

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09755

研究課題名(和文)細胞極性制御因子aPKCによる毛包幹細胞の休眠制御機構

研究課題名(英文)Regulatory mechanism of hair follicle stem cell quiescence by cell polarity protein aPKC

研究代表者

長田 真一 (OSADA, Shin-Ichi)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00244484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：表皮には細胞極性に関わる2種類のaPKC (atypical protein kinase C) 分子種 (aPKC $\delta$ , aPKC $\zeta$ ) が発現している。本研究で私たちは、創傷治癒と創傷後毛包新生という、皮膚恒常性の維持に関わる重要な過程に、これらのaPKC分子種がどのように関与しているのかを調べた。表皮特異的aPKC $\delta$ 欠損マウスでは創傷治癒が遅延し、Wnt経路の活性化を伴う創傷後毛包新生が亢進したが、aPKC $\zeta$ 欠損マウスではこのような現象は観察されなかった。本研究により、aPKC $\delta$ が創傷治癒と創傷後毛包新生を繋ぐ重要な分子であることが初めて明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The isoforms of atypical protein kinase C (aPKC), aPKC $\delta$  and aPKC $\zeta$ , regulate cell polarity and are expressed in the epidermis. Here, we addressed whether aPKCs are implicated in two major processes for maintaining epidermal homeostasis: cutaneous wound healing and wound-induced hair follicle neogenesis (WIHN). In epidermis-specific aPKC $\delta$ -knockout mice, wound healing was significantly retarded and WIHN was upregulated concomitantly with an increase in Wnt signaling. Conversely, wound healing and WIHN in aPKC $\zeta$ -null mice were comparable to those in control littermates. These results represent the first evidence that aPKC $\delta$ , but not aPKC $\zeta$ , is a key molecule linking cutaneous wound healing and WIHN.

研究分野：皮膚科学

キーワード：細胞極性 プロテインキナーゼC aPKC 創傷治癒 毛包幹細胞 毛包新生 細胞移動 Wnt経路

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の上皮細胞は、頂端側 (apical) -基底側 (basal) という極性 (apical-basal polarity) を持っている。この極性の形成には、タイトジャンクションに局在する進化的に保存された aPKC (atypical protein kinase C) - PAR (partition-defective) 複合体が重要な役割を果たしている。私たちは、付属器を含む皮膚の構築における細胞極性制御因子 aPKC (lamda, ラムダ) の役割を調べる目的で、表皮特異的に aPKC を欠損させたマウス (conditional knockout, cKO) を作製した。その解析の結果、aPKC cKO マウスでは、毛包幹細胞の休眠状態が破綻し、毛包幹細胞が徐々に枯渇するために進行性の脱毛をきたすことがわかった [1]。そこで次に、aPKC がどのように毛包幹細胞の休眠状態を制御しているのか、そのシグナル経路の解明が課題となった。

一方、創傷は毛包幹細胞を休眠状態から覚醒させる刺激といえる。毛包幹細胞は危急の事態に備えて通常は休眠状態にあるが、表皮が創傷を受けると、毛包幹細胞は創傷部に移動して表皮角化細胞に分化し、上皮化に関与する[2]。最近、創傷治癒後の毛包新生が器官再生の新しいモデルとして注目されている。マウス皮膚に、大きな傷 (1cm<sup>2</sup>以上) を作るとその治癒過程で、創傷中央部に Wnt 経路依存的に毛包が再生することがわかった [3]。表皮特異的に aPKC が欠損すると毛包幹細胞が徐々に枯渇することから、私たちは aPKC は創傷治癒、および創傷後毛包新生の鍵となる分子ではないかと考えるに至った。

## 2. 研究の目的

細胞極性制御因子 aPKC がどのようにして毛包幹細胞の休眠状態を制御し、皮膚の恒常性を維持しているのかを明らかにするために、本研究計画では以下の研究を行った。

- (1) マウス表皮に 2 種類ある aPKC 分子種、aPKC と aPKC (zeta, ゼータ) のダブル・ノックアウトマウス (dKO) を作製し、表皮における aPKC の機能の全貌を明らかにする。
- (2) aPKC の下流で働いている分子を網羅的にスクリーニングし、休眠状態の制御にかかわるシグナル経路を明らかにする。
- (3) 皮膚の恒常性維持の一側面である創傷治癒、および器官再生のモデルである創傷後毛包新生における aPKC の役割を調べる。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子改変マウス

表皮に発現している aPKC、aPKC の 2 種類の aPKC 分子種の役割を調べるために、各々の遺伝子欠損マウス (KO マウス) を解析に用いた。特に、aPKC 欠損マウスは胎生致死となるので、皮膚基底細胞に発現する ケラチン 5 のプロモーターの下流に Cre リコンビナーゼを繋いだ ケラチン 5-Cre マウスを用いて、表皮

