

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591615

研究課題名(和文) 癌抑制遺伝子 p53ファミリーとRunxファミリーによる表皮細胞の制御と発癌

研究課題名(英文) Transcription factors Runx regulates differentiation and proliferation of keratinocyte

研究代表者

奥山 隆平 (OKUYAMA, Ryuhei)

信州大学・医学部・教授

研究者番号：80292332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)： 転写因子の1つであるRunxは、Runx1-3と3サブタイプからなっている。さまざまな組織において幹細胞の制御、発生、発癌などで重要な働きを有している。しかし、表皮における働きは不明であり、今回Runx1とRunx3に関して、その働きを解析した。解析法として、アデノウイルスベクターを用いてRunxを過剰発現させたり、配列特異的なsiRNAを用いてRunxの発現をノックダウンさせたりした。その結果Runxは、表皮細胞の増殖と分化を共に抑制する働きがあることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： Runt-related transcription factor (Runx) family is implicated in stem cell regulation, tissue development and oncogenesis. Runx consists of Runx1-3 and plays important roles in several organs by affecting cell survival, proliferation and differentiation. However, it is unknown whether and how Runx regulates in the epidermis. We investigated the functions of Runx1 and Runx3 in the epidermis.

We overexpressed Runx1 and Runx3 in primary mouse keratinocytes by using adenovirus vectors. Furthermore, we decreased the expression of Runx1 and Runx3 by using sequence-specific siRNAs. These experiments showed that Runx inhibits both differentiation and proliferation in keratinocyte.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：Runx 表皮 増殖 分化

## 1. 研究開始当初の背景

私たちは日々、紫外線に曝されながら生活している。社会の高齢化に伴い長い年月紫外線に暴露し、そのため皮膚癌、特に有棘細胞癌が生じる人が増えている。有棘細胞癌の性質を明らかにし、制御する治療法の開発が急務となっている。

転写因子の1つである Runx は、Runx1～3 と3サブタイプからなっている。さまざまな組織において幹細胞の制御、発生、発癌などで重要な働きを有している。Runx1 は造血幹細胞に、また Runx2 は骨軟骨の発生に必要不可欠な分子である。さらに Runx3 は欠失すると胃癌が生じるため、胃癌の癌抑制遺伝子としての働きを有していることが知られている。しかし、表皮など有棘細胞での働きはほとんど未解明である。Runx の働きを明らかにすることで、将来的には有棘細胞癌に治療に結びつけていけるのではないかと思われる。

## 2. 研究の目的

表皮細胞の増殖、分化、細胞死における Runx の作用を、分子細胞生物学的に明らかにする。

## 3. 研究の方法

Runx の働きを *in vitro* と *in vivo* の両面から解析する。

*In vitro* においては、マウス表皮細胞を分離し初代培養する。この培養表皮細胞において Runx1、Runx3 の働きを変化させ、増殖、分化、細胞死の変化を観察する。Runx の活性を高まるためには、Runx1 もしくは Runx3 を組み込んだアデノウイルスベクターを作成し、培養表皮細胞に感染させる。Runx の活性を低下させるためには、配列特異的な siRNA を用いる、もしくは dominant negative な働きを有する Runx をアデノウイルスベクターに組み込んで培養細胞に導入する。

*In vivo* においては、Runx1f/f マウスや Runx3f/f マウスと、Keratin 5 Cre recombinase マウスを交配し、表皮組織特異的に Runx1、Runx3 を欠失させる。その上で遺伝子欠失に伴い表皮に生じた変化を組織学的に解析する。

## 4. 研究成果

*In vitro* における解析を通じて、Runx1 や Runx3 を過剰発現させると増殖が抑制される一方、発現を抑制しても増殖に変化は生じなかった。表皮細胞では未分化で盛んに増殖している状態では Runx は増殖にあまり働いておらず、分化して増殖が停止するような状態で働いているのではないかと考えられた。

