

論文内容の要旨

論文題目 強力な細胞増殖抑制因子である Interferon- γ は炎症性および増殖性ケラチンであるケラチンK6の発現を増加させる

指導教官 玉置邦彦教授

東京大学大学院医学系研究科

外科学専攻 感覚・運動機能医学講座

皮膚科学教室

氏名 服部尚子

ケラチンは、細胞骨格蛋白の一つである中間径フィラメントに属しており、現在 35 種類が知られているが、酸性と塩基性のケラチンがヘテロポリマーを形成して発現している。K6 は K16 または K17 と共に手掌足底表皮、口腔内・外陰部基底層上層の扁平上皮、毛包に発現している。K6 は 6 種類のサブタイプがあり、K6a が 7 割以上を占める。K6/K16/K17 の遺伝子変異は *pachyonychia congenita* という常染色体優性遺伝性の爪の異常を生じる。K6/K16/K17 は創傷治癒の過程で発現するケラチンとしても知られている。また、炎症性の表皮では、健全な毛包間表皮には発現していない K6/K16/K17 が発現している。これまでに tumor necrosis factor- α は K6、epidermal growth factor と transforming growth factor- α は K6/K16、IL (interleukin)-1 は K6/K16/K17、IFN (interferon)- γ は K16/K17 を誘導するという報告がある。IFN- γ は Th-1 タイプの炎症を誘導し、表皮角化細胞の成長を抑制する。IFN- γ は signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 の活性化を介して、K17 を誘導するとの報告があるが、同時に誘導されるペアのケラチンは未知である。培養ヒト表皮角化細胞(NHK)では炎症性/過増殖性のケラチンが定常状態でかなりの量発現しているため、これらのケラチンの発現誘導の実験が困難であった。そこで我々は、正常ヒト皮膚 (NHS) *ex vivo* の系でこのようなケラチンの発現誘導が検証できることを示し、K6 の発現誘導の検証に利用した。

研究方法

1) NHK は keratinocyte growth medium で、HaCaT 細胞および DJM 細胞は 10% ウシ血清を加えた modified Eagle's medium で 37°C、5%CO₂ 下で培養し、IFN- γ で刺激した後回収して、ウェスタンブロット (WB) 法にて K6 の発現を調べた。また、HaCaT 細胞を IFN- γ で刺激したときの上清中の IL-1 α 濃度を ELISA で計測し、次に分泌相当量の IL-1 α で HaCaT 細胞を刺激し、K6 の発現誘導を WB 法で調べた。また、IFN- γ 刺激で分泌された IL-1 α を抗 IL-1 α 抗体で中和し、K6 の発現を調べた。

2) NHS 標本は外科的手術により入手し、keratinocyte basal medium にて培養し、IFN- γ で刺激後回収し、各種ケラチンの免疫染色、WB 法および K6/K17 の mRNA の Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) を施行した。

3) HaCaT 細胞はワイルドタイプ (wt) STAT1 遺伝子またはドミナントネガティブ (dn) STAT1 遺伝子をトランスフェクション後、IFN- γ で刺激し WB 法にて K6 の発現量および細胞数の計測を施行した。

4) nuclear factor κ B (NF κ B) と Inhibitor of NF κ B に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを HaCaT 細胞に加えて IFN- γ で刺激し WB 法で K6 の発現誘導を確かめた。

5) HaCaT 細胞、DJM 細胞、および NHK を IFN- γ で刺激し、各細胞の細胞数を計測した。

6) WB 法の結果は、NIH Image 1.49 を使って半定量化した。

7) NHK に K6 プロモーターの下流にクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子を組み込んだプラスミドと、コントロールプラスミドとをトランスフェクションした後、IFN- γ 刺激し CAT assay と β -galactosidase assay を行った。

実験結果

1) NHS *ex vivo* 標本のケラチン発現様式は、無刺激では 48 時間まで正常ヒト皮膚と同様であり、IFN- γ 刺激による K17 の発現誘導を免疫染色、WB 法、mRNA の RT-PCR にて検証できた。

2) IFN- γ で刺激した NHS *ex vivo* 標本では、K6 は suprabasal に発現がみられた。

3) NHS *ex vivo* 標本および HaCaT 細胞より抽出したケラチン蛋白中の K6 は、IFN- γ 刺激により有意に増加した。DJM 細胞では、IFN- γ 刺激による K6 発現誘導はみられなかった。NHK では IFN- γ 刺激により K6 誘導がわずかにみられた。

4) IFN- γ 刺激で HaCaT 細胞、DJM 細胞、NHK の増殖は抑制された。

5) dnSTAT1 遺伝子を HaCaT 細胞にトランスフェクションすると IFN- γ による K6/K17 の発現誘導は有意に抑制され、細胞増殖は抑制されなかった。

