

令和元年6月13日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08418

研究課題名(和文)皮膚・毛包形成におけるRas下流Raf/PI3K/RaIGEFシグナル経路の役割

研究課題名(英文)Elucidating the role of Ras downstream pathways in hair and skin development

研究代表者

市瀬 多恵子 (Ichise, Taeko)

琉球大学・医学部・委託非常勤講師

研究者番号：00396863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Rasは、MAPキナーゼ経路のみならず、PI3キナーゼ経路やRaIGEF経路などの他のシグナル伝達経路にもシグナルを伝達するが、それらの役割分担には不明な点が多い。本研究では、特定の下流シグナル経路のみを活性化するRasエフェクター変異体を表皮ケラチノサイト特異的に発現する遺伝子導入マウスを用いて、表皮の発生・分化におけるRas下流シグナル経路の機能分担についての解析を進めた。MAPキナーゼ経路を特異的に活性化するH-Rasエフェクター変異体に着目し、表皮ケラチノサイトの増殖・分化におけるRas-MAPキナーゼ経路の役割や意義を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において見出した、特定のRas下流シグナルが亢進している遺伝子導入マウスに認められる皮膚や体毛の異常は、RASシグナル関連遺伝子の変異によって引き起こされる、RASopathiesの患者に認められる特徴と類似している。本研究による知見は、形態形成におけるRas下流シグナルの意義を明らかにするのみならず、RASopathiesの新たな治療法の確立および遺伝子変異探索指針の策定にも貢献できると考えられる。また、発毛・育毛や表皮の恒常性維持など、QOLに関わる医学領域の発展にも寄与する成果である。

研究成果の概要(英文)：To determine how Ras effector pathways contribute to hair and skin development, we generated and utilized transgenic mouse models expressing H-Ras mutants after Cre recombination. We utilized effector mutant Ras proteins, each of which retains binding to a particular type of downstream effector proteins but not to others. H-RasT35S, H-RasE37G and H-RasY40C can activate Raf, RaIGDS and PI-3 kinase, respectively. The three mouse lines overexpressing the effector mutants in the epidermis could survive to adulthood and showed different phenotypes of epidermal keratinocytes. Epidermis-specific H-RasT35S-overexpressing mice showed significant thickening of both Krt5 (K5)-positive basal and Krt1 (K1)-positive suprabasal layers during postnatal development. This indicates that overexpressed H-RasS35 increases Ras-Erk signaling in epidermal keratinocytes, leading to Erk-dependent hyperproliferation of keratinocytes.

研究分野：発生生物学

キーワード：Ras MAPキナーゼ経路 PI3キナーゼ経路 RaIGEF経路 ケラチノサイト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

上流からのシグナルにより活性化した GTP 結合型 Ras は、他のタンパク質と結合することでシグナルのリレーを行う。代表的な下流シグナル経路として、Raf との結合による MAP キナーゼ経路、PI3 キナーゼサブユニットとの結合による PI3 キナーゼ経路、Ral GEF である Ral-GDS との結合による Ral 経路が知られる。

発癌性物質を用いた内在性 *Hras* 遺伝子の変異誘導や Cre/loxP 組換え依存的な恒常的活性化型 K-Ras の発現誘導による発癌実験を、Raf-1、B-Raf、Ral-GDS、PI3 キナーゼサブユニットなどのエフェクターの遺伝子欠損あるいは遺伝子変異の背景で行った実験では、腫瘍の数あるいはサイズの有意な減少が認められている。また、特定の下流シグナル経路を限定的かつ恒常的に活性化する 3 種類のエフェクター変異付加型 H-Ras^{V12} の発現について、Cre 組換えによって 8 通りの組み合わせをランダムに作出できる Tg マウスを用いて、癌の性状とエフェクター変異 Ras の発現状態との対応関係を検討した結果から、3 種類の下流シグナルが、発癌および癌浸潤の促進や抑制にそれぞれ特徴的な役割を果たしている可能性が示唆されている (Musteanu, 2012)。しかし、これらの研究は、癌化というエンドポイントとしての表現型と遺伝子型との関係性を明らかにしているものの、Ras 下流シグナルの具体的な役割についての知見を得るには至っていない。

