

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09775

研究課題名(和文) 低分子量G蛋白質Rap2の皮膚創傷治癒における機能解析

研究課題名(英文) Analysis of Rap2 function in skin wound healing

研究代表者

武居 公子 (Takei, Kimiko)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90325861

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： Rap2はRasの類縁分子であり、3つのサブタイプ(Rap2A, Rap2B, Rap2C)を持つ。マウスケラチノサイト細胞株であるPam212細胞では、Rap2が細胞間接着部位に発現しており、Rap2の発現を欠く娘細胞株では細胞間接着が緩く疎なコロニーを形成する。Rap2発現を抑制したPam212細胞では集団遊走が促進した。マウス表皮ではRap2B, Rap2Cが主要なサブタイプであった。Rap2Bノックアウト(KO)マウスと野生型同胞では創傷治癒に有意差はなかった。Rap2C KOマウスでは、受傷3日目のみ創縮小が有意に遅延した。Rap2は創傷治癒に機能する可能性がある。

研究成果の概要(英文)： Rap2 is a Ras-like small G protein, but its specific signaling functions are distinct from those of Ras. Rap2A, Rap2B and Rap2C belong to Rap2 subfamily. Rap2 is expressed in Pam212, a mouse keratinocyte cell line. Pam212 cells forms squamous cell carcinoma in mice, but the cells are non-metastatic. In contrast, metastatic derivatives of Pam212 cells expressed extremely low levels of Rap2. They formed looser colonies than that of Pam212. RNAi-mediated suppression of Rap2 expression in Pam212 cells resulted in accelerated "cohort migration" in an in vitro "wound-healing assay" under HGF stimulation. Rap2B and Rap2C were major subtypes in mouse epidermis. We have generated Rap2 KO mice, and studied the roles of Rap2 on cutaneous wound healing. No significant difference was observed in in vivo wound healing assay of Rap2B KO mice, however, significant delay was observed in that of Rap2C KO mice at day3 after injury. Rap2 may function in cutaneous wound healing.

研究分野：皮膚科学

キーワード：Rap2 創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

Rap2 は、癌遺伝子 ras の産物である Ras の類縁体であり、Rap2A, Rap2B, Rap2C の3つのサブタイプをもつ。皮膚における Rap2 の機能の詳細は不明である。

マウス由来ケラチノサイト細胞株 Pam212 は、ヌードマウス皮下に接種すると有棘細胞癌原発巣を形成し、稀に転移巣を形成する。この転移巣より得られた高転移性娘株 (LY, LU 細胞) は、培養下では Pam212 細胞より細胞同士の接着が緩く、疎なコロニーを形成する (図1、2)。

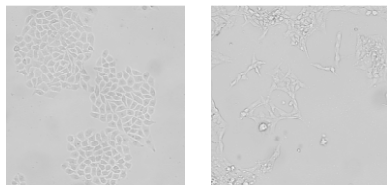


図1 Pam212細胞 図2 LY-1細胞

申請者らは、これらのモデル細胞株を用いた有棘細胞癌の研究過程で、Pam212 細胞では Rap2A, B, C 蛋白質のうち、Rap2B が強く発現しており、細胞間接着部位に局在していることをあきらかにした (図3)。

