

|                  |   |
|------------------|---|
| Title            | 肌理の再生に向けて：ケラチン17の機能解析   |
| Sub Title        | Analysis of keratin 17 in skin texture  |
| Author           | 種本, 倫(Tanemoto, Michi)  |
| Publisher        |   |
| Publication year | 2021  |
| Jtitle           | 科学研究費補助金研究成果報告書 (2020. )  |
| JaLC DOI         |   |
| Abstract         | <p>マウス胎仔期の肌理、毛包形成において、ケラチン17が特徴的な発現を認めた。ケラチン17をノックダウンした皮膚培養系では、肌理の形成が抑制された。またケラチン16をノックダウンした培養系でも、肌理の形成が抑制された。ケラチン16や17と相補的に働くとされるケラチン6に関しては、抑制しても肌理形成に影響はなかった。ケラチン17を抑制した皮膚培養系では、コントロール群に比べ表皮の細胞増殖が抑制されていた。またマウス上皮細胞にケラチン17を過剰発現させるとその細胞増殖能が上がり、ケラチンによる表皮細胞の増殖が肌理の形成に関与している可能性が示唆された。</p> <p>Characteristic expression of keratin 17 was observed in mouse fetal texture and hair follicle formation. In a skin culture system in which keratin 17 was knocked down, texture formation was suppressed. Texture formation was also suppressed in a culture system in which keratin 16 was knocked down. Keratin 6, which is said to act complementarily to keratins 16 and 17, had no effect on texture formation. In the skin culture system in which keratin 17 was suppressed, cell proliferation of the epidermis was suppressed as compared with the control group. In addition, overexpression of keratin 17 in mouse epithelial cells increased its cell proliferation capacity. Experiments with keratin 17 knockout mice showed a tendency for the embryo texture of 15.5 day old fetal mice to become shallower, which is currently being analyzed.</p> |
| Notes            | <p>研究種目：若手研究<br/>研究期間：2019～2020<br/>課題番号：19K18916<br/>研究分野：創傷治癒</p>   |
| Genre            | Research Paper  |
| URL              | <a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_19K18916seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_19K18916seika</a>   |

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18916

研究課題名(和文)肌理の再生に向けてーケラチン17の機能解析

研究課題名(英文)Analysis of keratin 17 in skin texture

研究代表者

種本 倫 (TANEMOTO, Michi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：50748902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウス胎仔期の肌理、毛包形成において、ケラチン17が特徴的な発現を認めた。ケラチン17をノックダウンした皮膚培養系では、肌理の形成が抑制された。またケラチン16をノックダウンした培養系でも、肌理の形成が抑制された。ケラチン16や17と相補的に働くと考えられるケラチン6に関しては、抑制しても肌理形成に影響はなかった。ケラチン17を抑制した皮膚培養系では、コントロール群に比べ表皮の細胞増殖が抑制されていた。またマウス上皮細胞にケラチン17を過剰発現させるとその細胞増殖能が上がり、ケラチンによる表皮細胞の増殖が肌理の形成に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

手術や外傷後の傷跡は、しばし患者のQOLを下げうる要因となる。瘢痕が目立つ原因の一つとして、肌理の消失・付属器の欠如があげられる。今回の研究成果から肌理の発生過程でのケラチンの重要性が示され、今後肌理の再生への足掛かりとなり、臨床応用へ期待がもたれる。

研究成果の概要(英文)：Characteristic expression of keratin 17 was observed in mouse fetal texture and hair follicle formation. In a skin culture system in which keratin 17 was knocked down, texture formation was suppressed. Texture formation was also suppressed in a culture system in which keratin 16 was knocked down. Keratin 6, which is said to act complementarily to keratins 16 and 17, had no effect on texture formation. In the skin culture system in which keratin 17 was suppressed, cell proliferation of the epidermis was suppressed as compared with the control group. In addition, overexpression of keratin 17 in mouse epithelial cells increased its cell proliferation capacity. Experiments with keratin 17 knockout mice showed a tendency for the embryo texture of 15.5 day old fetal mice to become shallower, which is currently being analyzed.