われわれは、これまでに、癌化、発生および高次生命機能における Ras の重要性を、遺伝子改変マウスを用いて明らかにしてきた (Ise, 2000; Manabe, 2000; Nakamura, 2008; Ichise, 2010)。また、内皮細胞における Ras の役割に焦点を置き、Ras シグナルがリンパ管内皮細胞の挙動を決める重要なシグナルであることを、遺伝子改変マウスおよびマウス不死化リンパ管内皮細胞の解析によって明らかにした (Ichise, 2010; Ichise, 2012; Ichise, 2014)。そして、Ras 下流の MAP キナーゼシグナルが、リンパ管内皮細胞において内皮細胞特異的遺伝子の発現制御、および内皮・間葉移行の負の制御を担うことで、リンパ管内皮細胞の性質の維持に寄与していることを明らかにした (Ichise, 2012; Ichise, 2014)。

2. 研究の目的

Ras は MAP キナーゼ経路のみならず、PI3 キナーゼ経路や Ral GEF 経路などの他のシグナル伝達経路にもシグナルを伝達することがわかっているが、癌化や形態形成における Ras 下流シグナル伝達経路のそれぞれの役割については明らかになっていない。本研究では、特定の下流シグナル経路のみを活性化する Ras エフェクター変異体を表皮ケラチノサイト特異的に発現する遺伝子導入マウスを用いた。Ras 変異体の種類に特徴的な表皮形成や発毛での表現型異常に着目し、表皮および毛包の発生・分化における Ras 下流シグナル経路の機能分担や意義を明らかにすることを目的とした。

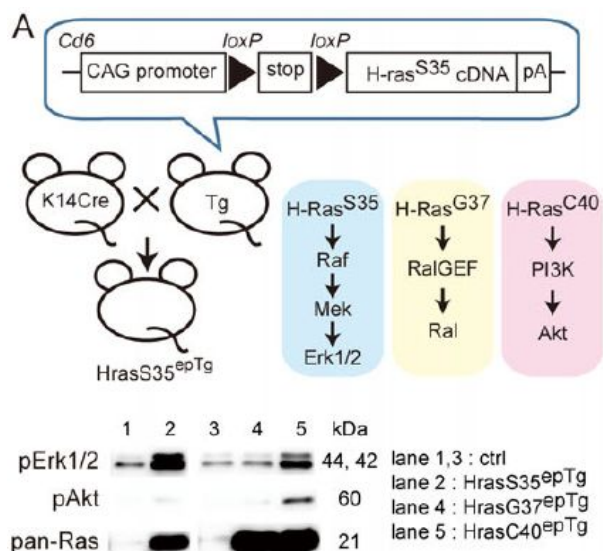
3. 研究の方法

表皮形成における Ras の役割を明らかにするために、エフェクター変異 Ras を Cre 組換えに依存してコンディショナルに発現する遺伝子導入マウスを作成した (右下図)。H-Ras エフェクター変異は、H-Ras^{S35} (T35S 変異、Erk1/2 MAPK 経路をドライブする)、H-Ras^{G37} (E37G 変異、RalGEF 経路をドライブする)、H-Ras^{C40} (Y40C 変異、PI3K 経路をドライブする)の 3 種類である。

Cre ドライバーとして、K14-Cre マウスを用い、胎生中期より出現する表皮のケラチノサイトに特異的な、エフェクター変異 Ras の過剰発現を誘導した。

皮膚の組織学的解析では、パラフィン切片の HE 染色、表皮の分化マーカー (Keratin ファミリー、Loricrin など) の免疫染色、増殖細胞の EdU 標識による評価などを行い、形態形成異常の定義付けを行った。

また、Ras エフェクター変異体を発現する 2 重 Tg マウスよりケラチノサイトを分離、培養し、各経路特異的な下流分子の活性化状態 (Erk1/2、Akt のリン酸化) をウエスタンブロッティングにより確認した。また、カルシウム添加による分化誘導時の未分化・分化マーカー遺伝子の発現レベルを、RT-qPCR によって解析した。