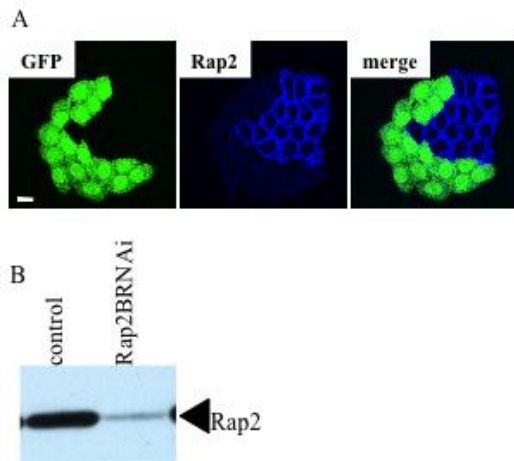


図3 Pam212細胞でのRap2局在と発現抑制。
A 免疫染色。
B Western 解析。
Bar=10µm

更に、高転移性娘株では Rap2 の発現が著減していた(図4)。

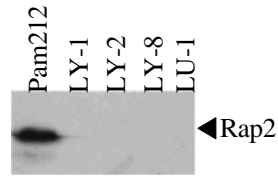


図4 Pam212と娘株でのRap2発現

これらのことから、Rap2 はケラチノサイトの細胞間接着維持・形成に関与していると考えた。

また、Rap2 発現を欠く娘細胞株では、HGF (hepatocyte growth factor) 刺激による ERK (extracellular signal-reacting kinase) リン酸化が増強していた (図5)。



図5 HGF処理によるERKリン酸化

加えて、Pam212 細胞の Rap2B を発現抑制すると、野生型 (Wild type) 細胞よりも集団遊走が促進した (図6)。

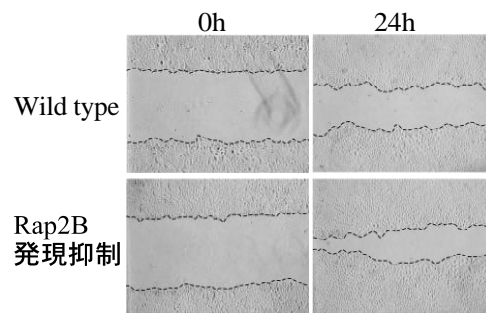


図6 Rap2発現抑制による集団遊走の促進

これらの結果から、Rap2B はケラチノサイトの増殖を制限し、細胞遊走を抑制することにより、創傷治癒の適正な進行を調整していると考えられた。更に、我々は Rap2 が特異

的エフェクターである TNIK、MINK との相互作用を介して JNK pathway の活性化や細胞骨格を制御する事を明らかにしている (文献 1、2)。これらはいずれも皮膚の創傷治癒には重要な機構であるため、Rap2 は創傷治癒に機能する可能性が強いと考えた。

しかしながら、Pam212 細胞は不死化した細胞株であるため、皮膚の生理的機能を解析するモデルとしては限界がある。そこで、Rap2 のノックアウト (KO) マウスを用いて、Rap2 の創傷治癒過程への関与の解析を試みた。

2. 研究の目的

皮膚創傷治癒における Rap2 の働きを KO マウスを用いた解析で明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) マウス表皮における Rap2 発現解析

C57BL/6J オスマウス (8~12 週齢) の背部皮膚を剃毛し、皮膚を採取した。採取した皮膚片を細切し、10mM EDTA / PBS で 56°C、5 分処理した後、表皮を剥離した。剥離表皮は skin lysis buffer [10mM Tris-HCl, (pH7.4), 5mM EDTA, 100mM NaCl, 1% Triton X-100, 1x protease inhibitor] 中で氷上で超音波破碎した。サンプルを 12,000 回転、20 分、4°C 条件で遠心し、上清を 95°C、5 分処理して SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) で泳動し、Western 解析に供した。

C57BL/6J オスマウス (8~12 週齢) の背部皮膚を剃毛し、皮膚を採取した。ホルマリン固定後にパラフィン封埋し、4µm に薄切、スライドガラスにマウントし、十分に乾燥させた後に抗 Rap2 抗体を用いた免疫染色、およびマウス Rap2B 特異的プローブを用いた in situ hybridization を行った。

(2) KO マウス皮膚の創傷治癒解析

オス Rap2B KO マウス 5 匹とオス野生型同胞 5 匹、オス Rap2C KO マウス 6 匹とオス野生型同胞 7 匹をもちいて、麻酔下に背部皮膚を剃毛し、4mm トレパンにて創傷を作成した。受傷当日を 0 日とし、治癒まで連日創傷を観