分化に関しては、Runx1 や Runx3 を過剰発現させると有棘層で発現するケラチン 1 やケラチン 10 の発現が抑制された。逆に Runx の働きを抑えるとケラチン 1 やケラチン 10 の発現が亢進した。よって、Runx1 と Runx3 は

ともに表皮細胞の分化を抑えるブレーキの働きを有していることが明らかになった。

さらにその分子メカニズムを明らかにするため、Chromatin immunoprecipitation 法を用いて、ケラチン 1、ケラチン 10 の転写調節領域への Runx の結合を調べた。その結果、ケラチン 1、ケラチン 10 の転写調節領域へ Runx が直接結合することが明らかとなった。Runx はケラチン 1、ケラチン 10 の転写調節を直接負に制御していた。

さらに、Runx1 や Runx3 の働きを *in vivo* レベルで解析するため、Runx1f/f マウスや Runx3f/f マウスと、Keratin 5 Cre recombinase マウスの交配を進めた。皮膚での組織特異的に Runx1 を欠失させたが、表皮細胞の増殖や分化に変化は生じなかった。皮膚での組織特異的に Runx3 を欠失させたマウス、さらには Runx1 と Runx3 を共に欠失したマウスの作成を進めており、表皮での変化を解析する予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 90 件)

1. Miyake T, Minagawa A, Koga H, Fukuzawa M, Okuyama R. Histopathological correlation to the dermoscopic feature of "string of pearls" in clear cell acanthoma. *Eur J Dermatol* 2014. 査読有
2. Ohashi A, Kuniwa Y, Kosho T, Suga T, Has C, Kubo H, Okuyama R. A Case of Kindler Syndrome with Severe Esophageal Stenosis. *Int J Dermatol* 2014. 査読有
3. Unno T, Minagawa A, Koga H, Uhara H, Okuyama R. Alteration of dermoscopic features in a juvenile xanthogranuloma during follow-up of 43 months. *Int J Dermatol* 2014. 査読有
4. Uhara H, Ashida A, Koga H, Uchiyama A, Uchiyama R, Hayashi K, Kuniwa Y, Okuyama R. NRAS mutations in primary and metastatic melanomas of Japanese patients. *Int J Clin Oncol* 2014. 査読有
5. Okada T, Nakamura T, Watanabe T, Onoda N, Asida A, Okuyama R, Ito K. Coexpression of EpCAM, CD44 variant isoforms and Claudin-7 in anaplastic thyroid carcinoma. *PLoS One* 9: e94487, 2014. 査読有  
doi: 10.1371/journal.pone.0094487.
6. Sano T, Minigawa A, Koga H, Uhara H, Okuyama R. Acral melanocytic nevus showing parallel ridge pattern due to predominant distribution of melanin column under the surface ridge. *Acta Derm Venereol* 2014. 査読有  
doi: 10.2340/00015555-1865.