研究分野：創傷治癒

キーワード：肌理 ケラチン17 ケラチン16

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

癒痕を残さない完全な皮膚の再生を目指すためには、肌理(キメ)の再生が欠かせない。しかし現在に至るまで、肌理がどのように形成されているか、そのメカニズムは解明されていない。皮溝には溝が深いものと浅いものがあり、毛は深い皮溝と皮溝の交点から生えており、汗腺は皮丘に開口するというパターンがある。このため、皮膚付属器の形成と肌理の形成は、深く関係していると推測される。正常の皮膚の表面は一様に平滑ではなく、多数の細かい皮溝と呼ばれる溝が刻まれている。皮溝に囲まれた部分は皮丘と呼ばれ、これらにより形成されるパターンは肌理と呼ばれる。癒痕は正常皮膚に比べ、皮膚付属器(毛包、脂腺、汗腺)が欠如し、真皮が線維化するという特徴を持つ。さらに癒痕の上では、肌理が乱れている、もしくは無くなっているために光沢があるという特徴がみられ、これが傷跡の目立つ大きな原因となっている。

そこでマウスの皮膚の肌理と毛包の関係に着目し、肌理、毛包が発生過程でどのように形成されるかを解析することで、肌理の再生を目指すことを目的とした。予備実験で様々な分子の染色を行っている際に、type 1 keratin17(以下 K17)が毛包特異的にかつ皮溝、皮丘の発生と関与していたため、この分子に着目し研究を開始した。

## 2. 研究の目的

本研究では、毛と肌理の形成の関連性および K17 がマウスの皮膚の肌理の発生過程でどのような役割を果たしているかを解析することで、肌理の形成メカニズムを調べ、さらには癒痕に肌理の再生を目指すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) マウス胎仔皮膚の whole mount 染色

胎生 14.5, 15.5, 16.5, 17.5, 18.5 日の ICR マウス胎仔の背部皮膚を採取し、Whole mount 免疫染色(keratin17, CD31)を行った。その後共焦点顕微鏡を用いて三次元的に観察を行った。

### 2) 胎仔皮膚の ex vivo 培養系における siRNA ノックダウン実験

K17 が胎仔皮膚における肌理の形成にどのような役割を果たしているのかを検討するため、siRNA による K17 発現抑制を行い、ex vivo の培養系で胎仔皮膚の肌理の形成を観察した。