察、撮影し、Image J を用いたデジタルデータの解析により創縮小速度を解析し、統計解析には t 検定を行った。

4. 研究成果

(1) Rap2A KO マウス、Rap2B KO マウス、Rap2C KO マウス、野生型マウスの表皮における Rap2 蛋白の発現を抗 Rap2 抗体を用いた Western 解析で検討した。Rap2 は蛋白質のカルボキシル末端 (C 末端) の脂質修飾の違いにより、SDS-PAGE での泳動度が異なる事が明らかになっており、Rap2A、Rap2C は Rap2B よりもバンドが上方にシフトする (文献 3)。Rap2A KO の表皮では、Western 解析で検出される Rap2 のバンドは野生型と同様だが、Rap2B KO では上方のバンドのみ、Rap2C KO では下方のバンドのみが検出されているので、マウス表皮における Rap2 の主要なサブタイプとしては、Rap2B と Rap2C が発現していると考えた (図 7)。

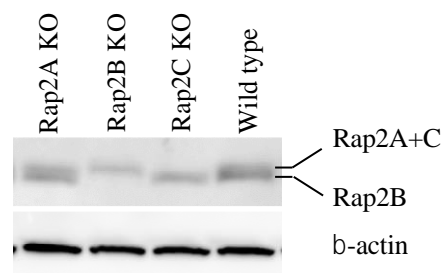


図7 マウス表皮におけるRap2発現

次いで、マウス皮膚における Rap2 発現の免疫組織学的検討を行った。Rap2 はマウス表皮に発現していた (図 8)。

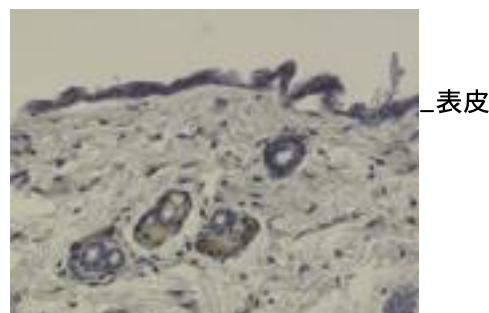


図8 マウス皮膚のRap2免疫染色

マウス表皮での Rap2B 発現を確認するため

に、マウス Rap2B 特異的プローブを用いた *in situ hybridization* 解析を行った。Rap2B はマウス表皮に実際に発現していた (図 9)。

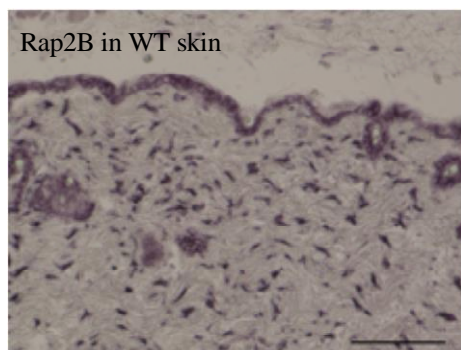


図9 マウス皮膚におけるRap2B発現
Bar=100μm

マウス表皮での Rap2B 発現が確認できたので、Rap2B KO マウスでの創傷治癒速度を解析した。培養細胞での実験から、Rap2B KO マウスの創傷治癒は促進すると考えていたが、野生型同胞と比較して有意な差はなかった (図 10)。

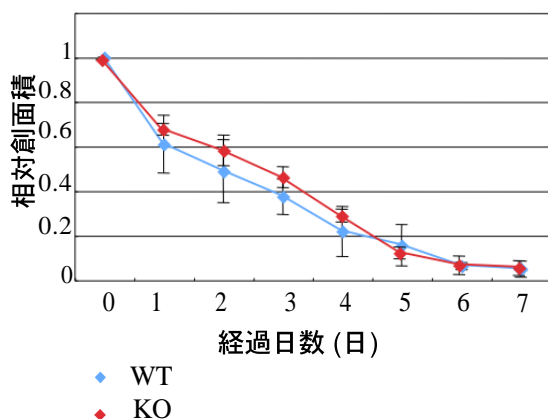


図10 Rap2B KO マウス皮膚創傷治癒解析

Rap2B KO と野生型同胞の創傷治癒に有意差が出ない理由として、同様に表皮に発現しているサブタイプである Rap2C が機能補完しているのではないかと考えた。そこで、Rap2C KO マウスでも同様に創傷治癒速度を解析した。3 日目のみ、有意に KO の創面積が大きかった ($p=0.04$)。しかし、1 日のみの差であり、最終的な創傷治癒に有意差はなかった (図 11)。Rap2B KO で有意差がなかった理

