

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10227

研究課題名(和文) aPKC の機能的両義性による皮膚癌発生の分子機序

研究課題名(英文) Molecular mechanism of skin cancer development by functional ambiguity of aPKC  
lambda

研究代表者

眞鍋 求 (Manabe, Motomu)

秋田大学・医学系研究科・名誉教授

研究者番号：30138309

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)：細胞極性を司るプロテインキナーゼCファミリーの一つ、atypical protein kinase C (aPKC) を表皮特異的に欠損させたマウスで2段階化学発癌実験を行ったところ、遺伝的バックグラウンドにより、aPKC は有棘細胞癌の発症に対して正にも負にも働きうることが示唆された。一方、創傷治癒実験では、表皮特異的aPKC 欠損マウスではコントロールマウスに比べ創傷治癒が遅延し、それはaPKC が創傷治癒時の表皮細胞の遊走方向を制御するためであることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有棘細胞癌は年齢ともに増加する傾向があり、今後超高齢化社会を迎えるわが国では、有棘細胞癌患者がますます増加することが予想される。有棘細胞癌は表皮の細胞の極性の乱れを特徴とし、また創傷治癒過程の異常により有棘細胞癌が発生することも知られている。本研究では、細胞極性制御因子aPKC が、創傷治癒過程と有棘細胞癌の発症の双方において重要な役割を果たす分子であることを明らかにした。今後、aPKC の活性を制御することによって、創傷治癒を促進し、有棘細胞癌の発症を抑えることが可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Atypical protein kinase C (aPKC), a member of the protein kinase C family, regulates cell polarity. Two-step chemical carcinogenesis experiments in epidermis-specific aPKC-deficient mice revealed that aPKC can act positively or negatively on the development of squamous cell carcinoma, depending on the genetic background. On the other hand, in wound healing experiments, we have found that epidermis-specific aPKC-deficient mice showed delayed wound healing compared to control mice, and that aPKC regulates the direction of epidermal cell migration during wound healing.

研究分野：皮膚科学

キーワード：細胞極性 aPKC プロテインキナーゼC 有棘細胞癌 シグナル伝達 化学発癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

プロテインキナーゼC分子種の一つである atypical protein kinase C (aPKC) は、足場蛋白質である Par3、Par6 と複合体を形成し、上皮細胞の極性形成を制御している。最近になり、基底細胞癌で aPKC の発現が上昇していること、aPKC は転写因子 GLI を直接リン酸化し、活性化することによって基底細胞癌の増殖を促進することが明らかになり(文献) aPKC は基底細胞癌の治療薬のターゲットとして注目されている。

aPKC の皮膚での機能を明らかにするために、私たちは表皮基底細胞に発現する Keratin 5 のプロモーター下に Cre リコンビナーゼを組み込んだマウスを用いて、表皮細胞特異的に aPKC を欠損したマウス (aPKC cKO マウス) を作製して解析した。その結果、aPKC cKO マウスでは、毛包幹細胞が休眠状態を保てなくなるために毛包幹細胞が次第に枯渇していき、脱毛に至ることを見だし、「毛包幹細胞の制御」という aPKC の全く新しい機能を報告した(文献)。

その一方で私たちは、aPKC cKO マウスでは、コントロール・マウスに比べ、表皮が著しく肥厚していることにも気がついた(文献)。そこで、aPKC の欠損は発癌に結びつくかもしれない、と考え、マウスの背側皮膚に発癌イニシエーターとプロモーターを塗布する、2段階化学発癌の予備実験を行った。その結果、aPKC cKO マウスでは、良性のパピローマだけでなく、ケラトアカントーマ、有棘細胞癌が高頻度で発生することが判明した。以上の知見から、「aPKC は基底細胞癌では増殖を正に制御しているのに対し、有棘細胞癌では負に制御している」という作業仮説を立て、その検証を試みた。

### 2. 研究の目的

(1) 「aPKC は基底細胞癌では増殖を正に、有棘細胞癌では増殖を負に制御している」という作業仮説に基づき、本研究では、皮膚癌の種類により相反する作用を持つ、aPKC の機能的両義性の分子機序を解明する。