6) HaCaT 細胞上清中の IL-1 α 濃度は、IFN- γ 刺激により 50pg/ml まで上昇したが、この濃度では、K6 は誘導されなかった。上清中の IL-1 α をブロックすると K6 の IFN- γ による誘導は抑制された。

7) NF κ B のアンチセンスオリゴヌクレオチドは HaCaT 細胞における IFN- γ による K6 の誘導を抑制した。

8) IFN- γ で刺激した NHS *ex vivo* 標本より抽出した RNA 中の K6 の mRNA は IFN- γ の刺激により増加していた。

9) NHK を IFN- γ で刺激すると、K6 のプロモーター活性は濃度依存的に上昇した。

考案

この研究では、IFN- γ が NHS *ex vivo* システム、NHK および HaCaT 細胞で K6 を誘導することを蛋白レベル、mRNA レベルおよびプロモーターレベルで証明し、K6 と K17 が炎症の過程で STAT1 を介して発現することを示し、これらがペアである可能性を示唆した。また、IFN- γ がこれらの細胞または皮膚で強い増殖抑制作用を示すことも検証した。

我々は、*ex vivo* 皮膚システムによる炎症性ケラチンの発現誘導実験の有用性を免疫染色法、WB 法により蛋白レベルで、RT-PCR により mRNA レベルで検証した。また、STAT1 転写因子の核内移行について免疫染色にて確認し、*ex vivo* 皮膚システムがより *in vivo* に近い系として有用であることを示した。

K6 は IFN- γ の刺激により *ex vivo* 皮膚システムの免疫染色で suprabasal に発現することが示された。WB 法では、*ex vivo* 皮膚と HaCaT 細胞で K6 の発現が有意に増加することが示された。HaCaT 細胞もまた、IFN- γ による K6 の発現モデルとして適当であると考えた。NHK、DJM 細胞では、IFN- γ による K6 の発現誘導はほとんど見られなかったが、増殖抑制は確認できた。

HaCaT 細胞において STAT1 のリン酸化の抑制は IFN- γ による増殖抑制と K6 の誘導の両方をブロックした。K6/K17 および増殖抑制が、ともに STAT1 を介していることは、この誘導系が創傷治癒過程のコントロールに参与している可能性が示唆された。

IFN- γ の刺激により表皮角化細胞から分泌される IL-1 α の量はそれ自体では、K6 の発現を誘導できないほど微量であったが、分泌された IL-1 α を中和すると K6 の発現はブロックされた。分泌された IL-1 α は IFN- γ とともにシナージスティックに働いていることが示唆された。このシナージスティックな発現誘導への NF κ B の関与の可能性を確かめたところ、NF κ B のアンチセンスオリゴヌクレオチドで IFN- γ による K6 の発現誘導は完全にブロックされた。dnSTAT1 による STAT1 の経路のブロックもまた IFN- γ による K6 の発現誘導をブロックした。これらの結果から、IFN- γ による K6 の発現誘導には NF κ B と STAT1 の両者が必要であり、両者がシナージスティックに働いていることが示唆された。K6 プロモーターにおいて、NF κ B と STAT1 とがシナージスティックに働くか、独立して働くかは未解明である。IFN- γ の K6 プロモーター上での反応部位を用いたさらなる研究が必要である。

さらに、IFN- γ の刺激により *ex vivo* 皮膚において、K6 遺伝子の mRNA が増加していること、また、NHK において K6 のプロモーター活性が IFN- γ の濃度依存的に増加していることも示された。これにより、IFN- γ による K6 の発現誘導は転写レベルで起こっていることが示された。

展望

我々は、皮膚の *ex vivo* システムを使うことにより、培養表皮角化細胞では検証することの難しい炎症性/過増殖性のケラチンの発現機構を蛋白レベル、mRNA レベル、転写因子レベルで検証することができることを示した。*ex vivo* 皮膚の採取部位、提供者の年齢、性別、採取時の取り扱い方法などによる結果への影響の検討が今後必要である。

我々は、また、IFN- γ による K6 の発現誘導に STAT1 のみならず、IL-1 α と NF κ B とが必要であることを示した。STAT1 と NF κ B との K6 プロモーターへの結合部位については、未解明であるため、今後の検討が必要である。

また、IFN- γ による K6 誘導の経路は K17 と同様であるが、免疫染色の染色態度に若干の差があり、両者がペアである可能性について、さらに検討が必要で

ある。

K6、K16、K17は創傷治癒過程で発現することが知られており、IFN- γ による増殖抑制が、創傷治癒の増殖コントロールに関与している可能性が考えられた。乾癬皮膚において、増殖抑制因子である IFN- γ が過増殖の皮疹を形成するメカニズムは乾癬の病態のメカニズムと大きく関わりがあると考えられる。IFN- γ による過増殖性のケラチン K6 誘導のメカニズムの解明は、乾癬の病態の解明に大きく寄与すると思われる。