7. Asai Y, Kiniwa Y, Okada N, Futatsugi T, Ushiki A, Uhara H, Okuyama R. Generalized pustulosis associated with disseminated *Mycobacterium avium* infection in a non-AIDS patient. *Eur J Dermatol* 2014. 査読有  
doi: 10.2340/00015555-1836.
8. Uchiyama R, Ishii N, Arakura F, Kiniwa Y, Nakazawa K, Uhara H, Hashimoto T, Okuyama R. IgA/IgG pemphigus with infiltration of neutrophils and eosinophils in an ulcerative colitis patient. *Acta Derm Venereol* 2014. 査読有  
doi: 10.2340/00015555-1836.
9. Minagawa A, Koga H, Okuyama R. Vascular structures absence under dermoscopy in two cases of Angiosarcoma on the scalp. *Int J Dermatol* 2014. 査読有  
doi: 10.1111/ijd.12357.
10. Okada N, Okuyama R, Uhara H. Marked histiocytic infiltration in neonatal lupus erythematosus. *J Dermatol* 41: 192-193, 2014. 査読有  
doi: 10.1111/1346-8138.12381.
11. Ashida A, Murata H, Mikoshiba Y, Ohashi A, Kobayashi A, Koga H, Uhara H, Okuyama R. Successful treatment of rheumatoid vasculitis-associated skin ulcer with a TNF antagonist. *Int J Dermatol* 53: e154-156, 2014. 査読有  
doi:10.1111/j.1365-4632.2012.05529.x.
12. Ohashi A, Koga H, Hayashi K, Uhara H, Okuyama R. Usefulness of high-frequency sonography for the diagnosis of asymptomatic myopathy in Löfgren's syndrome. *Int J Dermatol* 53: e62-63, 2014. 査読有  
doi:10.1111/j.1365-4632.2012.05489.x.
13. Mikoshiba Y, Saiki M, Uhara H, Okuyama R. Unilateral pigmentary purpuric dermatosis associated with deep thrombosis. *Int J Dermatol* 53: e87-88, 2014. 査読有  
doi:10.1111/j.1365-4632.2012.05492.x.
14. Iwade M, Ogawa E, Koga H, Mizuno F, Koike K, Matsumoto K, Okuyama R. Generalised acanthosis nigricans in childhood with short stature associated with poor response to growth hormone provocation. *Acta Derm Venereol* 2014. 査読有  
doi: 10.2340/00015555-1759.
15. Uchiyama R, Uhara H, Uchiyama A, Ogawa E, Takazawa Y, Ashida A, Koga H, Hayashi K, Kiniwa Y, Okuyama R. 5-hydroxymethylcytosine as a useful marker to differentiate between malignant melanomas and benign melanocytic nevi. *J Dermatol Sci* 73: 161-163, 2014. 査読有  
doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.09.008.
16. 木庭幸子、奥山隆平 抗 CTLA-4 抗体 ( ipilimumab ) を用いたメラノーマ治療がん分子標的治療 12 1: 23-26 2014. 査読無
17. Sato Y, Uhara H, Ashida A, Okuyama R. Combination chemotherapy of carboplatin and paclitaxel for metastatic melanoma. *J Dermatol* 40: 1050-1051, 2013. 査読有  
doi: 10.1111/1346-8138.12306.
18. Sugiura K, Takeichi T, Ito Y, Kosho T, Uhara H, Okuyama R, Akiyama M. Lamellar ichthyosis in a collodion baby caused by CYP4F22 mutations in a non-consanguineous family outside the Mediterranean. *J Dermatol Sci* 72: 193-195, 2013. 査読有  
doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.06.008.
19. Mikoshiba A, Uhara H, Murata H, Okuyama R. Clinical effects of stereotactic radiation surgery in patients with metastatic melanoma. *J Dermatol* 40: 626-628, 2013. 査読有  
doi: 10.1111/1346-8138.12179.
20. Mikoshiba Y, Uhara H, Kubo H, Okuyama R. S-1 induced a durable response in metastatic extramammary Paget's disease. *J Dermatol* 40: 664-665, 2013. 査読有  
doi: 10.1111/1346-8138.12177.
21. Ohashi A, Hayashi K, Okuyama R. A case of azacitidine-induced maculopapular erythematous eruption. *J Dermatol* 40: 680-681, 2013. 査読有  
doi: 10.1111/1346-8138.12181.
22. Minagawa A, Koga H, Uhara H, Yoshiharu Yokokawa Okuyama R. Age-related prevalence of dermoscopic patterns in acquired melanocytic nevus on acral volar skin. *JAMA Dermatol* 149: 989-990, 2013. 査読有  
doi: 10.1001/jamadermatol.2013.4452.
23. Minagawa A, Koga H, Uhara H, Okuyama R. Dermoscopic characteristics of acquired melanocytic nevus in childhood affecting on acral region. *Acta Derm Venereol* 93: 751-752, 2013. 査読有  
doi: 10.2340/00015555-1587.
24. Ishikawa Y, Hosogane M, Okuyama R, Aoyama S, Onoyama I, Nakayama K, Nakayama K. Opposing functions of Fbxw7 in keratinocyte growth-differentiation and skin tumorigenesis mediated through negative regulation of c-Myc and Notch. *Oncogene* 32: 1921-1932, 2013. 査読有  
doi: 10.1038/onc.2012.213.
25. Yoshiya H, Okuyama R, Uhara H. Effectiveness of topical maxacalcitol

