

表皮ケラチノサイトにおけるグルコーストランス ポーター（GLUT）の局在と機能の検討

（研究課題番号：08670939）

平成8年度～平成10年度科学研究費補助金（基盤研究（C）（2）） 研究成果報告書

平成11年2月

研究代表者

橋本喜夫
（旭川医科大学医学部皮膚科）

表皮ケラチノサイトにおけるグルコーストランスポーター
(GLUT)の局在と機能の検討

(研究課題番号 08670939)

平成8年度科学研究費補助金 基盤研究(C)(2) 研究成果報告書

平成11年2月

研究代表者 橋本喜夫
(旭川医科大学医学部皮膚科)

は し が き

グルコースは動物細胞にとって最も基本的なエネルギー源であり、これを細胞膜を通過して取り込まなければならない。最近、グルコーストランスポーター (GLUT)のcDNAが相次いで単離され、蛋白質の1次構造が決定された。その結果、グルコーストランスポーターは少なくともGLUT 1~5の5種類が存在することが明らかになった。しかし、表皮ケラチノサイトにおいてはグルコーストランスポーターはどのタイプが存在しているか不明で、その機能や皮膚疾患との関連も明らかになっていない。またケラチノサイトにおけるグルコースの膜透過性に関しても、その機序は不明である。また、表皮の増殖機構、及び細胞動態とそれに伴うグルコース取り込み、アポトーシスとの関連においても不明である。そこでまず、組織学的構築が極めてヒト表皮に類似する豚表皮器官培養系を用いて、豚表皮ケラチノサイトにおけるグルコースの取込みを、³Hでラベルした非代謝性糖類似物質である2-deoxy-D-glucoseを用いて検討した。さらに実験的表皮増殖系であるtape-strippingやUVB(中波長紫外線)照射といったin vivoの系で、グルコースの取込みを検討すると同時にDNA合成能をサイミジン取り込みで、細胞周期をフローサイトメトリーで検討した。また、グリコーゲン蓄積性の増殖性皮膚疾患である尋常性乾癬患者の皮疹部、無疹部を採皮して、グルコース取込みを検討した。またGLUT 1~5のモノクローナル抗体により、Western blotting法、免疫組織学的検討によりその存在証明を行い、GLUTの局在も免疫組織化学的に検討した。

研究組織

研究代表者：橋本喜夫 (旭川医科大学医学部皮膚科)
研究分担者：高橋英俊 (旭川医科大学医学部皮膚科)
研究分担者：中村哲史 (旭川医科大学医学部皮膚科)

研究経費

平成8年度	600千円
平成9年度	600千円
平成10年度	600千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. 橋本喜夫、川岸尚子、田村俊哉、飯塚 一：選択的PKC阻害剤カルフォスチンCの豚表皮細胞動態に与える影響、Cytometry Research 6:9-17,1996.
2. 橋本喜夫、田村俊哉、高橋英俊、飯塚 一：豚表皮DNA合成と β アドレナリンアデニル酸シクラーゼ反応性に与える各種漢方生薬、方剤の作用、日本皮膚科学会誌106:1083-1089,1996.
3. Toyota N, Hashimoto Y, Matsuo S, Kitamura Y, Iizuka H: Effects of FK506 and cyclosporin A on proliferation, histamine release and phenotype of murine mast cells. Arch Dermatol Res 288:474-480,1996.
4. Toyota N, Sakai H, Takahashi H, Hashimoto Y, Iizuka H: Inhibitory effect of $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin D3 on mast cell proliferation and A23187-induced histamine release, also accompanied by a decreased c-kit receptor, Arch Dermatol Res 288:709-715,1996.
5. Ishida-Yamamoto A, Hashimoto Y, Manabe M, O'guin WM, Dale BA, Iizuka H: Distinctive expression of filaggrin and trichohyalin during various pathways of epithelial differentiation, Br Journal of Dermatology 137:9-16,1997.
6. 橋本喜夫、飯塚 一：豚皮膚器官培養系に与える各種生薬相互作用の検討、漢方医学22:16-18,1998.
7. Takahashi H, Hashimoto Y, Kinouchi M, Iizuka H: Interferon- γ -dependent induction of manganese superoxide dismutase activity of SV40-transformed human keratinocytes by anti-Fas antibody and by TNF- α 、Journal of Dermatological Sci 16:191-199,1998.
8. Tamura T, Takahashi H, Ishida-Yamamoto A, Hashimoto Y, Iizuka H: Functional alteration of guanine nucleotide binding proteins (Gs and Gi) in psoriatic epidermis, Journal of Dermatol Sci 17:61-68,1998.
9. Kawagishi N, Hashimoto Y, Takahashi H, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H: Epidermal cell kinetics of pig skin in vivo following UVB irradiation: apoptosis induced by UVB is enhanced in hyperproliferative skin condition, Journal of Dermatological Sci 18:43-53,1998.