由と同様に、Rap2C KO でも Rap2B が機能補完していると考えた。

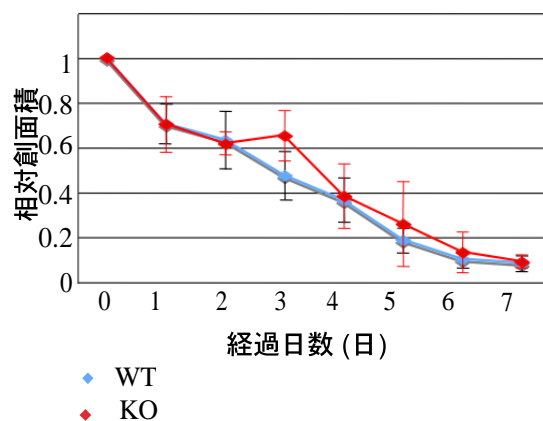


図11 Rap2C KO マウス皮膚創傷治癒解析

Rap2B、Rap2C のサブタイプ間での相互機能補完を排除するためには Rap2BC ダブル KO マウスでの解析が必要である。そのため、Rap2BC ダブルヘテロ KO マウスを作製したが、メスの不妊とオスの成長不良のため Rap2BC ダブル KO マウスは得られなかった。今後は皮膚特異的 Rap2BC ダブル KO マウスによる解析が必要である。

参考文献

- 1 Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4 as a putative effector of Rap2 to activate the c-Jun N-terminal kinase. Machida N, Umikawa M, Takei K, Sakima N, Myagmar BE, Taira K, Uezato H, Ogawa Y, Kariya K. *J Biol Chem* 279 (16) 15711-4, 2004
- 2 The Traf2- and Nck-interacting kinase as a putative effector of Rap2 to regulate actin cytoskeleton. Taira K, Umikawa M, Takei K, Myagmar BE, Shinzato M, Machida N, Uezato H, Nonaka S, Kariya K. *J Biol Chem* 279 (47) 49488-96, 2004
- 3 Rap2 function requires palmitoylation and recycling endosome localization. Uechi Y, Bayarjargal M, Umikawa M, Oshiro M, Takei K, Yamashiro Y, Asato T, Endo S, Misaki R,

Taguchi T, Kariya K. Biochem Biophys Res Commun 378 (4) 732-7, 2008

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 1 件)

MicroRNA-196a-5p is a potential prognostic marker of delayed lymph node metastasis in early-stage tongue squamous cell carcinoma. Maruyama T, Kazuhide Nishihara, Masato Umikawa, Akira Arasaki, Toshiyuki Nakasone, Fumikazu Nimura, Akira Matayoshi, Kimiko Takei, Saori Nakachi, Ken-ichi Kariya, Naoki Yoshimi Oncology Letters 15 2349-2363, 2018
査読あり

[学会発表] (計 1 件)

Roles of Rap2 signaling in cutaneous function

Kimiko Takei, Tsuyoshi Asato, Masato Umikawa, Minoru Oshiro, Ken-ichi Kariya
The 41st annual meeting of the Japanese society for investigative dermatology, 9th-11th Dec, 2016, Sendai

[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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：

国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武居 公子 (TAKEI, Kimiko)
琉球大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：90325861

(2) 研究分担者

上里 博 (UEZATO, Hiroshi)
琉球大学・大学院医学研究科・名誉教授
研究者番号：10137721

丸山 一郎 (MARUYAMA, Ichiro)

沖縄科学技術大学院大学・情報処理生物学ユニット・教授
研究者番号：70426568

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()