特異的 aPKC 欠損マウス (aPKC cKO マウス) を作製した。各々のヘテロ欠損マウスをコントロールとして用いた。

### (2) 創傷治癒実験

7-8 週令のマウスの背中に 1.5cm 四方の傷を作り、定期的に治癒過程を観察した。

### (3) スクラッチ・アッセイ

生後直後の aPKC KO マウス、aPKC cKO マウス、およびコントロール・マウスから角化細胞を分離・培養し、コンフルエントに達したところでチップの先で傷をつけ、24 時間後、48 時間後に観察した。

### (4) 細胞遊走解析

スクラッチ・アッセイを行った細胞を固定後、アクチンを染色するファロイジン、および細胞突起のマーカーである -アクチニンに対する抗体で蛍光免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

### (5) 創傷後毛包新生

創傷後約 1 か月後に上皮化して癒痕となった部分を切り出し、20 mM EDTA 溶液中でインキュベート後、表皮部分と真皮部分を実体顕微鏡下で分離した。表皮部分は抗ケラチン 17 抗体で免疫組織染色を、真皮部分はアルカリ・フォスファターゼアッセイを行って新生した毛包を可視化し、定量した。

### (6) Wnt 経路の解析

上述のように分離した表皮部分から RNA を抽出し、逆転写反応を行って cDNA を作製した。作製した cDNA を用いて定量的 PCR 反応を行い、Wnt 経路の遺伝子の発現を解析した。また、ヒト表皮培養細胞 HaCaT 細胞を aPKC、aPKC それぞれに対する RNAi で処理してノックダウンし、同様の実験を行った。

## 4. 研究成果

(以下(1)-(3)は、「研究の目的」の(1)-(3)に対応)

### (1) aPKC と aPKC の表皮特異的ダブル・ノックアウトマウスの作製とその解析

aPKC KO マウスと aPKC cKO マウスを交配して、aPKC ・ dKO マウスを作製した。aPKC ・ dKO マウスは生後数時間で死亡することが判明した。

### (2) 毛包幹細胞の休眠状態の制御にかかわるシグナル経路の解明

生後23日目の休止期のコントロールマウス、およびaPKC cKOマウスの背側皮膚を採取し、RNAを抽出後cDNAを合成した。合成したcDNAをCy3, Cy5で蛍光ラベルし、マイクロアレイ解析を行い、cKOマウスで発現が2倍以上増減している遺伝子を網羅的に探索した。そのデータを基にパスウェイ解析を行った結果、2倍以上増減する遺伝子は、Focal Adhesion-PI3K- Akt-mTOR 経路、Chemokine

経路、Cell cycle経路、Hedgehog経路、Toll-like receptor経路、Delta-Notch経路、Wnt経路、MAPK経路、TGF経路などを構成する要素であることが判明した。

### (3)創傷治癒、毛包新生におけるaPKCの役割を調べる。

この研究課題を進める過程で、創傷治癒、および創傷後毛包新生における役割がaPKC分子種により異なることが判明したため、この研究課題に注力して研究を進めた。その結果以下の～の結果を得た。

#### aPKCは附属器を含む皮膚の形成に必須ではない。

表皮に発現しているaPKC分子種のうち、aPKCの表皮における役割はよくわかっていなかった。そこでaPKC KOマウスの表現型を詳しく調べたところ、aPKC cKOマウスと異なり、表皮、および付属器の形態形成に異常は見られず、aPKCは附属器を含む皮膚の形成において必須ではないことがわかった。

#### 表皮特異的aPKC欠損マウスでは創傷治癒が遅延する。

上述のように、aPKC cKOマウスでは、毛包幹細胞が徐々に枯渇する。創傷治癒時には、創傷周囲の毛包から毛包幹細胞が移動し、上皮化に関わることが報告されている。このことからaPKC cKOマウスでは、創傷治癒が遅延することが予想された。そこで、マウスの背側皮膚に1.5 cm x 1.5 cm大の傷を作り、創傷治癒過程を調べた。その結果、創傷後6日まではコントロールと差はなかったが、13日目ころから明らかにaPKC cKOマウスでは創傷治癒過程が遅れてきた。コントロールでは創傷後20日目頃に痂皮が脱落し、26日目頃にはほぼ上皮化した。aPKC cKOマウスでは痂皮の脱落、および上皮化が著しく遅延した。一方、aPKC KOマウスでは創傷治癒の遅延は見られず、コントロールと差はなかった。

#### aPKC cKOマウスでは痂皮収縮も異常をきたす。

通常、創傷は上皮化後痂皮となって収縮するが、aPKC cKOマウスでは、上皮化後半年以上経っても、収縮がほとんどみられなかった。痂皮収縮には真皮の線維芽細胞が主に関与するが、この結果から、表皮でaPKCが欠損すると、その下部の真皮に何らかの影響が及ぶことが示唆された。