(2) 口頭発表

1. 橋本喜夫、川岸尚子、田村俊哉、高橋英俊、飯塚 一：camptothecin(CPT)の豚表皮細胞動態に与える影響、第6回日本サイトメトリー学会総会、1996年6月29日
2. 川岸尚子、高橋英俊、橋本喜夫、飯塚 一：UVB照射後の豚表皮細胞動態とアポトーシス誘導 —P53,P21の発現との関連性—、第325回日本皮膚科学会北海道地方会、1996年7月7日
3. Sakai H, Toyota N, Takahashi H, Hashimoto Y, Iizuka H: Effects of glucocorticoids on mast cell line, MC/9 cells, 21st Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 1996年、7月26日
4. 橋本喜夫：プロテインキナーゼ阻害剤の豚表皮細胞動態に与える影響 —特にカルフォスチンCを中心に—、第1回旭川皮膚科リサーチセミナー、1997年、2月1日
5. 高橋英俊、橋本喜夫：表皮細胞とアポトーシス、第7回日本サイトメトリー学会北海道地方会、1997年11月15日
6. 中村哲史、高橋英俊、橋本喜夫、飯塚 一：FRSK細胞、豚表皮における増殖刺激によるMAP kinase活性の変動、第333回日本皮膚科学会北海道地方会、1998年2月14日
7. 橋本喜夫：camptothecin(CPT)の豚表皮細胞動態に与える影響、第2回旭川皮膚科リサーチセミナー、1998年、2月21日
8. 高橋英俊、橋本喜夫、木ノ内基史、飯塚 一：Copper, zinc-superoxide dismutase(Cu Zn-SOD)がUVB照射によるアポトーシス誘導に及ぼす影響、第5回分子皮膚科学フォーラム、1999年7月18日

結果と考察

1. 豚表皮及びASR系ミニプタ表皮におけるGLUT(グルコーストランスポーター)の局在と増殖との関連

(目的と方法)

グルコースは動物細胞にとって最も基本的なエネルギー源であり、これを細胞膜を通過して取り込まなければならない。最近、グルコーストランスポーター (GLUT)のcDNAが相次いで単離され、蛋白質の1次構造が決定された。その結果、グルコーストランスポーターは少なくともGLUT 1~5の5種類が存在することが明らかになった。しかし、表皮ケラチノサイトにおいてはグルコーストランスポーターはどのタイプが存在しているか不明で、その機能や皮膚疾患との関連も明らかになっていない。またケラチノサイトにおけるグルコースの膜透過性に関しても、その機序は不明である。そこでミニプタ表皮を用いて、ケラチノサイトのグルコースの取り込みを測定し、実験的表皮増殖系における取り込みの違いを検討し、GLUT1-5のモノクローナル、ポリクローナル抗体を用いてGLUTの存在および増殖との関連を検討した。

(結果と考察)

