

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 9 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670529

研究課題名(和文)表皮の非対称細胞分裂と重層化を制御する上位シグナルの解明

研究課題名(英文)Regulation of asymmetric division and stratification of epidermal keratinocytes

## 研究代表者

大日 輝記(Dainichi, Teruki)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：20423543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：重層扁平上皮では、基底細胞の基底膜に対して垂直方向におこる非対称分裂が細胞の分化と上皮の重層化とを決定する。しかしながら、非対称分裂をつかさどる上位のシグナル分子は不明であった。我々はphosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) が上皮の非対称分裂に重要な分子であることを明らかにした。表皮の基底細胞において、細胞の上方の細胞接着刺激は、PI3-キナーゼ-PDK1 経路の活性化を介して細胞の非対称分裂を促進し、表皮の分化と重層化とを支配すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The differentiation of the epidermis begins with the stem cells located within the basal layer, and asymmetric cell division (ACD) promotes cell differentiation and organizes the stratified epithelium. However, both the molecular cues that trigger organization of the apical complex during ACD and the signaling pathways that drive activation of apical complex components remain to be defined. We generated mice lacking PDK1 in keratinocytes (PDK1CKO), which display severe defects in epithelial differentiation and stratification resulting in perinatal lethality. ACD in epidermis from PDK1CKO was significantly decreased. Cell-cell contact stimuli induce production of PIP3 at the apical side of basal cells. PDK1 recruits and activates atypical protein kinase C (aPKC). Thus PDK1 regulates both activation and spatial organization of key signaling pathways in response to apical cues acting on basal progenitor cells in developing epidermis.

研究分野：表皮生物学

キーワード：非対称細胞分裂

## 1. 研究開始当初の背景

重層扁平上皮は、上皮細胞が基底層から上方へと移動しつつ分化することで形成される。基底膜直上の前駆細胞は基底膜を離れると同時に分化する。この現象を basal-to-suprabasal switch と呼ぶ。この際に、一つの前駆細胞から分化段階の異なる二つの娘細胞へと分裂する「非対称細胞分裂」が起きている。

微小環境から基底細胞に作用する外的刺激には、成長因子と、細胞間または細胞外マトリックスからの接着分子刺激とがある。一方で、細胞の極性や非対称分裂には、AKT, GSK3, 非定型プロテインキナーゼ C (aPKC) などのプロテインキナーゼが関与する。外的刺激とこれらのキナーゼとを結ぶ候補分子が phosphoinositide-dependent kinase 1 (PKD1) である。PKD1 は PI3 キナーゼによって活性化し、代謝や細胞周期を制御する。しかし、PKD1 欠損動物は胎生死を起こすため、非対称細胞分裂や上皮形成における機能は全く分かっていなかった。

## 2. 研究の目的

我々は表皮特異的 PKD1 欠損マウスを作成した。表皮特異的 PKD1 欠損マウスでは、表皮の重層化もケラチノサイトの分化も起こらず、生まれてすぐ死に至る(未発表)。本研究の目的は、PKD1 が、表皮のなりたちをどのように制御するか、その仕組みを明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

胎生期および生直後の表皮特異的 PKD1 欠損マウスの表皮形成について、形態学的評価、分化に関わる遺伝子発現の定量、非対称分裂の定量、非対称分裂に関与する分子の分

布の評価を行った。また、初代培養 PKD1 欠損ケラチノサイトのカルシウムによる分化および分化に関わるシグナルを遺伝子発現、タンパク発現およびシグナル分子の活性化で評価した。

## 4. 研究成果

PKD1 欠損表皮では、表皮の重層化が起こらず、表皮厚が低下した。また、ケラチン 10, インボルクリン、ロリクリンなどの各種細胞分化マーカーの発現が著しく低下した。また、分化誘導因子である Notch の発現も低下していた。表皮特異的 PKD1 欠損マウスでは表皮のバリア機能が低下し、生後 24 時間以内に死亡した。以上より、PKD1 は、表皮の分化および重層化に必須の分子であることが明らかになった。

PKD1 欠損表皮の異常の機序を明らかにするため、胎生期の PKD1 欠損表皮の基底細胞における非対称分裂を、基底膜に対する分裂軸の方向で定量的に評価した。PKD1 欠損基底細胞では、基底膜に対して垂直方向に起こる非対称分裂が有意に低下していた。一方、基底膜に対して水平方向に起こる対称分裂の分裂軸は保たれていた。次いで、野生型基底細胞の分裂終期における PKD1 の分布を蛍光抗体法で評価した。PKD1 は上方の娘細胞に有意に高発現していた。以上より、PKD1 は基底細胞の非対称分裂を制御しており、PKD1 欠損表皮の異常は非対称分裂が起こらないことに起因することが示唆された。

PKD1 は PI3-キナーゼの下流で活性化するキナーゼであり、基底細胞でこの経路を活性化する分子は E-カドヘリンと考えられた。活性化型 PKD1 や、その下流のキナーゼである活性化型 AKT は、表皮の細胞接着部位に局在していた。また、PKD1 欠損表皮ではこれらの局在がみられなかった。一方、PI3-

