

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10218

研究課題名(和文) Notchシグナルによるオートファジー制御とストレス応答機構における役割の解明

研究課題名(英文) Roles of Notch signaling in regulating autophagy induction and stress response

研究代表者

森山 麻里子 (Moriyama, Mariko)

近畿大学・薬学総合研究所・准教授

研究者番号：40595295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Notchシグナル下流因子であるHes1の表皮特異的コンディショナルノックアウトマウス(Hes1epicKO)を用い、創傷ストレス時におけるHes1の新たな働きを見出した。具体的には、当初予定していたオートファジー制御による結果とは異なり、表皮のHes1が皮膚免疫を制御することで、創傷治癒に参与している可能性を示唆する結果を得た。さらに、Hes1は皮膚免疫疾患として知られる乾癬にも参与していることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚はからだの最表面に位置しているため、皮膚疾患は命を脅かすのみならず、見た目などの問題にも関わることから、QOLに大きな影響を与えることとなる。今回の研究成果により、Notchシグナルを制御することで褥瘡などの創傷治癒や乾癬などの治療に役立つことが期待される。さらに、皮膚免疫に関わるその他の疾患、例えばアトピー性皮膚炎や接触性皮膚炎などにも応用できる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have found a new role of Hes1 in the skin wound healing. Skin epidermal-specific knockout of Hes1 resulted in the delayed wound healing through regulating the skin immunity and inflammation. In addition, we found that the Hes1 was involved in the development of psoriasis.

研究分野：皮膚科学

キーワード：創傷治癒 Notchシグナル 皮膚免疫

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

表皮は体の表面に位置しているため、外界からの刺激、例えば紫外線、異物侵入等による炎症や創傷など、さまざまな危険にさらされている。このような刺激を受けた皮膚はオートファジー誘導などのストレス応答を起こすが、ストレス応答では対応できない過度なストレスが負荷されたときや、ストレス応答が破綻すると、アポトーシスによる細胞死が引き起こされる。過度なアポトーシスによる表皮のバリア機能傷害は、さらなる炎症反応を惹起させる要因となると考えられる。このような観点から、表皮のストレス応答機構や表皮の形態維持機構の解明に基づいた新しい治療薬などの開発が期待されている。

申請者らは、Notch シグナルの下流で転写抑制因子である Hes1 がマウス有棘層に発現し、顆粒層への分化を抑制していることを明らかとした (Moriyama et al. *Dev Cell* 2008)。さらに、Hes1 はオートファジー促進因子である BNIP3 の発現を抑制し、有棘層から顆粒層への分化のタイミングを制御していることを見出した (Moriyama et al. *J Invest Dermatol.* 2014)。加えて、紫外線照射などの外的ストレス暴露時には BNIP3 が上昇し、オートファジーを介して表皮ケラチノサイトのアポトーシスを抑制することも明らかとした (Moriyama M et al. *Cell Death Dis.* 2017)。以上の結果を踏まえると、外的ストレス暴露時に Notch-Hes1 経路が活性化することは、BNIP3 の発現とオートファジー誘導を抑制してしまうため、好ましくない現象と考えられる。しかし実際驚くべきことに、紫外線照射されたケラチノサイト、創傷治癒時におけるマウス背部皮膚表皮ともに、Hes1 の発現上昇が認められた (Moriyama et al. 未発表データ)。

以上のことをふまえ、本研究では、表皮ケラチノサイトストレス暴露時における Notch-Hes1 経路のストレス応答に対する働きについて、特にオートファジーに着目して検討することを目的とした。この研究を通して、UV をはじめとしたストレスから表皮を保護するメカニズムの解明や治療への足がかりを作るとともに、表皮ケラチノサイトにおける Notch シグナルの新しい作用機序を提唱したいと考えた。