1) 豚表皮器官培養系を用いて、豚表皮ケラチノサイトにおけるグルコースの取込みを、³Hでラベルした非代謝性糖類似物質である2-deoxy-D-glucoseを用いて検討したところ、時間依存性に取込みが亢進したが、はじめの30分間で、ほぼプラトーに達し、培養系にグルコースを添加すると競合して、取込みが減少することがわかった。また取込みは、アクチノマイシンDなどの蛋白合成阻害剤により、有意に抑制され、インスリン添加では影響をきたさなかった。これらの結果から、豚ケラチノサイトにおけるグルコース透過性は、担体(GLUT)により行われる促進拡散であることが推定された。

2) GLUT1~5のモノクローナル、ポリクローナル抗体を用いて、ミニプタ表皮ケラチノサイトでの局在を免疫組織化学的に検討したところ、GLUT1のみ染色性がみられ、基底層の細胞膜に陽性であった。

3) tape-stripping 処置 2 4 時間後の表皮及びUVB照射 9 6 時間後の表皮といった実験的表皮増殖系ではその染色性は幾分の増強がみられ、特に基底層とその直上の有棘層に局在がみられた。

4) UVB照射 9 6 時間、1 2 0 時間の増殖亢進期に一致してケラチノサイトの2-deoxy-D-glucoseの取り込みの有意な亢進がみられた。

5) 豚表皮抽出液を用いたWestern-blottingでもGLUT2~5は豚表皮に存在を確認できなかったが、GLUT1は44KDに存在が確認された。GLUT1は一般にインスリン不応性であり、促進拡散を示す組織に多く存在するといわれ、表皮ケラチノサイトにおいても生理的にGLUT1が主体に機能していると推定される。

2. 豚表皮及びASR系ミニプタ表皮に与える中波長紫外線(UVB)照射の影響—細胞動態とアポトーシスの関連—

(目的と方法)

中波長紫外線(UVB)は尋常性乾癬など表皮増殖性疾患に有効な治療法の一つであるが、正常表皮に対してはDNA合成抑制後、一過性の表皮増殖も起こすことが知られる。またサンバーンセルといわれるアポトーシスをもきたすことも知られている。本実験では豚表皮およびASR系ミニプタにUVBを照射し、経時的表皮増殖パターンをDNA-flow cytometry, ³H-thymidine 取込み、PCNA染色、病理組織などで検討し、アポトーシスの形成を病理組織、TUNEL法で検討を加えた。またアポトーシスの形成に関与するといわれる癌抑制遺伝子P53, CDK inhibitorのP21の経時的变化も免疫組織学的に検討した。

(結果)

1) thymidine取込み、mitotic countはUVB 2MED(250mJ/cm²)照射48hまで低下し続け、その後増加傾向を示し、mitosisのピークは72h, thymidine取込みのピークは96hで、これらは168hまでにbasal levelに復した。

- 2)PCNAは24hに増加しはじめ、72-96hでピークを示した。
- 3)S期分画は24hで低下し、48hではG2/M期分画の低下をみた。S期分画はUVB照射96h後にピークがみられ、168hでbasal levelに復した。
- 4)apoptotic cells(ACs)は主にbasal layerに照射12hから出現し、ACs形成のピークは48hで、これらは主に表皮中層から上層にみられた。72hではACsはほとんどが消失した。48hのACsはTUNEL陽性であった。
- 5)P53陽性細胞はUVB6h後に出現し、24hにピークが見られた(表皮全層)。P53陽性細胞数は72hに減少し、96hでほとんど消失した。
- 6)P21陽性細胞はUVB照射12h後に検出され、48hにピークが認められた(表皮下層)。96hにP21陽性細胞は減少し、120hに消失した。
- 7)ACsとP53陽性細胞数はUVB照射量に依存したが、P21は3MED照射と2MED照射で有意差はみられない。
- 8)P53とエオジン染色の二重染色でみると、ACsとP53陽性細胞は同一でなく、P21陽性細胞とACsも同一の細胞ではなかった。
- 9)実験的表皮増殖系であるtape-stripping処置後にUVBを照射して、ACs,P53,P21を検討したところ、tape-stripping処置皮膚ではUVB誘発性のACsの形成増加と、PCNA陽性細胞の増加が認められた。P53,P21陽性細胞に関しては有意差がみられず、tape-stripping処置のみではP53,P21染色陽性細胞はみられなかったし、ACsの形成もみられなかった。

