

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19701

研究課題名(和文) 表皮細胞の癌化におけるミトコンドリア融合・分裂分子の機能解析

研究課題名(英文) Critical functions for mitochondrial division in skin cancer

研究代表者

柳 輝希 (Yanagi, Teruki)

北海道大学・医学研究科・特任助教

研究者番号：50755973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア融合・分裂関連分子の皮膚悪性腫瘍での発現解析をおこなった。皮膚有棘細胞癌においては、周囲の正常表皮細胞に比べて、Drp1が高発現していた。次に、Drp1のノックダウンによって、細胞増殖が抑制された。さらに、ヌードマウスを用いたin vivo異種皮下移植モデルでの癌細胞増殖についても検討し、ノックダウンによって腫瘍の増大が抑制された。細胞周期解析ではG2/M期での停止が認められた。Drp1阻害剤を用いた治療実験では、Drp1阻害剤投与によって、皮膚有棘細胞癌の増殖抑制を得た。以上のことから、ミトコンドリア分裂Drp1は皮膚有棘細胞癌の細胞分裂・悪性化に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dynamin-related protein 1 (Drp1) mediates mitochondrial fission. Recently, several studies have shown that Drp1 plays an important role in some cancers. However, little is known about Drp1 in cutaneous squamous cell carcinoma (SCC). The Drp1 gene-knockdown SCC cells showed lower cell proliferation than scramble-control cells, as assessed by direct cell counting. DNA content analysis showed Drp1 knockdown to cause G2/M arrest. Morphologically, the depletion of Drp1 resulted in an elongated, hyper-fused mitochondrial network. The MEK inhibitor PD325901 suppressed cell proliferation. Also, PD325901 caused the dysregulation of the mitochondrial network. In tumor xenografts of DJM1 cells, the knockdown of Drp1 suppressed tumor growth in vivo. Clinically, the expression levels of Drp1 were higher in cutaneous SCCs than in normal epidermis. Our results reveal a crucial function for Drp1 in regulating tumor growth, mitochondrial morphology, and cell cycle in cutaneous SCC.

研究分野：皮膚腫瘍学

キーワード：皮膚腫瘍 RNA干渉 ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

### 研究の学術的背景 - 1

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オルガネラであり、アポトーシス、細胞内カルシウムシグナリング、自然免疫応答など、さまざまな細胞応答において中心的な機能を発揮している。またミトコンドリアは活発に融合と分裂を繰り返し、その形態を変化させている。発生・組織分化・特異的疾患に伴ってミトコンドリアの形態が大きく変化する。近年、ミトコンドリアの融合と分裂に機能する GTP 加水分解酵素群が同定された(Nat Rev Endocrinol 2014)。融合には Mitofusin (Mfn)1、Mfn2、OPA1、分裂には Drp1 (Dynamitin Related Protein 1) が関与する。

### 研究の学術的背景 - 2

日本は急速に進む高齢化社会を迎えており、高齢者においては長期の紫外線暴露による皮膚がん(皮膚有棘細胞癌・基底細胞癌・悪性黒色腫)の発生が高頻度に認められる。これまで、このような紫外線関連皮膚癌に対しては手術による切除を行っているが、進行がんでは転移をきたすことも多く、より効果的な治療が求められている。近年、上記 DRP1 などのミトコンドリア融合・分裂関連因子が、細胞の悪性化に必須であることが報告された(Mol Cell 2015)。しかし、紫外線発癌や紫外線老化におけるこれらの分子の機能は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、表皮細胞の癌化機構(特に紫外線発癌過程)におけるミトコンドリア融合・分裂関連分子の機能を解明することである。

## 3. 研究の方法

### 1) ミトコンドリア融合・分裂関連分子の皮膚悪性腫瘍での発現解析

北海道大学病院皮膚科にて切除した皮膚悪性腫瘍検体(有棘細胞癌、基底細胞癌、悪性黒色腫)約 100 例について、ミトコンドリア融合・分裂関連分子(DRP1, Mfn1, Mfn2)の発現解析を行った。免疫染色によって正常皮膚組織・色素性母斑の染色と悪性腫瘍部における染色を比較した。

### 2) 皮膚癌培養細胞でのミトコンドリア融合・分裂関連分子のノックダウン実験

RNA 干渉(siRNA および shRNA 法)を用いて皮膚有棘細胞癌 A431 細胞・皮膚悪性黒色腫 A2058 細胞における DRP1, Mfn1, Mfn2 のノックダウン実験を試みた。方法として、pLKO ベクター-shRNA 法を中心に実施した。細胞周期解析(FACS: DNA content analysis)およびアポトーシス解析(FACS: Annexin V-PI

analysis)も併せて実施した。さらに、ヌードマウスを用いた in vivo 異種皮下移植モデルでの癌細胞増殖についても検討した。また、分子生物学的には DRP1 による K-Ras のリン酸化(Mol Cell 2015)、および DRP1 欠損によるオートファジーの活性化(Cell Metabolism 2015)が報告されており、DRP1 ノックダウン時のこれらの変化についても検討した。