### 2. 研究の目的

上述した背景とこれまでの研究成果・予備研究をもとに、表皮ケラチノサイトストレス暴露時における Notch-Hes1 経路のストレス応答に対する役割を明らかにすることで、各種ストレスからの表皮保護機構を解明することを目的とした。具体的には、ストレス暴露時における、表皮ケラチノサイトでの Notch や Hes1 の発現パターンを解析したり、ストレス暴露時に上昇する Notch-Hes1 経路が BNIP3 発現やオートファジー誘導能に影響するかを明らかにするために、表皮特異的 Hes1 ノックアウトマウスの解析や、DAPT などの Notch 阻害剤の効果を詳細に調べようと試みた。

### 3. 研究の方法

#### 3-1. マウス

K14-CreER<sup>T2</sup> マウスは Professeur Pierre Chambon (I.G.B.M.C./U.S.I.A.S. France) と MTA を交わした後、神戸理化学研究所 藤原裕展博士より提供された。Hes1 floxed マウスは、京都大学 影山龍一朗博士、今吉格博士より提供を受けた。表皮特異的 Hes1 コンディショナルノックアウトマウスは、K14-CreER<sup>T2</sup>: Hes1flox マウスに 100 µg の 4-hydroxytamoxifen を 5 日間連続腹腔内注射して作成した。遺伝子改変マウスの飼育は、近畿大学遺伝子組換え実験安全管理委員会の承認を受け、適切に行った。

#### 3-2. 創傷治癒

マウスはイソフルランによる麻酔下のもと、背部皮膚に直径 5 mm の生検トレパンで全損欠損創を作成し、シリコンリングを創の周辺に縫い付けた。創はテガダーム<sup>TM</sup>トランススペアレントフィルム (3M) と包帯で保護し、5 日ごとに創を撮影した。創傷治癒率は Image J で傷の大きさを測定し、算出した。

#### 3-3. 乾癬モデルマウスの作成

マウスの背部を脱毛し、1 日あたり 62.5 mg のベセルナクリーム 5% を、連続して 3 日から 5 日間程度連続塗布した。

#### 3-4. 定量的 PCR

マウス背部皮膚を直径 6 mm の生検トレパンで切り抜き、3.8% チオシアン酸アンモニウム/PBS 溶液に室温 20 分間浮かべ、表皮と真皮をピンセットで分けた。表皮は Trizol で溶解させ、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を使用して total RNA を精製した。Total RNA 1 µg より Verso cDNA Synthesis Kit で cDNA を合成し、定量的 PCR を行った。内部コントロールは、GeNorm ソフトウェアを用いて決定した。

#### 3-5. 細胞

初代ヒト表皮ケラチノサイトは CELLnTec 社より購入し、CnT-PR (CELLnTec 社) で培養した。

初代マウス表皮ケラチノサイトは、生直後マウスの背部皮膚を 5000 units/mL Dispase I/ HBSS 溶液へ浮かべ、4 時間でオーバーナイト静置した後、表皮と真皮に分けた。表皮を accutase 溶液に浮かべ、37 °C で 10 分処理した後、セルストレイナーに通して遠心し、 $4 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> となるように CnT-PR 培地で播種した。

### 3-6. 免疫染色

マウス皮膚は 4% PFA/PBS で固定した後、20% ショ糖/PBS 溶液に一晩つけてから OCT compound で包埋した。10 μm 厚で凍結切片を作成した後、PBSMT (2% スキムミルク, 0.1% TritonX-100 含有 PBS) でブロッキングし、1 次抗体としてラット免疫抗 Hes1 抗体、ニワトリ免疫抗ケラチン 14 抗体、ウサギ免疫抗ケラチン 10 抗体を使用した。2 次抗体として Alexa488 標識抗ラット IgG 抗体、Alexa555 標識抗ウサギ IgG 抗体を用いた。封入には Prolong Gold Antifade Kit with DAPI (Life Technologies 社) を用いた。撮影は LSM800 共焦点顕微鏡 (Zeiss) で行った。