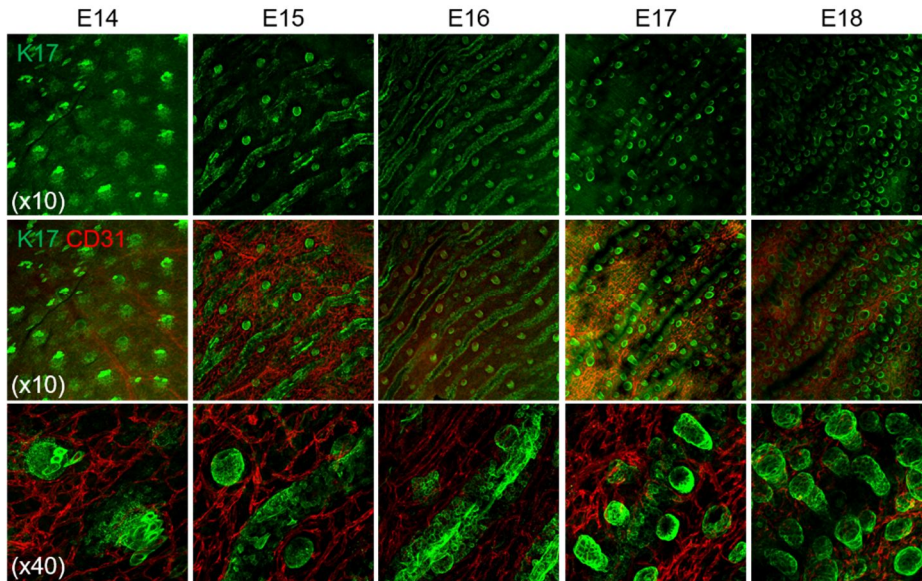
#### エレクトロポレーションを用いた胎仔皮膚への siRNA 導入

siRNA 導入の条件や効率の検討のため、胎生 14.5 日の ICR マウス胎仔の側部皮膚に、遺伝子導入装置 NEPA21 (ネッパジーン社)のエレクトロポレーションを用い、GFP と GAPDH-siRNA(Dharmacon, #D-001830-02)を導入した。ネガティブコントロールとして GFP と non-targeting siRNA(Dharmacon, #180426、以下 NT-siRNA)を導入した。濃度は 250nM, 1μM, 5μM とし、導入後側部皮膚を剥離し、中央をくりぬいた濾紙上で D-MEM + 10%FBS+1% penicillin/streptomycin にて培養を行った。24 時間、48 時間後で RNA を採取し、そのノックダウン効率を検証した。続いて予備実験から得られたデータより導入遺伝子の濃度を 1μM とし、胎生 14.5 日、15.5 日の胎仔皮膚に GFP と Keratin17-siRNA(Dharmacon, #2098945、以下 K17-siRNA)エレクトロポレーションで導入し、ネガティブコントロールとして GFP と NT-siRNA を導入した。導入後側部皮膚を剥離し、濾紙上で培養を開始し、導入直後、24 時間後、48 時間後で実体顕微鏡下及び蛍光実体顕微鏡下で肌理と毛根形成の観察を行った。その後、RNA 抽出と凍結切片作成用、パラフィン切片用として組織を回収し、PCNA 染色や TUNEL 染色で評価を行った。

## 4. 研究成果

### 1) マウス胎仔皮膚の whole mount 染色

皮溝の帯状の Keratin 17(以下 K17)陽性細胞群から毛包ができる、あるいは先にできた毛包に出現した K17 陽性の表皮細胞から皮溝が形成されることが示唆された。K17 は皮溝に帯状に発現が認められ、皮溝・皮丘の完成とともに発現が消退していた。



## 2)胎仔皮膚の *ex vivo* 培養系における siRNA ノックダウン実験

### siRNA の発現抑制の検証

**GFP** と **GAPDH-siRNA** のエレクトロポレーション導入後、培養 **24** 時間後の観察では、皮膚全体に **GFP** 陽性細胞が観察され、遺伝子導入されたことが観察された (図 2 左・中央)。また導入後 **48** 時間後の組織像では、**GFP** が表皮および一部真皮に発現しているのが観察された (図 2 右)。

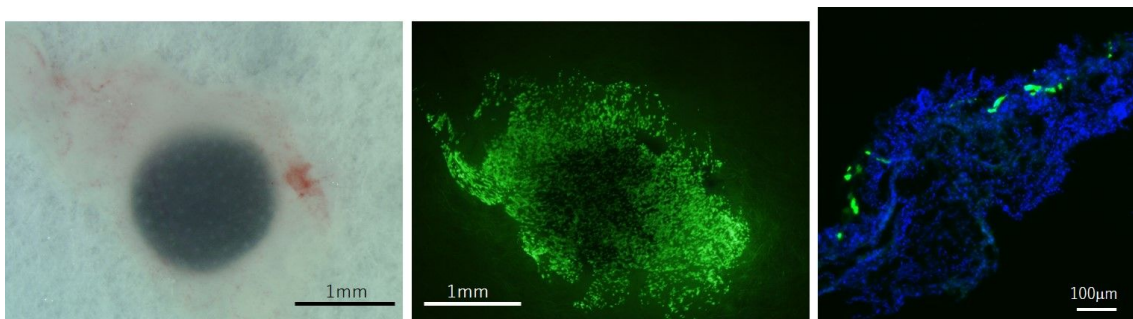


図 2 E14.5 日胎仔マウス皮膚遺伝子導入後 24 時間後、48 時間後

(左 : 24 時間後、実体顕微鏡下、中央 : 24 時間後蛍光実体顕微鏡下、右 : 48 時間後凍結切片)

リアルタイム PCR による **GAPDH-siRNA** による遺伝子抑制効率の検証では、**24** 時間後では、**250nM, 1µM, 5µM** とともに約 **50%** の発現抑制を認め、また **48** 時間後の結果では、**1µM, 5µM** で約 **20%** の発現抑制を認めた (図 3)。そのため、本実験では **siRNA** の濃度を **1µM** とし、導入を行った。

**1µM K17-siRNA** を **E14.5** 日及び **E15.5** 日に導入したところ、**48** 時間後で **K17-siRNA** 群では、コントロールの **NT-siRNA** 群に比べ **E14.5** 日 ( $0.62 \pm 0.02$ )、**E15.5** 日 ( $0.38 \pm 0.05$ ) とともに有意にその発現の抑制が認められた (図 4)。

