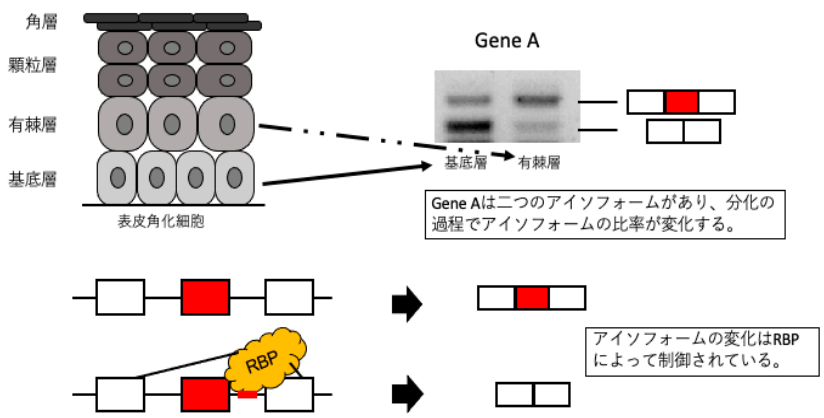
153　スプライシングが制御する表皮角化細胞分化機構の解明	高島　翔太

【目的】mRNA 前駆体（pre-mRNA）の選択的スプライシングは、単一遺伝子から多様なタンパク質を作り出す機構であり、限られた数の遺伝子からタンパク質発現の多様性を生み出すための最も重要な機構の一つである。複数のエクソンを有する遺伝子の、実に 95%以上が選択的スプライシングによる複数のアイソフォームを有しており、生物学的に非常に重要な役割を果たしていると考えられているが、皮膚組織における選択的スプライシングの役割はほとんどわかっていなかった。皮膚は体表面積の大半を占める人体最大かつ最外層に位置する臓器であり、体外からの刺激から体を守ると共に、体内からの水分喪失を防ぐなどの働きがある。表皮と真皮から構成されており、外層にあたる表皮は表皮角化細胞が基底層から徐々に押し上げられて有棘層、顆粒層、角層へと分化していく。著者らは先行研究において、表皮角化細胞の分化する過程で多くの選択的スプライシングイベントが起きており、それらは RNA binding protein の結合により制御されていることを明らかにしていた。本研究の目的は、選択的スプライシングが表皮角化細胞分化に及ぼす影響を解明すること、また RNA binding protein の関与を明らかにすることである。

【方法】1. 選択的スプライシングイベントの同定・解析と phenotype の確認：著者は先行研究において、表皮角化細胞の分化の前後における選択的スプライシングに大きな変化のある遺伝子、タンパクの情報をすでに取得しており、それらの validation を行った。またそれぞれのアイソフォームがどのような仕組みで表皮角化細胞の分化を誘導しているか、解析を行った。同定した選択的スプライシングの phenotype の確認にはアイソフォーム特異的ノックダウンを行い、分化に異常が生じるか確認した。ノックダウンには shRNA や siRNA といった RNA 干渉を用い、評価は Realtime PCR 法で行った。また 3 次元培養表皮を作製し、各種染色を行った。2. RNA binding protein の同定とノックダウン実験 : 著者らがすでに取得していた表皮角化細胞の分化に関与していると思われる RNA binding protein のノックダウン実験を行い、選択的スプライシングに変化が出るか、分化異常が生じるか、Realtime PCR 法や 3 次元培養表皮を用いて確認した。

【結果】1. 選択的スプライシングイベントの同定・解析と phenotype の確認 : *MAP3K7* 遺伝子において、分化の前後で exon12 が skip されていることがわかった。そこでアイソフォーム特異的なノックダウンを行い phenotype の解析を行ったところ、分化異常を生じることがわかった。3 次元培養表皮でも同様に分化異常が生じることがわかった。2. RNA binding protein の同定とノックダウン実験：FUS（RNA binding protein）を対象にノックダウン実験を行ったところ、選択的スプライシングイベントが増加した。また 3 次元培養表皮を作製したところ分化異常を認めた。