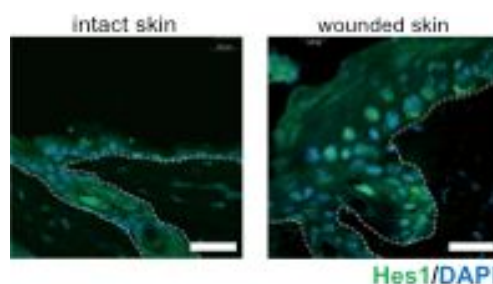
### 3-7. 検定

検定は GraphPad Prism ソフトウェアを用い、2-way ANOVA の後 Sidak 検定で行った。P < 0.05 を有意差ありとした。

## 4. 研究成果

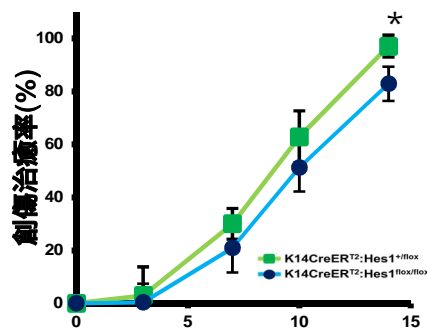
### 4-1. 創傷ストレス時における Hes1 の発現

ヒト初代表皮ケラチノサイトに UVB を照射すると、Hes1 の発現が上昇した (データ非掲載)。そこで in vivo でのストレス応答時における Hes1 の発現を解析した。マウスに全損欠損創を作成した 2 日目に皮膚を回収し、Hes1 に対する免疫染色を行った。すると、図 1 に示すように、創傷部位では非創傷領域と比べ、表皮での Hes1 の発現が上昇していることを見出した。



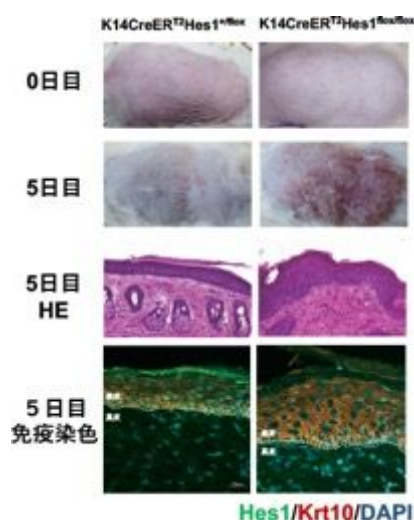
### 4-2. 創傷治癒における Hes1 の働き

表皮特異的 Hes1 コンディショナルノックアウトマウスに全層欠損創を作成し、創傷治癒率を算出したところ、図 2 で示すように、表皮特異的 Hes1 コンディショナルノックアウトマウスでは傷の治りが有意に遅くなることが明らかとなった。また、表皮特異的 Hes1 コンディショナルノックアウトマウスでは、傷口の化膿が見られた。このことから、Hes1 は皮膚免疫に関与し、創傷治癒を遅らせている可能性が示唆された。



### 4-3. 乾癬モデルでの Hes1 の働き

創傷治癒時に傷口の化膿が見られたことから、Hes1 は皮膚免疫に関与している可能性が考えられた。実際、乾癬モデルマウスならびにヒト乾癬病変部位では Hes1 の発現が上昇していることを見出した (データ非掲載)。そこで、乾癬モデルマウスで検証を行った。その結果、図 3 に見られるように、表皮特異的 Hes1 コンディショナルノックアウトマウスでは、表皮肥厚、異常角化を伴う乾癬の増悪が観察された。また水分蒸散量を測定したところ、表皮特異的 Hes1 コンディショナルノックアウトマウスでは水分蒸散量の上昇が確認され、バリア機能の著しい低下が起きていることも確認された (データ非掲載)。



### 4-4. 創傷治癒、乾癬モデルにおける Hes1 の分子機構

そこで、どのような分子機構で Hes1 が皮膚免疫に関与しているかを調べる目的で、創傷治癒時、ならびに乾癬様症状発症時におけるマウス背部皮膚表皮より RNA を抽出し、当初の目的であったオートファジー関連遺伝子群、ならびに皮膚免疫に関与すると考えられる遺伝子群に対する定量的 PCR を行った。すると、表皮特異的 Hes1 コンディショナルノックアウトマウスでは、オートファジー関連遺伝子である Bnip3 の発現や、皮膚免疫に関与すると考えられる遺伝子の発現が有意に上昇してい