#### aPKC欠損角化細胞ではスクラッチ・アッセイで創傷治癒が遅延する。

創傷治癒の遅延が角化細胞の異常によることを検証するために、aPKC欠損角化細胞、aPKC欠損角化細胞、およびコントロール角化細胞を用いてスクラッチ・アッセイを行った。その結果、コントロール、およびaPKC欠損角化細胞では48時間後にほぼギャップが埋められたの

に対し、aPKC欠損角化細胞ではほとんど埋められず、aPKC cKOマウスにおける創傷治癒の遅延は、角化細胞の異常によることがわかった。

#### aPKC欠損角化細胞では細胞増殖能が亢進している。

スクラッチ・アッセイにおけるaPKC欠損角化細胞の創傷治癒の遅延の理由として、細胞増殖の異常と創傷部への表皮細胞の移動の異常の2つの可能性が考えられる。そこでまず増殖能についてアラマブルー・アッセイで検討したところ、aPKC欠損角化細胞は、コントロールおよびaPKC欠損角化細胞よりむしろ増殖能が高いことがわかった。このことからスクラッチ・アッセイにおけるaPKC欠損角化細胞の移動障害は、増殖能の異常ではないことが判明した。

#### aPKC欠損角化細胞では細胞遊走能が異常をきたしている。

次に細胞遊走能について検討した。創傷治癒時、創傷近傍の角化細胞は、創傷の方向に細胞突起を出して移動する。そこで細胞突起のマーカーであるβ-アクチニンに対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。その結果、コントロール、およびaPKC欠損角化細胞を用いた実験では、創傷周囲の細胞は創傷の方向に向かって細胞突起を出して移動していくことがわかった。一方、aPKC欠損角化細胞では、細胞突起が形成される方向がランダムになっていた。このことから、aPKC cKOマウスで創傷治癒が遅延するのは、表皮角化細胞が極性を失い、創傷部に向かって正しく移動できなくなるためであると考えられた。

#### aPKC cKOマウスでは創傷後毛包新生が亢進する。

本研究で、通常の創傷治癒実験より大きな傷を作ったもう一つの理由は、創傷後毛包新生をみるためである。新生した毛包は、表皮側は抗ケラチン17抗体による免疫組織染色で、真皮側はアルカリ・フォスファターゼで可視化した。その結果、aPKC KOマウスでは、新生した毛包の数はコントロールと大きな差がなかったのに対し、aPKC cKOマウスでは新生毛包数がコントロールに比べ約2倍に増えていた。

#### aPKC cKOマウスにおける創傷後毛包新生はWnt経路を介する。

創傷後毛包新生はWnt経路の活性化で起こることが報告されている[3]。そこで、毛包新生が増加したaPKC cKOマウスの表皮で定量的PCR法によりWnt経路の構成因子の遺伝子発現を調べたところ、Wnt5a, Wnt10b, Axin2, Cyclin D1, Ctnnb1が上昇しており、aPKC cKOマウスにおける創傷後毛包新生はWnt経路の活性化を介することがわかった。

このことは培養細胞を用いた実験でも確認された。HaCaT細胞をaPKC特異的RNAiで処理すると、上述の遺伝子群の発現が上昇することがわかった。また、この遺伝子発現の上昇は

Wnt 経路の阻害剤である XAV939 で HaCaT 細胞を処理すると抑制されることがわかり、確かに Wnt 経路を介していることが証明された。

#### まとめ

以上より、2種類存在するaPKC分子種の機能は同等ではなく、創傷治癒、および創傷後毛包新生において主要な役割を担っているのはaPKC であることがわかった。この結果、表皮の恒常性維持における細胞極性因子aPKC分子種の機能的な差異を初めて明らかにすることができた。以上の結果は現在、英文の専門誌に投稿中である。

一方、aPKC・dKOマウスの解析、およびマイクロアレイ解析で明らかになったシグナル経路のさらなる研究は、今後の課題として残った。

#### 引用文献

Osada S, Minematsu N, Oda F, Akimoto K, Kawana S, Ohno S. Atypical protein kinase C isoform, aPKC, is essential for maintaining hair follicle stem cell quiescence. *J Invest Dermatol*, 135, 2015, 2584-92

Plikus M V., Gay DL, Treffeisen E, Wang A, June R, Cotsarelis G, et al. Epithelial stem cells and implications for wound repair. *Semin Cell Dev Biol*, 23, 2012, 946-53

Ito M, Yang Z, Andl T, Cui C, Kim N, Millar SE, et al. Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature*, 447, 2017, 316-20

#### 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9件)

男性型および女性型脱毛症診療ガイドライン作成委員会：眞鍋 求、坪井良治、板見 智、長田真一 他、男性型および女性型脱毛症診療ガイドライン 2017 年版、日皮会誌、査読有、127、2017、2763-277、<https://doi.org/10.14924/dermatol.127.2763>

Tomura Y, Osada SI, Akama T, Hasunuma N, Nakae H, Manabe M: Case of toxic shock syndrome triggered by negative-pressure wound therapy. *J Dermatol*, 査読有、44、2017、e315-e316、doi:10.1111/1346-8138.14014.

