

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08259

研究課題名(和文)紫外線皮膚障害と癌化におけるミトコンドリア分裂関連分子の機能解析

研究課題名(英文)The role of dynamin related protein 1 in UV-protection and carcinogenesis in epidermal keratinocytes

研究代表者

柳 輝希 (YANAGI, Teruki)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：50755973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア分裂および細胞死関連分子のDrp1欠損マウスを作成した。表皮特異的Drp1ノックアウトは、胎生致死などを示さず出生した。胎児期・出生後の皮膚障害は認められなかった。電子顕微鏡によるミトコンドリア形態の観察では、ミトコンドリアの一部変形を認めたが、基本的には正常であった。ノックアウトマウス皮膚は、紫外線による細胞死誘導は正常であった。長期紫外線照射によって、皮膚がん発生への影響を検討したところ、腫瘍の形成能が亢進していることが分かった。以上から、ミトコンドリア分裂因子Drp1欠損は表皮の発生・分化への影響は認められず、紫外線発癌を促進する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではミトコンドリアと表皮角化細胞の分化と発癌を中心に解析した。ミトコンドリア分裂因子Drp1欠損は表皮の発生・分化への影響は認められず、紫外線発癌を促進する可能性が示唆された。さらに、腫瘍細胞に対するDrp1のノックダウン実験では腫瘍細胞の増殖抑制作用が認められた。これらの結果はDrp1は表皮細胞の分化には直接には影響を与えないが、腫瘍を形成した場合には不可欠の分子になることが考えられた。これらの成果は、今まで十分に注目されてこなかったミトコンドリアと癌をターゲットとした新規治療戦略につながる可能性がある。

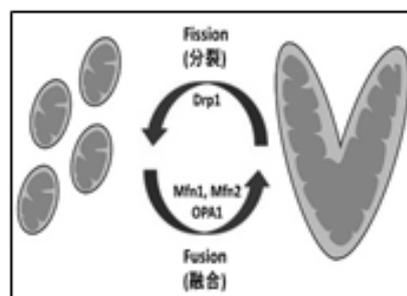
研究成果の概要(英文)：We investigated the function of Drp1 in normal epidermis/keratinocytes using epidermis-specific Drp1 knockout (EKO) mice. Epidermal development in the EKO mice were indistinguishable from those in the wild-type (WT) mice. Ultrastructural analysis and immunohistochemistry revealed that the mitochondria of keratinocytes in the EKO mice were neither elongated nor constricted. Drp1 knockdown did not diminish the cell growth of normal human keratinocytes. Both in vivo and in vitro, UVB-induced apoptosis in the EKO epidermis and keratinocytes did not differ from that in the WT mice. In chronic UVB-irradiation, the loss of Drp1 sensitized the epidermis to the development of skin tumors. Clinically, Drp1 is expressed more highly in sun-exposed skin than in non-exposed skin in individuals under age 40, but not in those over age 60. In conclusion, EKO mice demonstrate that Drp1 is dispensable for the development and apoptosis of the epidermis.

研究分野：皮膚腫瘍学

キーワード：ミトコンドリア 角化 有棘細胞癌 紫外線 細胞死 ノックアウトマウス

1. 研究開始当初の背景

世界的に高齢・長寿社会が形成されつつあり、皮膚科領域においては露光部における皮膚癌の発生が増加している。そのため、高齢者に生じる皮膚癌の予防や効果的な治療法の開発は喫緊の課題となっている。さて、ミトコンドリアは、酸素呼吸により細胞内のエネルギーをつくり出す細胞内小器官であり、アポトーシス・自然免疫応答など種々の細胞応答において多彩な機能を持つ。近年、ミトコンドリアの融合と分裂を担う GTP 加水分解酵素群が同定され、融合には Mfn1、Mfn2、OPA1、分裂には Drp1 が関与する。現在まで、紫外線皮膚障害・発癌におけるミトコンドリア分裂・融合分子の機能は不明であり、上記の中からミトコンドリア分裂関連分子 Drp1 に注目し、表皮細胞における生理的機能および紫外線皮膚障害・発癌への役割を解析する着想を得た。さらに渡地たちは、種々の皮膚癌における Drp1 の機能解析をおこなっており、皮膚有棘細胞癌において Drp1 が高発現していること、皮膚有棘細胞癌細胞株において Drp1 の発現を抑制すると癌細胞の増殖が抑制されること、を報告した(Kitamura, Yanagi et al. J Dermatol Sci 2017, Yanagi et al. Frontiers in Oncol 2018)。乳房外 Paget 病においても、表皮内癌部に比べて浸潤部もしくは転移部において、Drp1 発現が亢進していた (Kitamura, Yanagi et al. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2020)。一方、Drp1 の正常表皮における生理学的機能は解明されておらず、申請者らは表皮特異的 Drp1 ノックアウトマウスを解析した。