ることを見出した（データ非掲載）。また、マウス新生児より初代ケラチノサイトを樹立し、ベセルナクリームを添加したところ、同様の遺伝子群が表皮特異的 Hes1 コンディショナルノックアウトマウス由来の初代ケラチノサイトで上昇していることを確認した。今後は、網羅的遺伝子解析を行い、より詳しいメカニズムを解明していきたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Moriyama Hiroyuki, Moriyama Mariko, Ozawa Toshiyuki, Tsuruta Daisuke, Iguchi Taro, Tamada Satoshi, Nakatani Tatsuya, Nakagawa Koichi, Hayakawa Takao	4. 巻 27
2. 論文標題 Notch Signaling Enhances Stemness by Regulating Metabolic Pathways Through Modifying p53, NF-B, and HIF-1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cells and Development	6. 最初と最後の頁 935 ~ 947
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/scd.2017.0260	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Moriyama H, Moriyama M, Ozawa T, Tsuruta D, Iguchi T, Tamada S, Nakatani T, Nakagawa K, Hayakawa T	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Notch signaling enhances stemness by regulating metabolic pathways through modifying p53, NF-B, and HIF-1 .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cells Dev	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/scd.2017.0260	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Moriyama M, Moriyama H, Uda J, Kubo H, Nakajima Y, Goto A, Morita T, Hayakawa T	4. 巻 8
2. 論文標題 BNIP3 upregulation via stimulation of ERK and JNK activity is required for the protection of keratinocytes from UVB-induced apoptosis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell Death Dis	6. 最初と最後の頁 e2576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/cddis.2017.4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Moriyama Mariko, Sahara Shunya, Zaiki Kaori, Ueno Ayumi, Nakaoji Koichi, Hamada Kazuhiko, Ozawa Toshiyuki, Tsuruta Daisuke, Hayakawa Takao, Moriyama Hiroyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Adipose-derived stromal/stem cells improve epidermal homeostasis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-54797-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hidayat Moulid et al.	4. 巻 19
2. 論文標題 Role of FBXW7 in the quiescence of gefitinib-resistant lung cancer stem cells in EGFR-mutant non-small cell lung cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bosnian Journal of Basic Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 355-367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17305/bjbms.2019.4227	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計21件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Mariko Moriyama
2. 発表標題 FoxO3a Plays Roles in the Wound Healing by Regulating Mitochondrial Dynamics
3. 学会等名 Japan - Singapore International Skin Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Morita, Mariko Moriyama, Takao Hayakawa, Hiroyuki Moriyama
2. 発表標題 FoxO3a Plays Roles in the Wound Healing through Autophagy
3. 学会等名 16th International Society for Stem Cell Research 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sonoka Fujinami, Mariko Moriyama, Takashi Morita, Ken Natsuga, Takao Hayakawa, Hiroyuki Moriyama
2. 発表標題 Crucial role of BNIP3-induced autophagy in differentiation and maintenance of skin epidermis
3. 学会等名 16th International Society for Stem Cell Research 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森山麻里子
2. 発表標題 皮膚に於けるオートファジーの役割
3. 学会等名 5th 幹細胞・細胞分化リトリート
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤波そのか, 森山麻里子, 森田貴士, 松本諭以子, 尾崎紀文, 和田晃拓, 早川堯夫, 森山博由
2. 発表標題 FoxO3aによるオートファジーの誘導は皮膚の恒常性維持に重要である