(2) aPKCには、aPKC (ゼータ)、およびaPKC (ラムダ)という2種類の分子種が存在する。両者の機能的な差異を明らかにする。

(3) 創傷治癒におけるaPKC とaPKC の役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 2段階化学発癌実験

生後 7-8 週齢のマウスの背中を脱毛後、発癌イニシエーターである DMBA [7,12-dimethylbenz(a)anthracene]を1回塗布(25nmol/匹)し、その後発癌プロモーターである TPA(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)を週2回(6.8nmol/匹・回)塗布した。

#### (2) 好発癌系 aPKC cKO マウスの作製

予備実験の結果から、C57BL/6 系統(黒ネズミ)マウスで2段階化学発癌実験を行うと、aPKC cKO マウスに腫瘍が形成されるまでに約半年間、TPA を塗布する必要があることがわかった。この種の発癌実験は、マウスの遺伝的バックグラウンドに左右されうる。そこで、バックグラウンドを好発癌系の FVB/N (白ネズミ)にした aPKC cKO マウスを作製し、化学発癌実験を行った。

#### (3) aPKC 欠損マウスの表現型の解析

aPKC 欠損マウス(aPKC KO マウス)は胎生致死とならなかったため、そのまま解析に用いた。文献と同じ方法で脱毛の有無、毛周期、毛包幹細胞マーカーの発現、毛包幹細胞の定量などを行った。

#### (4) 創傷治癒実験

7-8 週齢の aPKC KO マウス、および aPKC cKO マウスの背部に 1.5cm x 1.5cm 大の皮膚欠損創を作り、創傷治癒過程を観察した。経時的に創部をスケールと共に撮影し、ソフトウェア(NIH)を使用して創傷面積を定量化した。

#### (5) in vitro 創傷治癒アッセイ (scratch wound assay) と形態学的解析

aPKC KO マウス、および aPKC cKO マウスの新生児マウスから摘出した皮膚を、ディスパーゼ存在下で、4 で一晩処理した。表皮と真皮を分離した後、表皮を 0.25%トリプシン/EDTA 存在下で 37、15 分間処理し、表皮細胞を単細胞化した。12 ウェル培養プレートにタイプ I コラーゲンでコーティングしたカバースリップを入れ、1 ウェル当たり  $1 \times 10^5$  個の細胞を播種した。2 ~ 3 日でコンフルエントに達したところで増殖因子を除去した培地に置き換え、さらに 24 時間したところでイエローチップの先で傷を作った。創傷後 24、48 時間後にメタノールで固定し、0.5%クリスタルバイオレットで染色した。傷の埋まり具合は Image J ソフトウェアで定量化した。

#### (6) 創傷治癒時の細胞極性の解析

scratch wound assay 時の細胞突起、およびゴルジ体の再配向は、文献の方法に基づいて、

免疫細胞染色で検討した。免疫細胞染色の方法の詳細は文献 [4] に記載した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 「白ネズミ化」した表皮特異的aPKC 欠損マウスの作製

遺伝的バックグラウンドを変更するには、最低5世代を経ることが必要とされている。私たちは「黒ネズミ」と「白ネズミ」の交配を繰り返し、最終的に「白ネズミ化」したaPKC cKOマウスを得た。「黒ネズミ」のaPKC cKOマウスは、毛包幹細胞の減少により脱毛をきたすのが特徴である(文献 [4])。「白ネズミ化」したaPKC cKOマウスも「黒ネズミ」同様、進行性の脱毛をきたし、aPKC cKOは遺伝的バックグラウンドによらず毛包幹細胞の維持に必要なことがわかった。

##### (2) 「白ネズミ化」した aPKC cKO マウスにおける化学発癌実験

遺伝的バックグラウンドを好発癌系のFVB/N系統(白ネズミ)にしたaPKC cKOマウスを用いて、2段階化学発癌実験を行った。その結果、C57BL/6系統(黒ネズミ)で得られた結果とは逆に、白ネズミ化したaPKC cKOマウスでは有棘細胞癌はできにくくなっていた。同時期に、ドイツのグループから同様の結果が報告された(文献 [4])。このことは、遺伝的バックグラウンドにより、aPKC cKOは有棘細胞癌の発症に対して正にも負にも働きうることを示唆している。