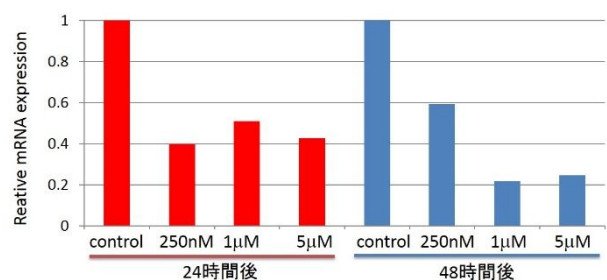
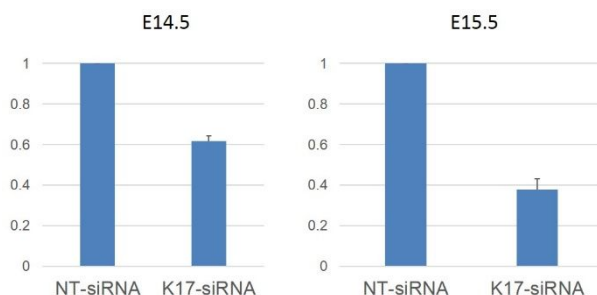
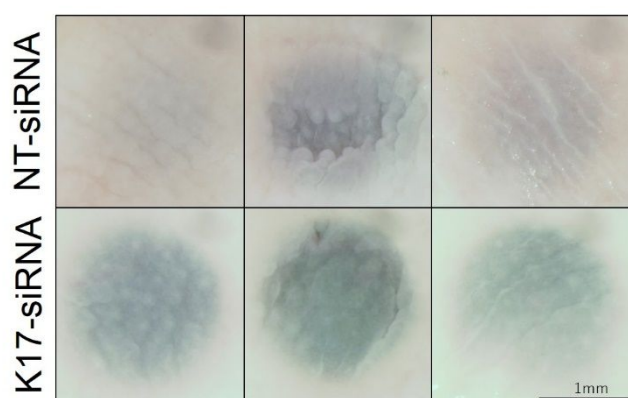


図 3 E14.5 日胎仔マウス皮膚遺伝子導入後 24 時間後、48 時間後における **GAPDH** の発現



**図 4 E14.5 日(左), E15.5 日(右)胎仔マウス皮膚遺伝子導入後 48 時間後における K17 の発現 K17 発現抑制下における肌理の観察**

siRNA 遺伝子導入後、48 時間培養したのちに実体顕微鏡で各群皮膚組織における肌理を実体顕微鏡下で観察を行った結果、NT-siRNA 群に比べ K17-siRNA 群では肌理が浅くなる傾向が観察された ( 図 4 )。



**図 4 遺伝子導入後 48 時間培養後における皮膚の肌理の観察**

#### **K17 発現抑制下における皮膚の細胞増殖およびアポトーシス**

K17-siRNA 導入下における肌理の消失傾向の機序を検討するため、細胞増殖とアポトーシスを検討した。PCNA の表皮・真皮における陽性細胞数を比較検討したところ、表皮では、K17-siRNA 群( $4.67 \pm 2.75$ )では、NT-siRNA( $8.07 \pm 3.26$ )群に比べ有意差をもって表皮細胞の増殖が抑えられていた ( $p < 0.05$ )。真皮の陽性細胞数については、両群で有意差は認めなかった。

また、TUNEL 法で表皮におけるアポトーシスによる細胞死を検討したところ、K17-siRNA 群と NT-siRNA 群で有意差は認められなかった。

K17 は、上皮付属器 (毛包、腺、爪) に局在を示す一方で、正常上皮にはその発現は認められないが、乾癬や創傷治癒過程など過剰増殖状態では発現が上昇し、表皮細胞の過増殖のマーカーとされている<sup>1)</sup>。また、K17 は 14-3-3 タンパクに結合することで mTOR (mechanistic target of rapamycin) 経路を活性化し、細胞の大きさや増殖に関与することが報告されている<sup>2)</sup>。今回の結果より、胎生期においては胎生 15.5 日より皮溝に相当する上皮に K17 の発現が見られ、徐々に発現が増強し皮溝の完成とともにその発現が減少していくことから、肌理の形成過程が、上皮の過剰増殖状態であることが示唆される。今回の我々の結果では、胎仔皮膚の K17 をノックダウンすると発生段階 (胎生 15.5 日 ~ 17.5 日) の肌理の形成が抑制され、表皮の細胞増殖が抑制された。これらのことから、K17 を介した表皮細胞の増殖が、発生段階における肌理の形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。これまで肌理の発生とケラチンの関係に着目した論文報告はなく、今回の知見が新規であると考えられる。

#### **【参考文献】**

**1. Yang L, et al. E3 Ligase Trim21 Ubiquitylates and Stabilizes Keratin 17 induce STAT3**

**Activation in Psoriasis. JID 18: 32037-2, 2018.**

**2. Kim S, et al. A keratin cytoskeletal protein regulates protein synthesis and epithelial cell growth. Nature 441(7091): 362-5, 2006.**

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|