3. 学会等名 第67回日本薬学会近畿支部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takashi Morita, Mariko Moriyama, Yuka Nakajima, Arisa Goto, Ryo Morita, Ken Natsuga, Takao Hayakawa, Hiroyuki Moriyama
2. 発表標題 FoxO3a plays roles in the wound healing through autophagy
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuki Marutani, Mariko Moriyama, Takashi Morita, Yuka Nakajima, Arisa Gotoh, Ryo Morita, Ken Natsuga, Takao Hayakawa, Hiroyuki Moriyama.
2. 発表標題 BNIP3-induced autophagy is required for maintenance of epidermal homeostasis.
3. 学会等名 15th International Society for Stem Cell Research (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森山麻里子、森山博由
2. 発表標題 皮膚に於けるオートファジーの役割
3. 学会等名 幹細胞・細胞分化リトリート
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 丸谷祐樹、森山麻里子、森山博由
2. 発表標題 皮膚におけるFoxo3aの役割
3. 学会等名 幹細胞・細胞分化リトリート
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mariko Moriyama, Hiroyuki Moriyama, Takao Hayakawa
2. 発表標題 BNIP3-induced Autophagy is Required for Maintenance of Epidermal Homeostasis
3. 学会等名 47th European Society for Dermatological Research (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 丸谷祐樹、森山麻里子、森田貴士、後藤ありさ、森田遼、松本諭以子、早川堯夫、森山博由
2. 発表標題 皮膚におけるFoxo3aの役割
3. 学会等名 第67回日本薬学会近畿支部会
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 森田貴士, 森山麻里子, 後藤ありさ, 森田遼, 丸谷祐樹, 松本諭以子, 宇田純輝, 夏賀 健, 早川堯夫, 森山博由
2. 発表標題 オートファジー関連因BNIP3は表皮分化に重要な働きをする
3. 学会等名 第67回日本薬学会近畿支部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takashi Morita, Mariko Moriyama, Yuka Nakajima, Arisa Goto, Ryo Morita, Ken Natsuga, Takao Hayakawa, Hiroyuki Moriyama
2. 発表標題 FoxO3a Plays Roles in the Wound Healing through Autophagy
3. 学会等名 The 40th Annual meeting of the Molecular biology society of Japan
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mariko Moriyama, Hirokazu Kubo, Yuka Nakajima, Arisa Goto, Takao Hayakawa, Hiroyuki Moriyama
2. 発表標題 BNIP3 is required for the protection of keratinocytes from UVB-induced apoptosis through induction of autophagy
3. 学会等名 42th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森田貴士, 森山麻里子, 早川堯夫, 森山博由
2. 発表標題 オートファジー制御因子BNIP3は表皮恒常性の維持に寄与する
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森田遼、森田貴士、森山麻里子、早川堯夫、森山博由
2. 発表標題 BNIP3は紫外線から皮膚を保護するのに重要な役割を果たす
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mariko Moriyama
2. 発表標題 FoxO3a Plays Roles in the Wound Healing by regulating mitochondrial dynamics
3. 学会等名 Japan-Singapore International Skin Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅田大輔、森山麻里子、早川堯夫、森山博由
2. 発表標題 Hes1の皮膚における新たな役割
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroki Kiriya, Moriyama Mariko, Sahara Shunya, Zaiki Kaori, Ueno Ayumi, Nakaoji Koichi, Hamada Kazuhiko, Ozawa Toshiyuki, Tsuruta Daisuke, Hayakawa Takao, Moriyama Hiroyuki
2. 発表標題 Adipose-derived stromal/stem cells improve epidermal homeostasis
3. 学会等名 44 th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mariko Moriyama, Takao Hayakawa, Hiroyuki Moriyama
2. 発表標題 FoxO3a Plays Roles in the Wound Healing by regulating mitochondrial dynamics
3. 学会等名 44 th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅田大輔、森山麻里子、早川堯夫、森山博由
2. 発表標題 Hes1の皮膚における新たな役割
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 森山麻里子, 赤木淳二, 北郡秀晃, 森山博由	4. 発行年 2018年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 -
3. 書名 Bio Industry 2018年9月号	

1. 著者名 肌におけるオートファジーの働き 香粧品への応用	4. 発行年 2019年
2. 出版社 フレグランスジャーナル社	5. 総ページ数 -
3. 書名 FRAGRANCE JOURNAL 2019/8月号	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	森山 博由  (Moriyama Hiroyuki)  (90581124)	近畿大学・薬学総合研究所・准教授     (34419)	