

## 論 文 要 旨

区 分	①・乙	氏名	廣松 亮	
-----	-----	----	------	---

### NF- $\kappa$ B-regulated transcriptional control of CLCA in a differentiated mouse keratinocyte line

#### < 研究目的 >

CLCA は  $Ca^{2+}$  活性化  $Cl^{-}$  チャネルの調節因子として位置付けられ、腺上皮においては  $Cl^{-}$  の再吸収に関与するとされている。また、近年では CLCA のアイソフォームが重層扁平上皮に発現することが明らかになっており、それらが細胞接着や分化に関与しているとの報告も存在する。このように CLCA は組織特有の機能を有していると考えられるが、それらの遺伝子発現制御については詳しく解明されていない。本研究は、ケラチノサイトに発現するマウス CLCA2 (mCLCA2) の転写制御メカニズムを解明することを目的とした。

#### < 材料および方法 >

培養上皮細胞には、マウスケラチノサイト株 Pam212 を用いた。mCLCA2 転写活性の検討について、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。NF- $\kappa$ B p65 の標的 DNA への結合は、クロマチン免疫沈降 (ChIP) および ELISA 法を応用した転写因子アッセイによって検討した。発現については RT-PCR および蛍光免疫染色にて検討を行った。NF- $\kappa$ B の関与について検討を行うために、活性化を促す TNF- $\alpha$  と活性化を阻害するカフェ酸フェネチルエステル (CAPE) を用いた。マウス皮膚、ラット皮膚、ラットケラチノサイトと Pam212 細胞の 3 次元培養モデルを用いて CLCA2、K10、p65 の発現を免疫染色 (DAB) で検討した。

#### < 結果 >

① mCLCA2 遺伝子の近位プロモーター領域で最も高い転写活性が認められた。その転写活性は、NF- $\kappa$ B 結合配列の変異や p65 (RelA) のノックダウンによって、著しく減少した。② ChIP アッセイや転写因子アッセイによって、内在性の活性化 p65 と mCLCA2 プロモーター領域の NF- $\kappa$ B コンセンサス配列との間に特異的な結合が認められた。③ 蛍光免疫染色にて、一部の Pam212 細胞では非刺激下で NF- $\kappa$ B p65 の核内での局在が認められたことから、NF- $\kappa$ B p65 が恒常的に活性化している細胞が存在すると考えられた。④ TNF- $\alpha$  あるいは CAPE にて処理を行った場合、蛍光免疫染色において p65 の核内移行はそれぞれ促進あるいは阻害を認め、mCLCA2 の転写活性においても同様にそれぞれ上昇あるいは減少を示した。⑤ 培地中の  $Ca^{2+}$  濃度を 1.0 mM へ上昇させると、分化マーカーである keratin 1 (K1) と K10 の発現が増加し、それに伴い mCLCA2 の発現が mRNA レベルとタンパクレベルにおいて共に増加した。⑥ CAPE によって  $Ca^{2+}$  依存性の mCLCA2 発現は著しく抑制されたが、K1 と K10 の発現において変化は認められなかった。⑦ 免疫染色では、CLCA2 および K10 の発現を確認し、p65 が核内に局在している細胞が一部に認められ、in vitro の結果と類似した所見が認められた。

#### < 考察 >

mCLCA2 の発現は NF- $\kappa$ B の活性によって制御されており、 $Ca^{2+}$  による mCLCA2 発現の上昇には、NF- $\kappa$ B を介した制御とは異なる他の転写制御因子も関与していると考えられた。

#### < 結論 >

本研究では、マウスケラチノサイトにおいて、NF- $\kappa$ B の活性化が  $Ca^{2+}$  依存性の mCLCA2 発現に深く関与していることが明らかとなった。ケラチノサイトにおける CLCA の転写制御について、NF- $\kappa$ B と他の制御因子間の相互作用についてさらなる検討を行うことで、ケラチノサイトの分化プロセスに対する制御機構の解明へ展開する可能性がある。