##### (3) aPKC cKO マウスの表現型

aPKC cKOマウスはaPKC cKOマウスと異なり、正常に生まれて成長の遅れはなく、毛周期の異常や脱毛所見もみられなかった。毛包幹細胞マーカーの発現・局在は正常で、数の減少もなかった(文献 [4])。

##### (4) aPKC cKO マウスにおける創傷治癒の遅延

創傷治癒時には、傷周囲の毛包に存在する幹細胞や前駆細胞(progenitor cell)が創傷部に移動して、表皮細胞に分化し、再上皮化を促すことが知られている。aPKC cKOマウスでは、毛包幹細胞が徐々に枯渇するため、傷の周りの毛包から幹細胞が供給されず、創傷治癒が異常をきたすのではないかと考えた。

7-8週齢のマウスの背中中の皮膚に、1.5cm四方の皮膚欠損創を作り創傷治癒過程を観察した。コントロール・マウスでは痂皮の脱落と上皮化が、創傷後3週間までに完了したのに対し、aPKC cKOマウスでは、痂皮の脱落が遅れ、3週間を過ぎても上皮化が完了しなかった(図1)。創傷面積を計測すると、aPKC cKOマウスでは、コントロール・マウスに比べて約1.7倍、有意に大きかった。aPKC cKOマウスではコントロール・マウスと比べ治癒遅延はなく、瘢痕面積も変わらなかった(文献 [4])。

##### (5) aPKC 欠損角化細胞における細胞移動の異常

創傷治癒が遅れる原因としては、傷周囲の細胞の増殖異常と移動障害の2つの可能性が考えられる。aPKC cKOマウスの傷の周りの組織をBrdU(bromodeoxyuridine)で染色すると、コントロール・マウスよりも表皮のBrdU陽性細胞が有意に増加していた。また、変異マウスから表皮角化細胞を初代培養し、増殖能を調べたところ、aPKC 欠損角化細胞は、コントロール細胞に比し高い増殖能を示したが、aPKC 欠損角化細胞はコントロール細胞とほぼ差はなかった。以上より、aPKC cKOマウスで創傷治癒が遅延するのは、細胞増殖の異常によるものでないことがわかった。

次に細胞移動について検討した。初代培養した表皮角化細胞がコンフルエントに達したところで、ディッシュにチップで傷をつける創傷治癒実験(scratch wound assay)を行ったところ、コントロール細胞とaPKC 欠損角化細胞では傷の中央に向かって細胞が移動し、傷が埋まってくるのに対して、aPKC

欠損角化細胞では、細胞の移動が少なく、傷もほとんど埋まらなかった(図2)。傷が埋まった面積を測定したところ、aPKC 欠損角化細胞ではコントロール細胞の50%未満だったのに対し、aPKC 欠損角化細胞ではコントロール細胞と有意差はなかった(文献 [4])

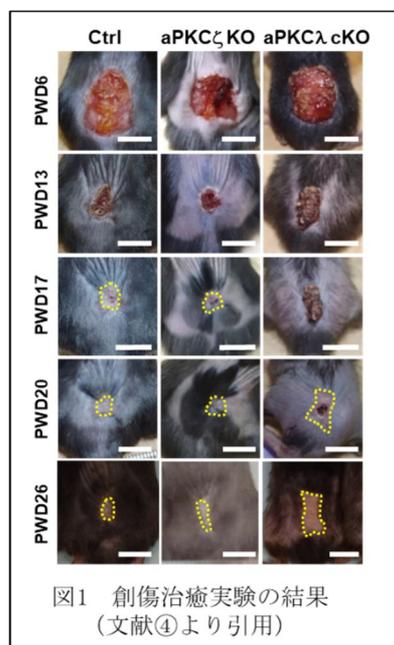


図1 創傷治癒実験の結果  
(文献[4]より引用)