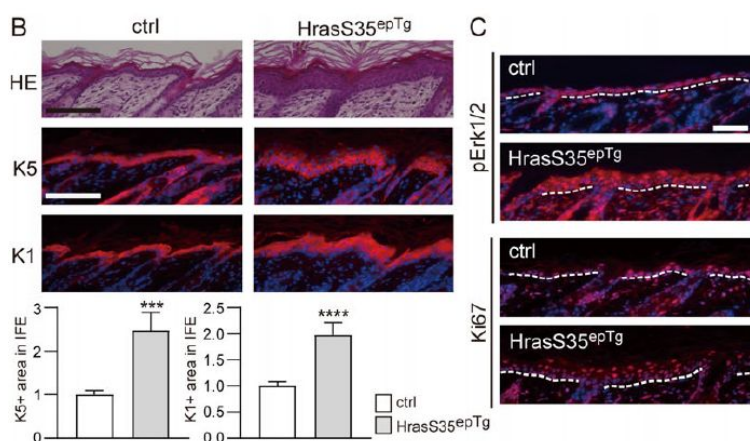
4. 研究成果

胎生中期より出現する表皮のケラチノサイトに、エフェクター変異 Ras を過剰に発現させたところ、エフェクター変異 Ras の種類に応じた下流シグナルの亢進が誘導された。そして、出

生時では見かけ上表皮は正常に形成されているが、生後の発育過程において表皮の肥厚、薄毛、縮毛など、エフェクター変異の種類によって異なる表現型が認められることを見出した。このことから、Ras 下流の 3 経路が体毛、毛包および毛包間表皮の形成においてそれぞれ特徴的な役割を果たしていることが強く示唆された。

薄毛、縮毛の原因を明らかにするために、毛包幹細胞マーカ―や毛包の分化マーカ―についての免疫組織化学的解析を行った。薄毛が見られた系統では、胎生期から出生時に至るまでの表皮層構造の分化には異常が認められなかったが、生後 1 週で K5 陽性の basal layer、および K1 陽性の suprabasal layer の肥厚が認められた (右下図、B)。Raf キナーゼ経路の下流に位置する MAP キナーゼ (Erk1/2) のリン酸化や、細胞増殖の指標となる Ki67 の発現を免疫染色で解析したところ、生後 8 日目の basal layer において、Erk1/2 のリン酸化、Ki67 の発現が対照マウスに比べ有意に亢進していた (右図、C)。この表皮の肥厚は、Erk MAP キナーゼの発現量を、*Erk1* および *Erk2* コンディショナルノックアウトアルルを用いて減少させることでレスキューされた。これらの結果から、Ras 下流シグナルのうち、Raf-Erk 経路の活性化が、表皮ケラチノサイトの増殖亢進および表皮の肥厚に中心的役割を果たしていることが明らかとなった。

表皮ケラチノサイトにおいて MAP キナーゼ経路を特異的に活性化する H-Ras^{S35} を発現する遺伝子導入マウス (以下、HrasS35^{epTg} と表記; 右下図) では、胎生期から出生時に至るまでの表皮層構造の分化には異常が認められなかったが、生後 1 週で K5 陽性の basal layer、および K1 陽性の suprabasal layer の肥厚が認められた (右下図、B)。Raf キナーゼ経路の下流に位置する MAP キナーゼ (Erk1/2) のリン酸化や、細胞増殖の指標となる Ki67 の発現を免疫染色で解析したところ、生後 8 日目の basal layer において、Erk1/2 のリン酸化、Ki67 の発現が対照マウスに比べ有意に亢進していた (右図、C)。この表皮の肥厚は、Erk MAP キナーゼの発現量を、*Erk1* および *Erk2* コンディショナルノックアウトアルルを用いて減少させることでレスキューされた。これらの結果から、Ras 下流シグナルのうち、Raf-Erk 経路の活性化が、表皮ケラチノサイトの増殖亢進および表皮の肥厚に中心的役割を果たしていることが明らかとなった。



HrasS35^{epTg} マウスよりケラチノサイトを分離、培養し、カルシウム添加による分化誘導時の未分化・分化マーカ―の遺伝子発現レベルを RT-qPCR によって解析した。HrasS35^{epTg} マウスのケラチノサイトでは、対照と比較して、カルシウム未添加時における未分化マーカ― (integrin- α 6, deltaNp63) の発現が上昇していること、カルシウム添加後の分化マーカ― (Krt1, involucrin, loricrin) の発現が減少していることが明らかになった。in vivo においても、生後 4 日目の basal layer において、対照マウスでは認められない、未分化マーカ―である P-cadherin および分化マーカ―である Krt1 の、共陽性の細胞が存在していた。これらの結果から、Ras 下流の MAP キナーゼ経路活性化による分化抑制も表皮肥厚の一因であることが示唆された。