キナーゼの産生物である PIP3 は、野生型基底細胞でも PDK1 欠損基底細胞でも、細胞の上方の細胞接着部位で産生されていた。PDK1 の下流のキナーゼであり、非対称対称分裂の制御分子である aPKC は、基底細胞の上方に分布し、apical complex を形成する。PDK1 欠損表皮では、この aPKC の局在も apical complex の形成も起こらなかった。以上より、表皮で PI3-キナーゼ-PDK1 経路を活性化させるのは細胞接着刺激であり、基底細胞では細胞の上方でこの経路が活性化していることが示唆された。

我々は PDK1 欠損ケラチノサイトの初代培養で分化異常を解析した。初代培養ケラチノサイトは培地のカルシウム濃度を低カルシウムから高カルシウムに上げることで、カルシウム依存性の細胞接着を促進し、分化を誘導できる。PDK1 欠損細胞ではこのカルシウムによる分化誘導が全く起こらず、Notch の発現誘導も起こらなかった。さらに、シグナル分子の活性化を評価したところ、PDK1 欠損ケラチノサイトでは、上位のキナーゼである PI3-キナーゼの活性化は損なわれない一方で、下位のキナーゼである AKT や aPKC の活性化はほとんど誘導されなかった。恒常的活性化型 AKT の強制発現では PDK1 欠損ケラチノサイトの分化異常を回復させることはできなかった。Notch は非対称分裂の下流で細胞の分化に機能する。活性化型 Notch の強制発現によって、PDK1 欠損ケラチノサイトの分化異常が部分的に回復した。以上より、PDK1 は、aPKC などの下位のキナーゼによる非対称分裂の制御を介して、Notch に依存する細胞分化を誘導することが示された。

## 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 7 件)

- 1 Usui S, Otsuka A, Kaku Y, Dainichi T, Kabashima K. Pyoderma gangrenosum of the penis possibly associated with pazopanib treatment. *J Eur Acad Dermatol Venereol* (2015).
- 2 Grinberg-Bleyer Y, Dainichi T, Oh H, Heise N, Klein U, Schmid RM, Hayden MS, Ghosh S. Cutting Edge: NF-kappaB p65 and c-Rel Control Epidermal Development and Immune Homeostasis in the Skin. *J Immunol* 194, 2472-6 (2015).
- 3 Usui S, Dainichi T, Kitoh A, Miyachi Y, Kabashima K. Janeway Lesions and Splinter Hemorrhages in a Patient With Eosinophilic Endomyocarditis. *JAMA Dermatol* (2015).
- 4 Nakamizo S, Egawa G, Tomura M, Sakai S, Tsuchiya S, Kitoh A, Honda T, Otsuka A, Nakajima S, Dainichi T, Tanizaki H, Mitsuyama M, Sugimoto Y, Kawai K, Yoshikai Y, Miyachi Y, Kabashima K. Dermal Vgamma4(+) gammadelta T Cells Possess a Migratory Potency to the Draining Lymph Nodes and Modulate CD8(+) T-Cell Activity through TNF-alpha Production. *J Invest Dermatol* 135, 1007-15 (2015).
- 5 Dainichi T, Toda K, Kabashima K, Miyachi Y. Transient prominent elevation of circulating thymus and activation-regulated chemokine/CCL17 after food-induced anaphylaxis. *J Dermatol* 41, 561-2 (2014).
- 6 De A, Dainichi T, Rathinam CV, Ghosh S. The deubiquitinase activity of A20 is dispensable for NF-kappaB signaling. *EMBO Rep* 15, 775-83 (2014).

- 7 Kogame T, Dainichi T, Shimomura Y, Tanioka M, Kabashima K, Miyachi Y. Palmoplantar keratosis in oculodentodigital dysplasia with a GJA1 point mutation out of the C-terminal region of connexin 43. *J Dermatol* 41, 1095-7 (2014).

[学会発表](計 2 件)

- 1) Dainichi T, Hayden MS, Miyachi Y, Kabashima K, Ghosh S. Molecular cues for asymmetric cell division in epidermis. Japanese Society for Investigative Dermatology Annual Meeting 2014. 2014年12月12日、吹田市、大阪府
- 2) Dainichi T, Hayden MS, Miyachi Y, Kabashima K, Ghosh S. Apical Cues Induce Asymmetric Division of Epidermal Basal Cells through PIP<sub>3</sub>-PDK1 Pathway. Society for Investigative Dermatology 2014 Annual Meeting, Concurrent Oral Presentation. May 7-10, 2014, Albuquerque, NM, USA

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

大日 輝記 (DAINICHI, Teruki)  
京都大学大学院・医学研究科・講師  
研究者番号：20423543

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

本田 哲也 (HONDA, Tetsuya)  
京都大学大学院・医学研究科・准教授  
研究者番号：40452338