選択的スプライシングと RBP



153. スプライシングが制御する表皮角化細胞分化機構の解明

高島　翔太

北海道大学 大学院医学研究院 皮膚科学教室

Key words：表皮角化細胞，分化，選択的スプライシング，皮膚，RNA binding protein

緒　言

mRNA 前駆体（pre-mRNA）の選択的スプライシングは、単一遺伝子から多様なタンパク質を作り出す機構であり、限られた数の遺伝子からタンパク質発現の多様性を生み出すための最も重要な機構の一つである。複数のエクソンを有する遺伝子の、実に 95%以上が選択的スプライシングによる複数のアイソフォームを有しており、生物学的に非常に重要な役割を果たしていると考えられているが、皮膚組織における選択的スプライシングの役割はほとんどわかっていなかった。皮膚は体表面積の大半を占める人体最大かつ最外層に位置する臓器であり、体外からの刺激から体を守ると共に、体内からの水分喪失を防ぐなどの働きがある。表皮と真皮から構成されており、外層にあたる表皮は表皮角化細胞が基底層から徐々に押し上げられて有棘層、顆粒層、角層へと分化していく。著者らは先行研究において、表皮角化細胞の分化する過程で多くの選択的スプライシングイベントが起きており、それらは RNA binding protein の結合により制御されていることを明らかにしていた。皮膚の恒常性維持には選択的スプライシングが重要であり、その異常が皮膚分化異常を引き起こし、皮膚疾患の病態に関与していることが推測される。表皮角化細胞の分化異常が誘導された結果、表皮のバリア障害が引き起こされ、アトピー性皮膚炎や乾癬といった皮膚疾患の原因となっていることが知られており、分化を正常に保つことでそれらの皮膚疾患の治療法の開発につながることも期待される。

本研究では、表皮角化細胞の分化前後に多くの選択的スプライシングイベントが起きており、その中のいくつかの遺伝子について、アイソフォーム特異的なノックダウンを用いて解析を行ったところ、実際に分化異常を生じることを確認した。特定された選択的スプライシングイベントの標的エクソンの前後の motif 解析を行い、選択的スプライシングに関与していると思われる RNA binding protein を選定し、それらのノックダウン実験を行った。FUS という RNA binding protein のノックダウンによって選択的スプライシングイベントが増加し、また 3 次元培養表皮において分化異常が生じることを見出した。

本研究では、表皮角化細胞の分化前後には多くの選択的スプライシングが生じていること、またそれらを RNA binding protein の結合が制御していること、個々の遺伝子、タンパクにおいて phenotype を確認した。この成果はこれまでわかっていない皮膚疾患の病態解明につながると共に、治療ターゲットとなることが期待される［1］。

方法および結果

1. 選択的スプライシングイベントの同定・解析と phenotype の確認

表皮角化細胞の選択的スプライシングのリストの中から MAP3K7（Mitogen activator protein kinase kinase kinase 7）の選択的スプライシングイベントに焦点を当てて解析を行った。MAP3K7 は TGFb 活性化キナーゼ（TAK1）タンパクをコードしている。今回 MAP3K7 の選択的スプライシングイベントに着目した要因としては、MAP3K7 は表皮の発生においてすでに役割が知られていること［2］、MAP3K7 で同定されたスプライシングイベントは他の組織や生物で重要な生物学的意義を持つことが知られていること（マウスでは短い MAP3K7

のアイソフォームが欠失すると神経堤細胞の異常な増殖と口蓋裂の形成に関連していることが知られている、また上皮癌細胞株では、短いアイソフォームが上皮間葉転換（EMT）を促進し、長いアイソフォームがアポトーシスを促進する［3］)、最後に合計の MAP3K7 の mRN A の発現量が分化の前後で大きく変化しないことが知られていること、という点が挙げられた。

MAP3K7 は表皮角化細胞において 2 つのアイソフォームが存在している（図 1)。Exon12 を除くアイソフォームは MAP3K7-short、exon12 を含むアイソフォームは MAP3K7-long と称す。MAP3K7-short は *in vitro* および *in-vivo* で表皮角化細胞の分化前の状態でより優位に発現している。しかし、分化すると MAP3K7-long 優位な発現に切り替わることがわかった。RT-PCR 法を使用して、*in vitro* およびレーザーキャプチャーマイクロダイセクションを用いてこの現象を検証した。*In vitro* および *in vivo* において、分化前で MAP3K7-short の発現が豊富であり、また分化した表皮角化細胞で MAP3K7-long の発現が豊富である一貫したパターンを示した（図 2)。