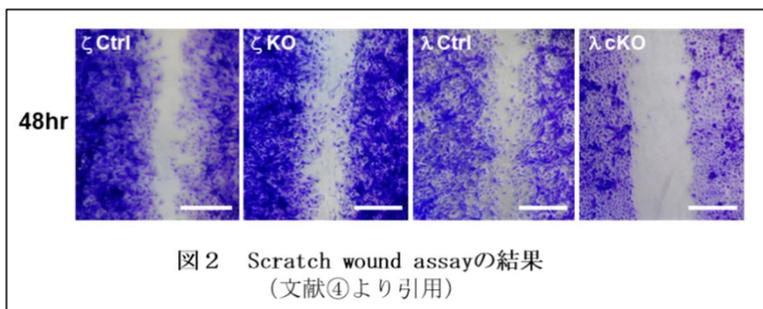


図2 Scratch wound assayの結果  
(文献[4]より引用)

( 6 ) aPKC 欠損角化細胞における細胞の伸展異常

aPKC 欠損角化細胞では、 tubulin ( 微小管 ) の伸長が障害されるために、細胞が十分に伸展せず、細胞面積がコントロール細胞に比べ小さくなっていた ( 文献 ) 。

( 7 ) aPKC による細胞突起の形成方向の制御

一般に創傷治癒時には、傷に接している細胞は、傷の方向に向かって突起を伸ばして移動していく。この時ゴルジ体も傷の方向に再配列する ( Golgi reorientation ) ことが知られている。aPKC 欠損角化細胞とコントロール細胞では、細胞突起は傷の方向に向かって形成されていたが、aPKC 欠損角化細胞では、細胞突起は傷の方向と関係なくランダムに形成されていた。さらに、aPKC 欠損角化細胞とコントロール細胞では、約 45% の細胞でゴルジ体の再配列がみられたのに対し、aPKC 欠損角化細胞では、その割合は約 12% にまで減少していた ( 文献 ) 。以上より、aPKC は創傷治癒時に、傷に向かって移動する細胞の細胞突起の形成方向を制御していることがわかった。

( 8 ) aPKC による aPKC-PAR 複合体の安定化

aPKC 欠損角化細胞では、aPKC と複合体を形成している Par6 の発現量が蛋白レベルで低下していた。一方、Par3 の発現量に変化はなかった。このことにより、aPKC が欠損することにより aPKC-PAR 複合体が不安定化し、極性が失われることが示唆された ( 文献 ) 。

( 9 ) まとめ

時間と労力をかけて作製した、白ネズミ化した aPKC cKO マウスで、当初予想した腫瘍形成の増進がみられず、当初の研究計画の変更を余儀なくされた。

一方で、aPKC が創傷治癒を制御する、という新しい知見を見出し報告した。

ラット培養アストロサイトを用いた *in vitro* の創傷治癒実験では、aPKC より aPKC が創傷治癒に重要と報告されていた ( 文献 ) 。しかし、実際の創傷治癒過程により近い、表皮角化細胞を用いた私たちの実験の結果から、aPKC よりむしろ aPKC が創傷治癒時の極性の制御に重要な役割を果たしていることがわかった。

aPKC は aPKC と異なり、毛包幹細胞の維持には関与していないことがわかった。

今後は、創傷治癒と発癌の関係を細胞極性の面から解析する研究を進める予定である。

引用文献

Atwood SX et al. G1I activation by atypical protein kinase C / regulates the growth of basal cell carcinomas. Nature 494: 484-488, 2013.

Osada SI et al. Atypical protein kinase C isoform, aPKC , is essential for maintaining hair follicle stem cell quiescence. J Invest Dermatol 2015; 135:2584-2592.

Etienne-Manneville S, Hall A: Cdc42 regulates GSK-3 and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. Nature 2003; 421:753-756.

Noguchi N et al.: Atypical protein kinase C isoforms differentially regulate directional keratinocyte migration during wound healing. J Dermatol Sci 2019; 93:101-108, 2019.

Vorhagen S et al.: Shared and independent functions of aPKC and Par3 in skin tumorigenesis. Oncogene 2018; 37:5136-5146.