(考察)

ASR系ミニブタおよび国産ブタ(体重5kg)を用いて、apoptotic cell(ACs)の形成に与える中波長紫外線(UVB)の影響を検討し、P53,P21,PCNAも免疫組織学的に検討した。ACsは12hまでに出現し、48hにピークがみられた。P53,P21はそれぞれ6h,12hに出現し、ピークはそれぞれ24h,48hであった。PCNAは24hで増加し、96hでピークがみられた。DNA-flow cytometryでは24hでS期分画の低下と96hで増加のピークがみられ、G2/M期分画は6,48hで低下し後に増加した。サイミジン取込みとmitosis数は48hまで低下し、72-96hまで増加のピークがみられた。UVB誘発性ACsの数とPCNA陽性細胞はtape-stripping処置皮膚で有意に増加がみられ、P53とP21陽性数に有意差はなかった。tape-stripping単独処置ではACs,P53,P21の誘導はみられない。これらの結果はUVB照射がミニブタ表皮にG1 arrest,S期延長、G2/M blockをきたし、apoptosisを起こすことを示し、この過程はG1 check pointとDNA損傷細胞の排出が関与することが想定される。またUVB誘発性アポトーシス形成は表皮増殖状態でより促進され、これらは細胞周期進行と密接に関連することを示す。

3.中波長紫外線 (UVB) 照射後のミニブタ表皮細胞動態とMAP kinase活性の変動

(目的と方法)

紫外線照射により、細胞表面の成長因子やサイトカインreceptorが活性化されるとした報告が多くなされており、紫外線はreceptor ligandsと似た働きをすると考えられている。このことは紫外線照射により様々な細胞応答が起こることを説明する。とくに、MAP kinase familyは成長因子やサイトカインreceptorからの応答を伝達する経路として様々な培養細胞にてその反応が検討されている。

皮膚は直接紫外線を受ける臓器として重要な器官であるばかりでなく、今後はオゾン層の破壊による中波紫外線の増加に伴い紫外線による皮膚の老化、細胞増殖への影響も検討されなければならない。今回はin vivoとして、国産ブタ及びASR系ヘアレスミニブタ表皮を用い、紫外線による細胞増殖にたいする変化をthymidine取込みにより検討し、MAP kinase familyの変化を比較検討した。

(結果)

- 1) thymidine取込みは6時間より48時間までコントロールに比べ20-40%に減少し、72時間から120時間までコントロールの150-200%に増加した。
- 2) MAP kinase familyはmyelin basic proteinのリン酸化により検討したところ、15-60分で、コントロールに比べ130-180%増加し(第一のピーク)、いったん6時間から24時間までコ

ントロールの60-80%に減少したのち36時間で110%に増加し（第二のピーク）その後120時間までコントロールの50%へ減少した。

3) 60分までの第一のピークのMAP kinaseの増加はwestern blotによる検討ではp38のリン酸化が主体であることが示された。Erkリン酸化はわずかであった。

4) ヘマトキシリンエオジン染色によるブタ皮膚には60分までは明らかな形態学的異常は認めなかった。

（考察）

第一のMAP kinaseのリン酸化ピークは細胞の増殖に影響していないと考えられた。形態にも影響がでていなかった。p38の下流の反応系の細胞増殖、形態変化以外への影響を与えているものと考えた。

第二のMAP kinaseのリン酸化ピークはthymidine取込みの前に起こっており、このピークは細胞増殖と関係している可能性が強く示された。