

主論文の要旨

**Possible roles of barrier-to-autointegration
factor 1 in regulation of keratinocyte
differentiation and proliferation**

〔 ケラチノサイトの分化、増殖における
barrier-to-autointegration factor 1の役割 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
運動・形態外科学講座 皮膚病態学分野

(指導：秋山 真志 教授)

高間 寛之

【緒言】

barrier-to-autointegration factor1 (以下 BANF1) は核膜の裏打ち構造である nuclear lamina の重要な構成要素であり、lamin A や DNA、ヒストン、LEM ドメイン蛋白などに直接結合する。BANF1 はクロマチンの構造形成や核分裂、遺伝子の制御などに重要な役割を果たし、S 期の正常な進行に必要な分子であると考えられている。

近年、Progeria 症候群の一種である Néstor-Guillermo progeria syndrome (以下 NGPS) が BANF1 の遺伝子異常により発症することが報告された。NGPS は稀な遺伝性疾患で、精神発達遅滞や老化様症状の早期発症、すなわち出生後の成長障害や動脈硬化、皮膚萎縮、脱毛などを特徴とする。さらに興味深いことに、BANF1 と直接結合する lamin A をコードする遺伝子の異常もまた、最も主要な progeria 症候群である Hutchinson-Gilford progeria syndrome の原因であることが明らかになった。

Progeria 症候群では細胞増殖は抑制されており、組織学的に表皮および真皮の萎縮が認められる。皮膚症状は progeria 症候群でほぼ必発であるが、BANF1 の表皮細胞における役割は解明されていない。一方、乾癬などの増殖性皮膚疾患の病変部では表皮細胞のターンオーバーが亢進している。そこで我々は、増殖性皮膚疾患の病変部において progeria 症候群とは対照的に BANF1 の活性が増強していると推測した。この研究で我々は BANF1 の正常表皮細胞および増殖性皮膚疾患の表皮細胞における役割を検討した。

【方法】

・ BANF1 の表皮における動態を把握するため、抗 BANF1 抗体を用いてヒト組織で免疫組織化学染色を行い、正常組織および乾癬組織における BANF1 の局在を検討した。実験には 10 検体の正常皮膚組織と、10 検体の乾癬病変部組織を用いた。全ての組織検体はインフォームドコンセントを得た上で採取した。

・ 細胞増殖マーカー、PCNA と BANF1 の分布および共染の有無を確認するため、抗 PCNA 抗体と抗 BANF1 抗体を用いた蛍光抗体法による二重染色を行った。組織は乾癬病変部の皮膚を用いた。

・ BANF1 の表皮細胞における炎症関連分子への影響を解析するため、ヒト表皮細胞株である HaCaT 細胞において BANF1 特異的 siRNA (以下 siBANF1) を用いた BANF1 の発現のノックダウンを行った。この実験では CD4 特異的 siRNA (以下 siCD4) をネガティブコントロールとして使用した。リアルタイム PCR を用い炎症関連分子の mRNA 量を測定、評価した。

・ 同様の目的で、ヒト扁平上皮癌の細胞株である HSC-1 細胞において siBANF1 を用いた BANF1 のノックダウンを行い、その後 TPA 刺激を加えた。この実験においても siCD4 をネガティブコントロールとして使用した。炎症関連分子の蛋白発現量および mRNA 発現量をウェスタンブロットおよびリアルタイム PCR を用いて測定、評価した。

【結果】

・抗 BANF1 抗体による免疫組織化学染色の結果、BANF1 は乾癬病変表皮において全層の表皮細胞で核優位に染色された(Figure1B)。一方正常表皮では、BANF1 は表皮の下半分において殆どの細胞で核優位、表皮の上半分では細胞質優位の局在が見られた (Figure1A)。この結果は、増殖的な状態にある表皮細胞 (即ち乾癬組織の表皮細胞や正常表皮の基底細胞) において BANF1 が活性化されている事を示す。

・細胞増殖マーカー、PCNA と BANF1 の二重染色の結果、PCNA と BANF1 は表皮の下半分でともに核への局在を認めた (Figure2A-C)。PCNA の発現は表皮の上方に向かって徐々に弱くなり、BANF1 の発現は表皮の上方に向かって徐々に核から細胞質へと移行する事が確認された。PCNA と BANF1 は特に表皮下半分で核に共染された (Figure2C)。

・HaCaT 細胞に BANF1 のノックダウンを行った結果、siBANF1 により BANF1 の mRNA 量が減少(Figure3A)、c-Fos, c-Jun, TNF, S100A9, S100A7 などの炎症関連分子の mRNA が上昇した(Figure 3B)。

・HSC-1 に BANF1 のノックダウンおよび TPA 刺激を行った結果、TPA 刺激された HSC-1 において BANF1 のノックダウン により BANF1 の mRNA 量が減少し、S100A9 および Fos の mRNA 量が増加した (Figure4A,B)。

また TPA 刺激により BANF1 のタンパク量は増加した。c-Jun のタンパクの総量は TPA 刺激により増加したが、BANF1 のノックダウンでは c-Jun のタンパクの総量は大きく変化しなかった。しかしながら BANF1 のノックダウンにより非リン酸化 c-Jun が減少しリン酸化 c-Jun が増加しており (Figure5、矢尻)、これは c-Jun の活性化を意味する。S100A9 のタンパク量は TPA 刺激では不変であったが、siBANF1 によって増加した。

【考察】

この研究で我々は、増殖的な状態にある表皮細胞において BANF1 が活性化していることを示した。また BANF1 が S100A9 および c-Jun の抑制を介して炎症を抑制している可能性がある事を示した。

既報告では増殖的な *in vitro* の環境下では BANF1 が核に局在し S 期の進行に関わることが示されている。これと我々の抗 BANF1 抗体を用いた免疫染色の結果を合わせ、増殖的な状態にある表皮細胞 (即ち乾癬組織の表皮細胞や正常表皮の基底細胞) では BANF1 が活性化されている可能性があると考えた。さらに、後述の HSC-1 を用いた実験でも TPA 刺激により BANF1 の発現が上昇した。この結果は BANF1 が増殖的な状態にある表皮細胞において発現が増加している事を示唆するものであった。

また HaCaT 細胞における BANF1 のノックダウンの結果、多種類の炎症関連分子の mRNA が上昇した。さらに HSC-1 細胞における BANF1 ノックダウンおよび TPA 刺激の結果、BANF1 のノックダウンにより c-Jun のリン酸化 (c-Jun の活性化を表す) および S100A9 の発現タンパク量上昇が誘導されることが確認された。S100A9

は乾癬において表皮細胞の分化異常や炎症に関連する分子であり、乾癬患者の血清 S100A9 量は乾癬の病勢と相関する。また AP-1 ファミリーのタンパク (c-Jun や c-Fos など) は IL-1, IL-6, IL-8 などの発現に関わっており、乾癬組織の表皮において発現異常が認められている。これらの結果により、BANF1 の抑制により炎症関連分子の発現上昇および活性の増強が起こることが示され、すなわち表皮細胞において BANF1 が炎症に対し抑制的に働いている可能性が示唆された。

【結論】

BANF1 は乾癬組織において活動的な状態であり、増殖的な状態にある表皮培養細胞においても発現が上昇している。BANF1 の活性化は S100A9 の発現抑制と c-Jun の活性化抑制を介し、炎症を抑制している可能性がある。