Etienne-Manneville S, Hall A: Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKC . Cell 2001; 106:489-498.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mizusawa Y, Yamakawa T, Yamada K, Hasunuma N, Osada SI, Manabe M.	4. 巻 45
2. 論文標題 The cost burden of psoriasis treated with biologics in Akita prefecture	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Akita J Med	6. 最初と最後の頁 99-103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomura Y, Noto M, Yamada K, Hasunuma N, Osada SI, Manabe M	4. 巻 45
2. 論文標題 Skin grafting cases by negative pressure wound therapy for the treatment of skin tumors and intractable cutaneous ulcers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Akita J Med	6. 最初と最後の頁 105-111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada M, Kagaya M, Noguchi N, Ueki S, Hasunuma N, Osada SI, Manabe M.	4. 巻 92
2. 論文標題 Topical 3-bromopyruvate is a novel targeted therapy for melanoma in a preclinical model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci	6. 最初と最後の頁 134-142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jderm.2018.08.009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Noguchi N, Hirose T, Suzuki T, Kagaya M, Chida K, Ohno S, Manabe M, Osada S	4. 巻 93
2. 論文標題 Atypical protein kinase C isoforms differentially regulate directional keratinocyte migration during wound healing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci	6. 最初と最後の頁 101-108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jderm.2019.01.001.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Umezono Y, Sato Y, Noto M, Yamada K, Noguchi N, Hasunuma N, Osada SI, Manabe M	4. 巻 46
2. 論文標題 Incidence rate of cutaneous squamous cell carcinoma is rapidly increasing in Akita Prefecture: Urgent alert for super-aged society	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Dermatol	6. 最初と最後の頁 259-262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14759	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Noto M, Noguchi N, Ishimura A, Kiyonari H, Abe T, Suzuki T, Hasunuma N, Taira M, Manabe M, Osada SI	4. 巻 509
2. 論文標題 Sox13 is a novel early marker for hair follicle development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 862-868
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.12.163.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Shin-Ichi Osada, Natsuko Noguchi, Tomonori Hirose, Tomoko Suzuki, Masami Kagaya, Kazuhiro Chida, Shigeo Ohno and Motomu Manabe
2. 発表標題 Differential rules of atypical protein kinase C isoforms in wound healing
3. 学会等名 47th Annual European Society for Dermatological Research (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shin-Ichi Osada, Natsuko Noguchi, Tomonori Hirose, Tomoko Suzuki, Masami Kagaya, Kazuhiro Chida, Shigeo Ohno and Motomu Manabe
2. 発表標題 A cell polarity protein, aPKC, regulates hair follicle regeneration after wounding.
3. 学会等名 10th World Congress for Hair Research (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shin-Ichi Osada , Natsuko Noguchi , Tomonori Hirose , Tomoko Suzuki , Masami Kagaya , Kazuhiro Chida , Shigeo Ohno and Motomu Manabe
2. 発表標題 Atypical protein kinase C isoform , aPKC , regulates directional cell migration during wound healing
3. 学会等名 日本研究皮膚科学会第42回年次学術大会・総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Natsuko Noguchi , Shin-Ichi Osada , Tomonori Hirose , Tomoko Suzuki , Masami Kagaya , Kazuhiro Chida , Shigeo Ohno and Motomu Manabe
2. 発表標題 Differential Regulation of wound healing by atypical protein kinase C isoforms .
3. 学会等名 第31回表皮細胞研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 眞鍋 求
2. 発表標題 師の背中を追って：皮膚バリア研究からの長い旅路
3. 学会等名 日皮会東北六県合同地方会学術大会第386回例会（眞鍋 求教授 退官記念大会）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 眞鍋 求
2. 発表標題 皮膚バリア研究の自分史：師の背中を追って
3. 学会等名 第34回角化症研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Noto M, Noguchi N, Manabe M, Osada SI
2. 発表標題 Sox13 is a novel marker for hair follicle development and differentiation
3. 学会等名 49th Annunal European Society for Dermatological Research Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamada M, Kagaya M, Noguchi N, Osada SI, Manabe M
2. 発表標題 Topical 3-bromopyruvate is a novel targeted therapy for melanoma in preclinical model
3. 学会等名 日本研究皮膚科学会第44回年次学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考