さらに、HrasS35^{epTg} マウスに認められる、表皮ケラチノサイトの分化抑制傾向と細胞増殖の亢進を特徴とした異常を指標にして、表皮ケラチノサイトにおいて Ras により引き起こされるがん化シグナルを調節する分子を探索した。

ヒストンや転写因子などのリシン残基をアセチル化することでクロマチン構造の弛緩や転写活性化に寄与する CBP/p300 は、細胞増殖制御において Ras/MAP キナーゼ経路下流転写制御因子のコファクターとして機能することが知られている。しかし、HrasS35^{epTg} マウスと、CBP/p300 コンディショナルノックアウトマウスを交配し、CBP/p300 の発現量を減少させると、予想に反して HrasS35^{epTg} マウスにおける表皮の異常の増悪が引き起こされ、さらに皮膚乳頭腫様病変の形成が認められた。分子レベルでは、CBP/p300 の発現量減少により、EGFR-Raf-Erk シグナリングの亢進が引き起こされていた。CBP/p300 には、表皮ケラチノサイトにおける Ras 下流の Raf-Erk シグナリングの活性化を負に制御する作用があり、この制御の破綻が表皮ケラチノサイトのがん化を促進していることを見出した。以上の結果の一部は、Journal of Pathology 誌に掲載された。本報告書における挿入図の出典は、雑誌論文 1 (Ichise T, 2019) である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Ichise, T., Yoshida, N., Ichise, H. CBP/p300 antagonises EGFR-Ras-Erk signalling and suppresses increased Ras-Erk signalling-induced tumour formation in mice. *J Pathol.* 2019 Apr 6. DOI: 10.1002/path.5279. 査読有り
2. Ichise, H., Hori, A., Shiozawa, S., Kondo, S., Kanegae, Y., Saito, I., Ichise, T., Yoshida, N. Establishment of a tamoxifen-inducible Cre-driver mouse strain for widespread and temporal genetic modification in adult mice. *Exp Anim.* 65:231-244, 2016. DOI: 10.1538/expanim.15-0126. 査読有り
3. Ichise, H., Ichise, T., Yoshida, N. Phospholipase C γ 2 Is Required for Luminal Expansion of the Epididymal Duct during Postnatal Development in Mice. *PLoS One.* 11:e0150521, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0150521. 査読有り

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 市瀬 広武
CBP/p300 はマウス表皮ケラチノサイトの癌化を抑制する
第 77 回 日本癌学会学術総会、大阪国際会議場、2018.9.29 (大阪府大阪市)
2. 市瀬 広武、市瀬 多恵子、吉田 進昭
マウスでの標的遺伝子導入に適した permissive loci の探索
第 65 回 日本実験動物学会総会、富山県民会館、2018.5.16 (富山県富山市)
3. 市瀬 広武、市瀬 多恵子、吉田 進昭
PLC γ 2 はマウスにおいて生後の精巢上体管の管腔拡張に必須である
第 39 回 日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2016.12.1 (神奈川県横浜市)
4. 市瀬 多恵子、吉田 進昭、市瀬 広武
表皮形成における p300/CBP の役割
第 39 回 日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2016.12.1 (神奈川県横浜市)
5. 橋本 寛子、市瀬 多恵子、菊池 美緒、市瀬 広武、吉田 進昭
CRISPR/Cas9 を用いた GFP レポーターノックインマウスの作成と解析
第 28 回 高遠・分子細胞生物シンポジウム、高遠さくらホテル、2016.8.25-26 (長野県伊那市)
6. 橋本 寛子、市瀬 多恵子、菊池 美緒、市瀬 広武、吉田 進昭
CRISPR/Cas9 を用いた GFP レポーターノックインマウスの作成と解析
第 16 回 東京大学生命科学シンポジウム、東京大学駒場 I キャンパス 21 KOMCEE、2016.4.23 (東京都目黒区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：市瀬 広武

ローマ字氏名：ICHISE Hirotake

所属研究機関名：琉球大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：10313090

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。