Toyoshima A, Osada SI, Umebayashi Y, Manabe M: Dermoscopic features of

dermatofibroma with overlying sebaceous hyperplasia. *J Dermatol*, 査読有、44、2017、548-549、doi:10.1111/1346-8138.13804.

Toyoshima A, Osada SI, Umebayashi Y, Manabe M: Mutually exclusive expression pattern of keratin markers for differentiation and proliferation in circumscribed palmar hypokeratosis. *Br J Dermatol*, 査読有、177、2017、e122-e124、doi: 10.1111/bjd.15407.

Ichiyama S, Matayoshi T, Kaneko T, Shimizu A, Osada SI, et al.: Successful multitarget therapy using prednisolone, mizoribine and tacrolimus for Henoch-Schönlein purpura nephritis in children. *J Dermatol*, 査読有、44、2017、e56-e57、doi: 10.1111/1346-8138.13614.

Ozaki S, Funasaka Y, Otsuka Y, Oyama S, Ito M, Osada SI, et al.: Melanotic malignant melanoma in oculocutaneous albinism type 4. *Acta Derm Venereol*, 査読有、97、2017、287-288、doi:10.2340/00015555-2489.

能登 舞 他、術中迅速診断を行った Meibom 腺癌の3例、皮膚臨床、査読有、58、2016、421-424、doi: 10.18888/J01266.2016208987.

Yamashita H, Ansai S, Ueno T, Osada SI, et al.: Bullous pemphigoid with IgG autoantibodies to BP180 C-terminal domain and desmocolin 3 associated with transverse colon cancer. *Eur J Dermatol*, 査読有、25、2015、515-6、doi: 10.1684/ejd.2015.2599.

Osada S, Minematsu N, Oda F, Akimoto K, Kawana S, Ohno S: Atypical protein kinase C isoform, aPKC, is essential for maintaining hair follicle stem cell quiescence. *J Invest Dermatol*, 査読有、135、2015、2584-92、doi: 10.1038/jid.2015.222.

(学会発表)(計10件)

SI Osada 他、Atypical protein kinase C isoform, aPKC, regulates directional cell migration during wound healing. 日本研究皮膚科学会第42回年次学術大会・総会、2017年

Noguchi N, Osada SI 他、Differential regulation of wound healing by atypical protein kinase C isoforms. 第31回表皮細胞研究会、2017年

SI Osada 他、A cell polarity protein , aPKC , regulates hair follicle regeneration after wounding . 第 10 回世界毛髪研究会議 (WCHR2017)、2017 年

SI Osada 他、Differential rules of atypical protein kinase C isoforms in wound healing . 第 47 回欧州研究皮膚科学会議、2017 年

長田真一、細胞極性因子による表皮恒常性の制御、第 32 回角化症研究会、2017 年

長田真一、これだけは知っておけ：らくらくマスター表皮細胞の超基本レベル知識 表皮肥厚の仕組み～シグナル伝達入門～、第 116 回日本皮膚科学会総会、2017 年

長田真一、皮膚悪性腫瘍モデルマウスの分子生物学と新規治療法、第 115 回日本皮膚科学会総会、2016 年

能登 舞 他、初回手術から 16 年経過後にリンパ節転移をきたした外陰部 Paget 病の 1 例、第 32 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会、2016 年、

長田真一 他、細胞極性蛋白質 aPKC は毛包幹細胞の休眠状態の維持に必要である、第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会、2015 年

長田真一 他、創傷治癒後毛包新生における細胞極性制御因子 aPKC の役割、分子皮膚科学フォーラム、2015 年

[ 図書 ] ( 計 1 件 )

S Osada SI、INTECH、Hair and Scalp Disorders、2017、29-45

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長田 真一 (OSADA, Shin-Ichi)  
秋田大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 00244484

### (2) 研究分担者

能登 舞 (NOTO, Mai)  
秋田大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 10738462

### (3) 連携研究者

廣瀬 智威 (HIROSE, Tomonori)  
横浜市立大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号: 10142027

### (4) 研究協力者

鈴木 倫子 (SUZUKI, Tomoko)  
加賀谷 昌美 (KAGAYA, Masami)