融合分子の機能は不明であり、上記の中からミトコンドリア分裂関連分子 Drp1 に注目し、表皮細胞における生理的機能および紫外線皮膚障害・発癌への役割を解析する着想を得た。さらに渡地たちは、種々の皮膚癌における Drp1 の機能解析をおこなっており、皮膚有棘細胞癌において Drp1 が高発現していること、皮膚有棘細胞癌細胞株において Drp1 の発現を抑制すると癌細胞の増殖が抑制されること、を報告した(Kitamura, Yanagi et al. J Dermatol Sci 2017, Yanagi et al. Frontiers in Oncol 2018)。乳房外 Paget 病においても、表皮内癌部に比べて浸潤部もしくは転移部において、Drp1 発現が亢進していた (Kitamura, Yanagi et al. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2020)。一方、Drp1 の正常表皮における生理学的機能は解明されておらず、申請者らは表皮特異的 Drp1 ノックアウトマウスを解析した。

2. 研究の目的

分子の生理学的機能を解析するためには遺伝子欠損マウス(ノックアウトマウス)での解析が有用であり、2009年に全身および神経特異的 Drp1 ノックアウトマウスが報告されたが、皮膚症状は観察できていない。本研究では、表皮特異的 Drp1 ノックアウトマウスを用いて紫外線による皮膚障害・発癌におけるミトコンドリア分裂関連分子 Drp1 の機能を解明した。

3. 研究の方法

(1) ノックアウトマウスへの UVB 照射と病理学的解析

紫外線の照射プロトコルは、以前に当教室から報告した方法で行う(Ando S, et al. Am J Pathol 2009)。UVB 照射時の皮膚炎の観察を行うとともに、長期に照射した場合の日光角化症・有棘細胞癌の発生を観察する。得られたマウスの皮膚に関して病理学的解析(HE 染色、p53、Ki-67、TUNEL)を実施する。

(2) 新生仔表皮の電子顕微鏡解析(ミトコンドリアの形態解析)

表皮特異的 Drp1 ノックアウトマウスについては光学顕微鏡での観察、Drp1 欠損によるミトコンドリア形態を解析するために電子顕微鏡による観察をおこなう。

(3) 初代培養表皮細胞を用いたミトコンドリア形態解析(電子顕微鏡)、ミトコンドリア機能解析(膜電位解析)、活性酸素量解析(MitoSOX)、紫外線照射時の細胞死解析(アポトーシス、マイトファジー)、細胞老化解析(SA-beta-gal)、細胞周期解析(DNA content analysis: FACS)を実施する。

(4) 紫外線照射前後の Drp1 ノックアウトマウス表皮・培養細胞 RNA を用いたマイクロアレイ解析

Drp1 欠損によって、紫外線照射時の遺伝子発現が変化している可能性を検証するため、マイクロアレイ解析をおこなう。剃毛したマウス皮膚に、UVB180mJ/cm² を照射し、パンチ生検を行い、表皮からタンパクおよび RNA を抽出し、Drp1 の発現量を観察する。2次元培養細胞においても UVB を照射し(40-100mJ/cm²)、RNA を回収する。遺伝子発現の網羅的解析のため、マイクロアレイ解析を実施する(イルミナ社)。

(5) Drp1 リン酸化酵素の同定

紫外線照射後のマウス生体表皮組織においても Drp1 のリン酸化を検討する(免疫染色、免疫ブロット法)。

(6) リン酸化 Drp1 の局在・機能解析

現在の仮説として、リン酸化された Drp1 は、BAX と結合してアポトーシス誘導に関与することを予想している。その仮説が誤っていた場合には、リン酸化 Drp1 の機能を解析するために、リ

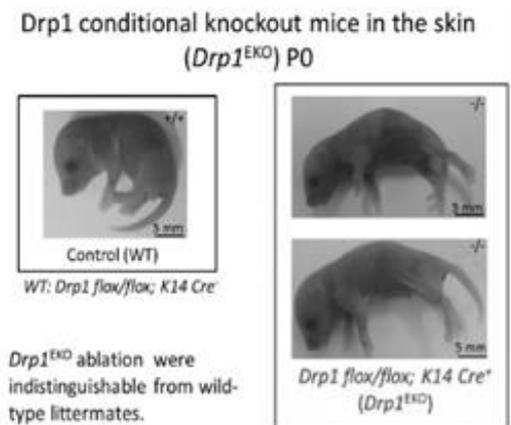
ン酸化 Drp1 の細胞内局在を解析する。さらにリン酸化 Drp1 が結合する分子を同定するために FLAG タグ付き phospho-mimic Drp1 発現ベクターを表皮細胞に遺伝子導入し、マスペクトル法にて結合する分子の同定を試みる。これまで Drp1 と p53 分子の結合、および Drp1 による p53 発現の正の制御が報告されており、それを含め再度検討を行う。