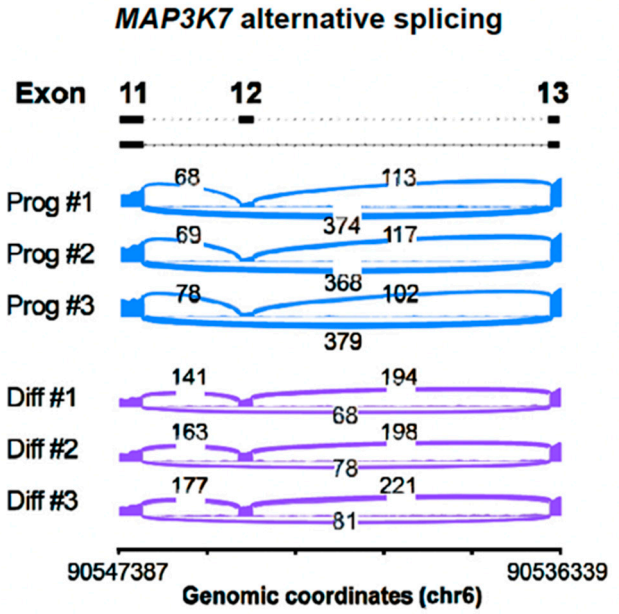


図 1. Sashimi plot の結果

MAP3K7 の分化前後を解析したところ分化前では exon12 を含まない MAP3K7-short が優位であり、分化後では exon12 を含む MAP3K7-long が優位であることがわかった。

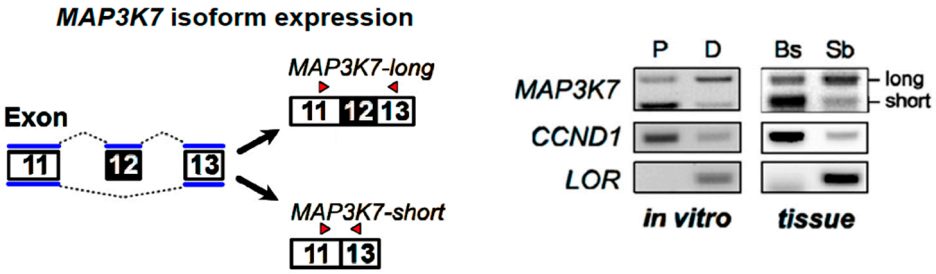


図 2. MAP3K7 のアイソフォームの確認

MAP3K7-short と MAP3K7-long の発現について、*in-vitro*、*in-vivo* で確認した。それぞれ赤矢頭で示したプライマーを用いて RT-PCR を行った。*In-vivo* にサンプルに関しては正常患者皮膚検体からレーザーキャプチャー-マイクロダイセクションを用いて抽出した。Bs：basal layer、Sb：Suprabasal layer。

次に MAP3K7 の各アイソフォームが表皮角化細胞の分化にどのような役割を持っているかを評価するために、各アイソフォームを特異的にノックダウンすることにした。MAP3K7-short をターゲットとするために、exon11-exon12 のジャンクションを跨ぐ短い siRNA を使用した。MAP3K7-long では exon12 をターゲットとする siRNA を使用した。各アイソフォームに特異的なプライマーを使用した RT-PCR では、ターゲットアイソフォームの優位な減少を示した。

MAP3K7 のタンパク質産物である TAK1 は、皮膚で NF-κb シグナリングを調整するが、この 2 つのアイソフォームが NF-κb 活性にどのような効果を持つかどうかはわかっていない。その疑問を検証するために、それぞれのアイソフォームのノックダウン後の表皮角化細胞で NF-κb 活性を測定した（p65 および pp65、IKKa/b、CCND1、CCNE1）。また NF-κb 経路を活性化するために TNFα 処理を行った。結果は、MAP3K7-long のノックダウンでは pp65 に影響を与えなかったが、MAP3K7-short のノックダウンでは pp65 が減少していた。同じパターンが下流の転写標的である CCND1 と CCNE1 でも観察された。一方で、リン酸化された IKKa/b はどちらの MAP3K7 アイソフォームのノックダウンでも抑制された。これらの実験より、MAP3K7-short と MAP3K7-long が表皮角化細胞で NF-κb シグナリングに異なる影響をあたえることが明らかになった（図 3）。

