキシサイクリンを添加することによって hSkn-1a の発現を誘導できる HeLa 細胞株(HeLa/Tet-On/hSkn-1a)を樹立した。この細胞株を使うことによって、十分な数の細胞に同時に hSkn-1a を発現させ、その後の遺伝子発現の変化を追跡することができた。

HeLa/Tet-On/hSkn-1a では、培養液にドキシサイクリン(2 $\mu$ g/ml)を加えると、添加 2 時間後から hSkn-1a が発現し、その発現は 4 日目をピークに 6 日目まで高いレベルで維持された。hSkn-1a を誘導した HeLa/Tet-On/hSkn-1a を ON 細胞、培養液中にドキシサイクリン添加しない細胞を OFF 細胞とした。ON 細胞において、顆粒層から有棘層に特異的なマーカー蛋白質である K10 と TG1 の発現が上昇した。また、hSkn-1a の発現に伴い、扁平化して増殖を停止した細胞の出現や培養の倍加時間の延長が起こった。これらの変化は、HeLa/Tet-On/hSkn-1a は hSkn-1a の発現によって分化の過程を歩み出すことを示している。

HeLa/Tet-On/hSkn-1a の OFF 及び ON にして 24 時間及び 72 時間後の mRNA を試料とし、mRNA 量の増加ないし減少する遺伝子群を探索した。まず、カテゴリーを規定しない 7600 個の遺伝子を搭載した DNA マイクロアレイで一次スクリーニングを行い、発現量の変化が大きかったものを中心に 79 個の遺伝子を選びだした。マイクロアレイは多数の遺伝子を短時間に解析できるという利点があるものの、現時点では必ずしも十分な精度と検出感度を持っていないため、選んだ遺伝子群を対象に、より定量性、再現性の高い ATAC-PCR 法によって、二次スクリーニングを行った。塩基配列が ATAC-PCR に適さなかったり、mRNA のレベルが低くて解析できなかった遺伝子 29 個は、RT-PCR で発現量を比較した。ATAC-PCR と RT-PCR の結果から、33 個の候補遺伝子を選択した。OFF 細胞、ON にしてから 1、3、6、8、10 日目の細胞、さらに 3 日間 ON にした後 3 日間 OFF にした細胞でのこれらの遺伝子発現の経時的変化を定量的 RT-PCR によって解析した。定量的 RT-PCR はもっとも再現性が高く、微量の遺伝子発現を解析することができる方法である。定量的 RT-PCR によって、表皮分化マーカー K10、TG1 の発現上昇が再確認された。さらに hSkn-1a により、Connexin 43 (Cx43)、ras homolog gene family, member H (ARHH) は発現が上昇し、Homo sapiens myxovirus resistance 2 (Mx2)、ral guanine nucleotide dissociation stimulator(RALGDS)、K18 は低下した。この変動はドキシサイクリンによるものではなく、hSkn-1a の発現に特異的であった。

次に、Cx43、ARHH、Mx2 の転写調節領域を調べるために、これらの遺伝子の 5'側の領域を含む DNA 断片をヒト胎盤ゲノムライブラリーから単離した。得られた DNA 断片の第 1 エクソンにホタルルシフェラーゼをつないだプラスミドを作成し(pCx43-luc、pARHH-luc、pMx2-luc)、HeLa/Tet-On/hSkn-1a 細胞に導入し、ON または OFF の条件で 50 時間培養後、細胞抽出液のルシフェラーゼ活性を測定した。3 種のプラスミドのすべてにおいてルシフェラーゼ活性が検出され、用いた DNA 断片がプロモーターを含むことが明らかになった。pCx43-luc では、ON と OFF の状態で転写活性に差は無く、裸の DNA をトランスフェクションする実験では、Cx43 の転写調節に関する情報を得ることは困難なことがわかった。pARHH-luc からのルシフェラーゼ活性は、OFF に比べ ON で大きく増加し、pMx2-luc では、OFF に比べて ON では低下した。これらの遺伝子の実際の転写変動と平行する成績で、今後転写調節に関わるプロモーター内のシス因子の解析に利用できることが示された。レポーターアッセイに用いたこれら 3 つの遺伝子の転写調節領域には、複数の hSkn-1a 結合可能配列が存在しており、hSkn-1a の直接の制

御をうけている可能性が示唆された。

Cx43、ARHH、Mx2 遺伝子産物の機能については不明な点が多い。Cx43 蛋白質はギャップジャンクションの構成成分であり、細胞が分化に伴って基底層から上行することと関連しているのかもしれない。ARHH と Mx2 の遺伝子産物は GTPase 活性を持つ。GTPase は一般に分子スイッチとして働いているので、細胞増殖や細胞死に関わるシグナル伝達で何らかの役割を果たしているのかもしれない。今後、これらの遺伝子のプロモーターに hSkn-1a が直接働いて、転写の活性化ないし不活性化を起こす分子機構を明らかにすると共に、調節因子としての役割が想定される ARHH と Mx2 遺伝子産物の機能を明らかにすることで、表皮形成に至る分化の初期過程で起こる遺伝子発現の変動とそれを調節する機構を知ることができよう。さらに下流の変化を支える遺伝子群の探索も可能になると期待できる。