(7) ヒト臨床検体における、加齢と日光曝露を変数とした Drp1 発現解析
 老化とミトコンドリア機能低下の関連は強く示唆されており (Sun et al. Mol Cell 2016)、加齢や日光曝露を変数とした Drp1 発現およびリン酸化 Drp1 発現を免疫染色にて検討する。若年群 (20 歳以下)、老年群 (80 歳以上)、それぞれの露出部・非露出部に分けて検討する。
 以上 (1) - (7) の研究開発によって、Drp1 分子の表皮細胞での生理的機能に迫り、新規治療ターゲットとしての可能性を探索できる。

4. 研究成果

本研究では、ミトコンドリア分裂および細胞死関連分子の Drp1 表皮特異的欠損マウスを作製し、これを用いて各種解析をおこなった。

(1) K14-Cre マウスを用いた表皮特異的分裂因子 Drp1 ノックアウトは、胎生致死を示さず、正常に出生した。メンデルの法則にしたがって出生しており、また胎児期・出生後の皮膚障害は認められず、ミトコンドリアの分裂異常が細胞分裂に直接影響をあたえるかどうかについては明らかではなかった (右図)。



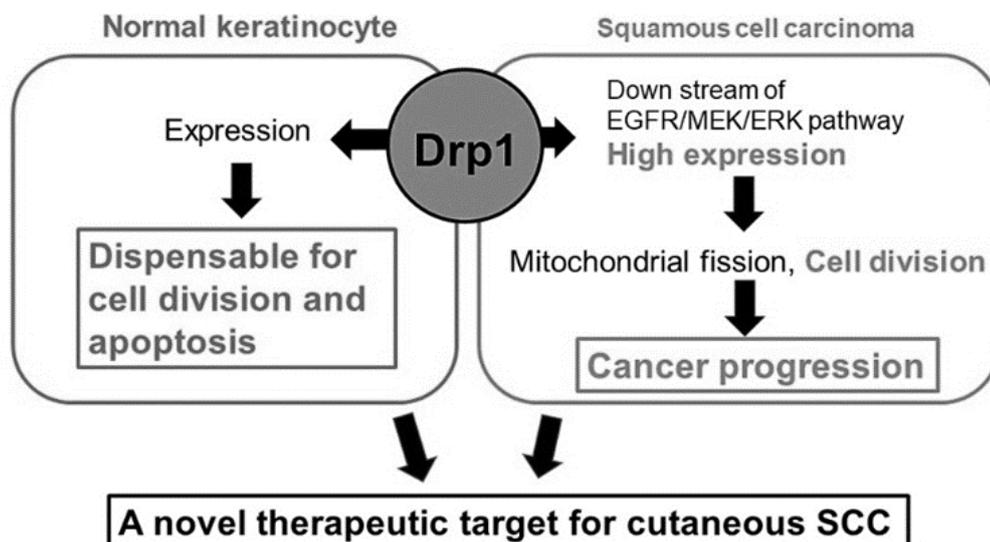
(2) 電子顕微鏡によるミトコンドリア形態の観察では、ミトコンドリアの一部変形を認めたが、基本的には正常であると考えられた。

(3) Drp1 ノックアウト皮膚においても、紫外線による細胞死誘導は正常であった (TUNEL 染色による評価)。

(4) 週に 2 度の UVB 照射を 40 週にわたって行う長期紫外線照射によって、皮膚がん発生への影響を検討したところ、Drp1 欠損皮膚では腫瘍の形成能が亢進していることが分かった。