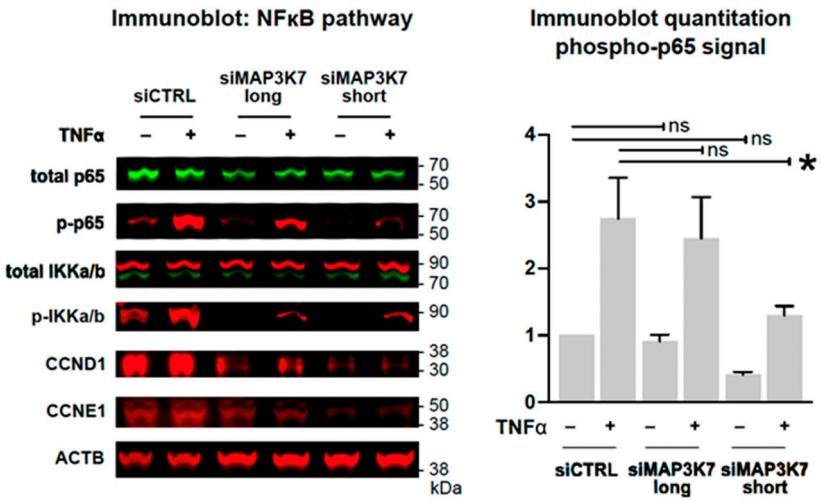


図 3. MAP3K7 short/long ノックダウンが及ぼす NF-κb 経路への影響

MAP3K7-long のノックダウンでは pp65 に影響を与えなかったが、MAP3K7-short のノックダウンでは pp65 が減少していた。同じパターンが下流の転写標的である CCND1 と CCNE1 でも観察された。

一方で、リン酸化された IKKa/b はどちらの MAP3K7 アイソフォームのノックダウンでも抑制された。*p＜0.05（one-way ANOVA with a Tukey's honestly significant difference post hoc test）。

NF-κb 経路は、表皮の恒常性維持、炎症、発癌に対して重要な役割を持っている。表皮が厚くなり、表皮角化細胞の過剰な増殖が特徴的な乾癬の皮膚では、NF-κb 経路が活性化している。MAP3K7 アイソフォームが表皮の分化に与える影響を評価するために、それぞれのアイソフォームをノックダウンした表皮角化細胞で 3 次元培養表皮を作製した。まず細胞増殖能の尺度として Ki-67 の免疫蛍光染色を行った。コントロール群と比較して MAP3K7-short ノックダウン群では Ki-67 陽性細胞がわずかに減少していた。一方で MAP3K7-long ノックダウン群では Ki-67 陽性細胞が増加し、層の高い位置の表皮角化細胞でも陽性となっていた。コントロール群では Ki-67 陽性細胞は基底層に限局しており、MAP3K7-long ノックダウン群での染色結果は、分化異常が生じていることを示唆していた。

次に表皮角化細胞の分化マーカーであるケラチン 10 の免疫蛍光染色を行った。MAP3K7-long のノックダウ

ン群ではケラチン 10 の発現が減少しており、分化が妨げられていることがわかった。それに対して、MAP3K7-short のノックダウン群では、ケラチン 10 の強度増加を示し分化を促進していることがわかった。MAP3K7 のそれぞれのアイソフォームお NF-κb 経路への影響がこれらの phenotype にどのように影響しているのかを確認するために、protein kinase C（PKC）で 2 時間処理した 1 日後に Ki-67 およびケラチン 10 の染色を行ったところ、MAP3K7-short ノックダウン群の Ki-67 陽性細胞の回復が観察された。また PKC 処理後の MAP3K7-short ノックダウン群では、ケラチン 10 の発現増加が抑えられた。

最後に 3 次元培養表皮から抽出した mRNA から分化関連遺伝子の発現を評価した。コントロール siRNA を基準として解析すると、未分化マーカー（CCNB1、BNC1、CYR61、CCND1）の発現減少と分化マーカー（KRT1、KRT10、LCE3D、FLG）の発現上昇を認めた（図 4）。

まとめると、MAP3K7-short は未分化状態を促進する機能を果たしていることを示していた。分化すると表皮角化細胞は MAP3K7-long 優位な発現に以降し、さらに分化を誘導する。これらの変化は少なくとも NF-κb の経路を介している可能性が示唆された。