- for acquired perforating disorder. *J Am Acad Dermatol* 68: e181-2, 2013. 査読有  
doi: 10.1016/j.jaad.2012.10.044.
26. Ashida A, Kiniwa Y, Kobayashi A, Matsumoto K, Okuyama R. Low p53 positivity in verrucous skin lesion in diabetic neuropathy occurring on the dorsum of the foot. *Int J Dermatol* 52: 378-380, 2013. 査読有  
doi:10.1111/j.1365-4632.2011.04891.x.
27. Uhara H, Saiki M, Kawachi S, Ashida A, Oguchi S, Okuyama R. Clinical courses of drug-induced hypersensitivity syndrome treated without systemic corticosteroids. *J Eur Acad Derm Venereol* 27: 722-726, 2013. 査読有  
doi:10.1111/j.1468-3083.2012.04547.x.
28. Murata H, Ohashi A, Ashida A, Uhara H, Okuyama R, Nakata T, Shingu K. Fibrosarcoma variant of dermatofibrosarcoma protuberans with pancreatic metastasis. *Int J Dermatol* 53: e140-2, 2013. 査読有  
doi:10.1111/j.1365-4632.2012.05698.x.
29. Nakamura K, Okuyama R, Saida T, Uhara H. Platinum and anthracycline therapy for advanced cutaneous squamous cell carcinoma. *Int J Clin Oncol* 18: 506-9, 2013. 査読有  
doi: 10.1007/s10147-012-0411-y.
30. Kobayashi A, Uhara H, Kido K, Sekijima Y, Tojo K, Ikeda S, Okuyama R. Bullous formation in a patient with familiar amyloid polyneuropathy type I. *Int J Dermatol* 52: 1398-1400, 2013. 査読有  
doi:10.1111/j.1365-4632.2011.05146.x.
31. Ashida A, Murata H, Ohashi A, Ogawa E, Uhara H, Okuyama R. A case of hypocomplementemic urticarial vasculitis with a high serum level of rheumatoid factor. *Australas J Dermatol* 54: e62-e63, 2013. 査読有  
doi:10.1111/j.1440-0960.2011.00873.x.
32. 岡田なぎさ、木庭幸子、宇原久、奥山隆平 基底細胞癌における miRNA の意義 *日本臨床* 71 増刊号 4: 587-592 2013. 査読無
33. 奥山隆平、宇原久 悪性黒色腫とエピジェネティクス *日本臨床* 71 増刊号 4: 161-165 2013. 査読無
34. 奥山隆平、宇原久 Genome wide association study の知見 *日本臨床* 71 増刊号 4: 157-160 2013. 査読無
35. 木藤健治、宇原久、奥山隆平 転写因子 MITF の作用 *日本臨床* 71 増刊号 4: 149-153 2013. 査読無
36. 芦田敦子、木庭幸子、宇原久、奥山隆平 MAP キナーゼ: NRAS、BRAF、MEK *日本臨床* 71 増刊号 4: 126-129 2013. 査読無
37. 奥山隆平、宇原久 悪性黒色腫におけるエクスソームの意義 *日本臨床* 71 増刊号 4: 98-102 2013. 査読無