(5) RNA 干渉による Drp1 ノックダウンは、正常ヒト表皮細胞の増殖を阻害しなかった。

結論：ミトコンドリア分裂因子 Drp1 欠損は表皮の発生・分化への影響は認められず、「Drp1 は正常表皮細胞において、不可欠な分子ではない」と考えられた。Drp1 の欠損は、紫外線発癌を促進する可能性が示唆された。さらに、皮膚有棘細胞癌 (Squamous cell carcinoma) では、癌細胞の生存に必須な分子と考えられた (下図)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kitamura S, Maeda T, Shimizu H, Yanagi T	4. 巻 -
2. 論文標題 Two successful auricle reconstructions: a simple wedge incision and a pull through transpositional flap	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dermatologic Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dth.13301	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 Mizukami T., Yanagi T., Kitamura S., Narahira A., Maeda T., Hata H., Takakuwa E., Doi K., Sugita S., Hasegawa T., Ikenaga H., Shimizu H.	4. 巻 34
2. 論文標題 A recurrent subcutaneous tumour of the thumb: a case of a capicua transcriptional repressor (CIC) rearranged sarcoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology	6. 最初と最後の頁 e59-e61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jdv.15910	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 Narahira A, Yanagi T, Kitamura S, Hata H, Shimizu H.	4. 巻 46
2. 論文標題 Dermoscopic features of genital pigmented Bowen's disease: Report of a case and review of the published work.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Dermatol	6. 最初と最後の頁 e390-e391
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 Yanagi T, Imafuku K, Kitamura S, Hata H, Shimizu H.	4. 巻 46
2. 論文標題 CDK16/PCTK1/PCTAIRE1 is highly expressed in melanomas but not in melanocytic nevi or sarcomas.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Dermatol	6. 最初と最後の頁 634-636
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 Kitamura S, Yanagi T, Maeda T, Imafuku K, Hata H, Masuzawa M, Shimizu H.	4. 巻 46
2. 論文標題 Evaluation of pazopanib cytotoxicity to normal vascular endothelial cells in vitro: A comment on Goto et al.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Dermatol.	6. 最初と最後の頁 e341-342
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 Yanagi T, Watanabe M, Hata H, Kitamura S, Imafuku K, Yanagi H, Homma A, Wang L, Takahashi H, Shimizu H, Hatakeyama S.	4. 巻 78
2. 論文標題 Loss of TRIM29 Alters Keratin Distribution to Promote Cell Invasion in Squamous Cell Carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Res	6. 最初と最後の頁 6795 - 6806
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-18-1495.	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 Kosumi H, Yanagi T, Maeda T, Sugai T, Imafuku K, Hata H, Shimizu H.	4. 巻 18
2. 論文標題 Horn-like tumour on the dorsal hand.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Lancet Infect Dis.	6. 最初と最後の頁 696
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/S1473-3099(18)30098-7.	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 Yanagi T, Kitamura S, Hata H.	4. 巻 8
2. 論文標題 Novel Therapeutic Targets in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Oncol.	6. 最初と最後の頁 79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2018.00079	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 Kitamura S., Yanagi T., Maeda T., Shimizu H.	4. 巻 34
2. 論文標題 Drp1 expression levels correlate with clinical stage in extramammary Paget ' s disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology	6. 最初と最後の頁 e510-e513
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdv.16422	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 Yanagi Teruki, Kitamura Shinya, Imafuku Keisuke, Suto Asuka, Maeda Takuya, Tanaka Shinya, Sesaki Hiromi, Abe Riichiro, Shimizu Hiroshi	4. 巻 99
2. 論文標題 Loss of dynamin-related protein 1 (Drp1) does not affect epidermal development or UVB-induced apoptosis but does accelerate UVB-induced carcinogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 109 ~ 118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2020.06.009	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 該当する

1. 著者名 Narahira Atsushi, Yanagi Teruki, Kitamura Shinya, Maeda Takuya, Hata Hiroo, Asano Takushi, Nozaki Ayako, Kato Tatsuya, Watari Hidemichi, Shimizu Hiroshi	4. 巻 59
2. 論文標題 Advanced malignant melanoma successfully treated with dacarbazine following anti PD 1/CTLA 4 treatment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e414-e416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ijd.14997	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 Mizukami T., Yanagi T., Kitamura S., Narahira A., Maeda T., Hata H., Takakuwa E., Doi K., Sugita S., Hasegawa T., Ikenaga H., Shimizu H.	4. 巻 34
2. 論文標題 A recurrent subcutaneous tumour of the thumb: a case of a capicua transcriptional repressor (CIC) rearranged sarcoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology	6. 最初と最後の頁 e59-e61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdv.15910	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 Kitamura Shinya, Maeda Takuya, Yanagi Teruki	4. 巻 531
2. 論文標題 Vandetanib inhibits cell growth in EGFR-expressing cutaneous squamous cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 396 ~ 401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.07.111	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 Maeda Takuya, Kitamura Shinya, Nishihara Hiroshi, Yanagi Teruki	4. 巻 39
2. 論文標題 Extramammary Paget ' s disease patient-derived xenografts harboring ERBB2 S310F mutation show sensitivity to HER2-targeted therapies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 5867 ~ 5875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-020-01404-x	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 Maeda T., Kitamura S., Yanagi T.	4. 巻 34
2. 論文標題 RANK RANKL signalling pathway contributes to disease progression in cutaneous angiosarcoma: a case report with an immunohistochemical review and in vitro experiments	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology	6. 最初と最後の頁 e834-e837
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdv.16714	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学皮膚科ホームページ
<https://www.derm-hokudai.jp/jp/>

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
研究 分 担 者	秦 洋郎 (HATA Hiroo) (90399915)	北海道大学・医学研究院・助教 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------