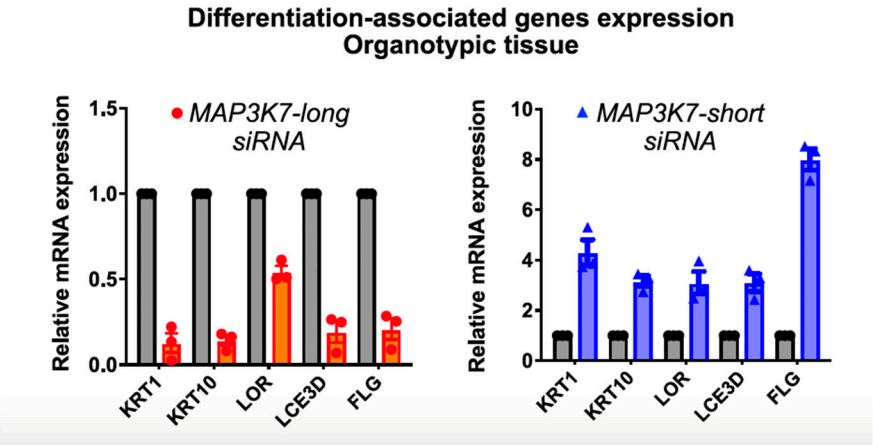


図 4. MAP3K7 short/long ノックダウン細胞で作製した 3 次元培養表皮での発現解析

MAP3K7 short/long それぞれのノックダウン細胞を用いて作製した 3 次元培養表皮から抽出した RNA を用いて分化マーカーの発現を評価した。MAP3K7-long ノックダウン群では分化マーカーの発現低下を認めたが、一方で MAP3K7-short ノックダウン群では分化マーカーの発現増加を認めた。

2. RNA binding protein の同定とノックダウン実験

RNA binding protein は pre-mRNA 上の調節配列に結合し、選択的スプライシングを仲介する。表皮角化細胞の選択的スプライシングに関与しうる RNA binding protein を特定するために、先行研究で 7 つの RNA binding protein を選択した。

これらの RNA binding protein が表皮角化細胞の分化に影響を与えうるかどうか、そのうちの一つである FUS に着目して検討した。FUS は表皮に発現しているが、その機能はこれまで十分に解析されていない。FUS をノックダウンした表皮角化細胞を用いて 3 次元培養表皮を作製し、Ki-67 の染色を行ったところ、コントロール群と比較して Ki-67 の発現が減少していた。またケラチン 10 の染色では、コントロールと比較してケラチン 10 の発現増加を認めた。

以上のことより抽出された RNA binding protein（FUS）によって選択的スプライシングが制御されており、結果として皮膚の分化の恒常性を維持していることがわかった。

考　察

mRNA の選択的スプライシングは、RNA およびタンパク質の機能の多様性を担っており、人間の発達や疾患において重要な役割を果たしている。これまで公開されているデータベースでは異なる組織や異なる発達時点における RNA およびタンパクの発現に関する詳細な情報が含まれているが、アイソフォーム特異的な発現データを見つけることは度々困難である。この研究では数千もの選択的スプライシングイベントが表皮角化細胞の分化に関与しており、恒常性維持に関連していることを示唆している。また、表皮角化細胞へのグルコース供給が、表皮分化を制御する遺伝子の選択的スプライシングに影響を与えることで、表皮の恒常性が障害されることも示されている。この事実は、代謝と皮膚機能を結ぶ機能的な仲介者としての選択的スプライシングの重要性を示唆している。

表皮でこれまで解析されていなかった選択的スプライシングの役割を探るために、MAP3K7 の二つの mRNA アイソフォームの表皮角化細胞分化における役割を見出した。表皮角化細胞の分化前には MAP3K7 short の発現が高く、分化した細胞では long のアイソフォームが高いことを明らかにした。

本研究では皮膚の恒常性維持には選択的スプライシングが重要な役割を果たしており、スプライシングの異常により皮膚の恒常性が損なわれ皮膚疾患を生じる可能性を示唆し、またそういった疾患の治療ターゲットとなりうることが期待される。

文　献

1) Takashima S, Sun W, Otten ABC, Cai P, Peng SI, Tong E, Bui J, Mai M, Amarbayar O, Cheng B, Odango RJ, Li Z, Qu K, Sun BK: Alternative mRNA splicing events and regulators in epidermal differentiation. Cell Rep. 2024 Mar 26; 43 (3) :113814. doi: 10.1016/j.celrep.2024.113814. Epub 2024 Feb 23. PMID: 38402585.

2) Omori, E., Matsumoto, K., Sanjo, H., Sato, S., Akira, S., Smart, R.C., and Ninomiya-Tsuji, J. TAK1 Is a Master Regulator of Epidermal Homeostasis Involving Skin Inflammation and Apoptosis. J. Biol. Chem. 2006 Jul 14, 281 (28): 19610–7. doi: 10.1074/jbc.M603384200. Epub 2006 May 4. PMID: 16675448.

3) Tripathi, V., Shin, J.-H., Stuelten, C.H., and Zhang, Y.E. TGF-β-induced alternative splicing of TAK1 promotes EMT and drug resistance. Oncogene, 2019 Apr;38 (17): 3185-200. doi: 10.1038/s41388-018-0655-8. Epub 2019 Jan 9. PMID: 30626936