38. 上條史尚、木庭幸子、宇原久、奥山隆平 悪性黒色腫の循環腫瘍細胞 *日本臨床* 71 増刊号 4: 93-97 2013. 査読無
39. 小林彩、吉川美香、小川英作、奥山隆平 長野県における乾癬治療の現状と病診連携の可能性 *西日本皮膚科* 75: 346-349 2013. 査読無
40. Miyake T, Ogawa E, Mikoshiba A, Kobayashi A, Hosoe H, Kashiwabara S, Uhara H, Owada Y, Okuyama R. Epidermal-type FABP is a predictive marker of clinical response to systemic treatment and ultraviolet therapy in psoriatic skin lesions. *J Dermatol Sci* 68: 199-202, 2012. 査読有  
doi: 10.1016/j.jdermsci.2012.09.002.
41. Sugawara T, Nemoto K, Adachi Y, Yamano N, Tokuda N, Muto M, Okuyama R, Sakai S, Owada Y. Reduced size of sebaceous gland and altered sebum lipid composition in mice deficient in the fatty acid-binding protein 5 gene. *Exp Dermatol* 21: 543-6, 2012. 査読有  
doi:10.1111/j.1600-0625.2012.01514.x.
42. Ashida A, Uhara H, Kiniwa Y, Oguchi M, Murata H, Goto Y, Uchiyama A, Ogawa E, Hayashi K, Koga H, Okuyama R. Assessment of BRAF and KIT mutations in Japanese melanoma patients. *J Dermatol Sci* 66: 240-242, 2012. 査読有  
doi: 10.1016/j.jdermsci.2012.03.005.
43. Sakaizawa K, Goto Y, Kiniwa Y, Uchiyama A, Harada K, Shimada S, Saida T, Ferrone S, Takata M, Uhara H, Okuyama R. Mutation analysis of BRAF and KIT in circulating melanoma cells at the single cell level. *British J Cancer* 106: 939-946, 2012. 査読有  
doi: 10.1038/bjc.2012.12.
44. Kamiyo F, Uhara H, Kubo H, Nakanaga K, Hoshino Y, Ishii N, Okuyama R. A case of Mycobacterial skin disease caused by *Mycobacterium peregrinum*, and a review of cutaneous infection. *Case Rep Dermatol* 4: 76-79, 2012. 査読有  
doi: 10.1159/000337825.
45. Uhara H, Nakamura K, Mikoshiba Y, Miyake T, Okuyama R. Sweat test by water-erasable ink. *Acta Derm Venereol* 92: 432-433, 2012. 査読有  
doi: 10.2340/00015555-1300.
46. Hayashi K, Uhara H, Koga H, Okuyama R, Saida T. Surgical treatment of nail apparatus melanoma in situ: The use of artificial dermis in reconstruction. *Dermatol Surg* 38: 692-694, 2012. 査読有  
doi:10.1111/j.1524-4725.2011.02217.x.

47. Tanaka A, Goto Y, Iwade M, Uhara H, Okuyama R. Rapid progression of hidradenitis suppurative in the lower leg of a patient with psoriasis vulgaris. *Acta Derm Venereol* 92: 105-106, 2012. doi: 10.2340/00015555-1182. 査読有
48. Hanafusa T, Tamai K, Umegaki N, Yamaguchi Y, Fukuda S, Yaegashi N, Okuyama R, McGrath JA, Katayama I. Pregnancy and childbirth in three mothers with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Clin Exp Dermatol* 37: 10-14, 2012. 査読有 doi:10.1111/j.1365-2230.2011.04179.x.
49. Kiniwa Y, Ashida A, Ohashi A, Kitoh R, Fukuda S, Hashimoto T, Okuyama R. A case of epidermolysis bullosa acquisita associated with laryngeal stenosis. *Acta Derm Venereol* 92: 93-94, 2012. doi: 10.2340/00015555-1163. 査読有
50. Ohashi A, Kubo H, Iwade M, Shiohara J, Takata M, Uhara H, Okuyama R. Cutaneous angiosarcoma of the leg showing radiation sensitivity. *Australas J Dermatol* 53: e51-53, 2012. 査読有 doi:10.1111/j.1440-0960.2011.00746.x.
51. Ohashi A, Kubo H, Iwade M, Shiohara J, Takata M, Uhara H, Okuyama R. Cutaneous angiosarcoma of the leg showing radiation sensitivity. *Australas J Dermatol* 53: e51-53, 2012. 査読有 doi:10.1111/j.1440-0960.2011.00746.x.
52. 木庭幸子、奥山隆平 アトピー性皮膚炎 日本臨床 70: 555-560 2012. 査読無
53. Mikoshiya Y, Murata H, Ashida A, Saito N, Koga H, Uhara H, Okuyama R. Case of a cutaneous angiolipoma in the ear. *J Dermatol* 39: 808-809, 2012. 査読有 doi:10.1111/j.1346-8138.2011.01426.x.
54. Uhara H, Kamijo F, Okuyama R, Saida T. The open pores with plugs in porokeratosis clearly visualized with the dermoscopic furrow ink test: Report of 3 cases. *Arch Dermatol* 147: 866-868, 2011. 査読有 doi: 10.1001/archdermatol.2011.174.
55. Ohashi A, Saiki M, Okuyama R. Psoriasiform eruption localized to previously irradiated area. *Acta Derm Venereol* 91: 469, 2011. 査読有 doi: 10.2340/00015555-1058.
56. Kobayashi A, Uhara H, Ashida A, Kiniwa Y, Okuyama R. Thermal angioedema induced by hot water. *Acta Derm Venereol* 91: 343-344, 2011. 査読有 doi: 10.2340/00015555-1020.
57. Goto Y, Uhara H, Murata H, Koga H, Kosho T, Yamazaki M, Takata M, Okuyama R. Leg ulcers associated with positive lupus anticoagulant in two cases of Klinefelter's syndrome. *Acta Derm Venereol* 91: 90-91, 2011. 査読有 doi: 10.2340/00015555-0957.
58. Yoshikawa M, Uhara H, Arakura F, Murata H, Kubo H, Takata M, Yoshida K, Okuyama R. Calchiphylaxis with POEMS syndrome. *Acta Derm Venereol* 91: 98-99, 2011. 査読有 doi: 10.2340/00015555-0968.
59. Fujimura T, Sugawara M, Haga T, Kariya Y, Okuyama R, Tagami H, Aiba S. Malignant fibrous histiocytoma with in-transit metastasis. *Case Rep Dermatol* 3: 164-169, 2011. 査読有 doi: 10.1159/000331324.
60. Hirakawa S, Saito R, Ohara H, Okuyama R, Aiba S. Dual oxidase 1 (DUOX1) induced by Th2 cytokines promotes STAT6 phosphorylation via oxidative inactivation of PTP1B in human epidermal keratinocytes. *J Immunol* 186: 4762-4770, 2011. 査読有 doi: 10.4049/jimmunol.1000791.

〔学会発表〕(計 119 件)

1. Uchiyama R, Ogawa E, Kiniwa Y, Uhara H, Wong WF, Kofu K, Ikawa S, Satake M, Okuyama R. A regulation of keratinocyte differentiation and proliferation by transcription factors Runx1 and Runx3. *International Investigative Dermatology* 2013. Edinburgh, Scotland, May 8-11, 2013.

〔図書〕(計 3 件)

1. 秋山徹、奥山隆平、河府和義編:完全版 マウス・ラット 疾患モデル活用ハンドブック (羊土社). 1-604, 2011.

6. 研究組織

(1)研究代表者

奥山 隆平 (OKUYAMA, Ryuhei)

信州大学・医学部・教授

研究者番号: 80292332

研究者番号:

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

井川 俊太郎 (IKAWA, Shuntaro)

東北大学・加齢医学研究所・准教授

研究者番号: 50241576

佐竹 正延 (SATAKE, Masanobu)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号: 50178688