## 4. 研究成果

本研究では、第一に、ミトコンドリア融合・分裂関連分子の皮膚悪性腫瘍での発現解析をおこなった。皮膚有棘細胞癌においては、周囲の正常表皮細胞に比べて、Drp1 が高発現していた。さらに、浸潤部や転移部分ではより発現が亢進していた。一方で、悪性黒色腫や他の癌腫における Drp1 発現は大きな変化は認めなかった。次に、皮膚癌培養細胞でのミトコンドリア融合・分裂関連分子のノックダウン実験を実施した。Drp1 のノックダウンによって、皮膚有棘細胞癌細胞増殖が抑制された。さらに、ヌードマウスを用いた in vivo 異種皮下移植モデルでの癌細胞増殖についても検討し、ノックダウンによって腫瘍の増大が抑制された。細胞周期解析では Drp1 ノックダウンによって G2/M 期での細胞周期停止が認められた。Drp1 阻害剤を用いた治療実験では、Drp1 阻害剤投与によって、培養細胞系および生体内での、皮膚有棘細胞癌の増殖抑制を得た。以上のことから、ミトコンドリア分裂関連分子の中でも、特に Drp1 は皮膚有棘細胞癌の細胞分裂・悪性化に関与していることが示唆され、新規治療ターゲットになる可能性があると考えられる。

## 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 47 件)

Maeda T, Watabe Y, Yanagi T\*, Imafuku K, Kitamura S, Hata H, Nomura T, Shimizu H:

Dermoscopic features of Bednar tumor: report of a case.

*J Dermatol*, in press.

doi: 10.1111/1346-8138.査読有

Kitamura S, Yanagi T\*, Inamura-Takashima Y, Imafuku K, Hata H, Uehara J, Ishida Y, Otsuka A, Hirata K, Shimizu H:

Retrospective study on the correlation between 18-fluorodeoxyglucose uptake in positron emission tomography-computer tomography and tumor volume, cytological activity as assessed with Ki-67 and GLUT-1 staining in 10 cases of Merkel cell carcinoma.

**J Eur Acad Dermatol Venereol**, in press.  
doi: 10.1111/jdv.14821. 査読有

Kosumi H, **Yanagi T\***, Maeda T, Sugai T, Imafuku K, Hata H, Shimizu H:  
Horn-like tumor on the dorsal hand.

**Lancet Infect Dis**, 2018 Jun;18(6):696.  
doi: 10.1016/S1473-3099(18)30098-7. 査読有

Takahashi K, **Yanagi T\***, Kitamura S, Hata H, Imafuku K, Iwami D, Hotta K, Morita K, Shinohara N, Shimizu H:

Successful treatment of hidradenitis suppurativa with rituximab for a patient with idiopathic carpotarsal osteolysis and chronic active antibody-mediated rejection.

**J Dermatol**, 2018 May;45(5):e116-e117.  
doi: 10.1111/1346-8138.14144. 査読有

Kitamura S, **Yanagi T\***, Inamura-Takashima Y, Imafuku K, Hata H, Fujioka Y, Ohba Y, Shimizu H.

Dermoscopic evaluation for skin grafts after surgery; neo-vascularization correlates with survival of skin grafts: a prospective study

**J Dermatol Sci**, 2018 May;90(2):213-216.  
査読有

doi: 10.1016/j.jdermsci.2018.01.014.

Yamaguchi Y, **Yanagi T\***, Sato K, Yoshimoto N, Hirata Y, Ujiie I, Nishimura M, Natsuga K, Shiiya C, Tsukinaga I, Shimizu H :

Portable negative-pressure wound therapy for pyoderma gangrenosum: Report of two cases.

**J Dermatol**, 2018 Apr;45(4):483-486.  
doi: 10.1111/1346-8138.14180. 査読有

Kitamura S, **Yanagi T\***, Imafuku K, Hata H, Shimizu H.

Lipofuscin deposition causes the pigmentation of apocrine hidrocystoma.

**J Dermatol**, 2018 Jan;45(1):91-94.  
doi: 10.1111/1346-8138.14037. 査読有

Kosumi H, **Yanagi T\***, Izumi K, Ito T, Shimizu H.

Unusual post-patch testing erythema: a late, granulomatous, non-eczematous reaction to gold sodium thiosulfate.

**J Eur Acad Dermatol Venereol**, 32: e126-e127, 2018.

doi: 10.1111/jdv.14615 査読有

真屋由佳, **柳輝希**, 高島有香, 今福恵輔, 北村真也, 伊東孝政, 秦洋郎, 清水宏:

インフリキシマブが有効であった潰瘍性大腸炎合併化膿性汗腺炎の1例.

皮膚科の臨床 59: 1753-1757, 2017. 査読有

Shiiya C, Hata H, Inamura Y, Imafuku K, Kitamura S, **Yanagi T**, Fujita Y, Shimizu H

Acrokeratoelastoidosis successfully

treated with 10% salicylic acid ointment  
**J Dermatol**, 44: e46-e47, 2017

doi: 10.1111/1346-8138.13503. 査読有

Kitamura S, **Yanagi T\***, Inamura Y, Hata H, Imafuku K, Yoshino K, Shimizu H:

Pazopanib does not bring remarkable improvement in patients with angiosarcoma  
**J Dermatol**, 44: 64-67, 2017.

doi: 10.1111/1346-8138.13558. 査読有

Imafuku K, Hata H, Yamaguchi Y, Inamura Y, **Yanagi T**, Shimizu H.

Modified Dufourmentel flap, easy to design and tailor to the defect

**J Dermatol**, 44: 68-70, 2017

doi: 10.1111/1346-8138.13568. 査読有

Narahira A, **Yanagi T\***, Cho KY, Nakamura A, Miyoshi H, Hata H, Imafuku K, Kitamura S, Shimizu H.

Isolated adrenocorticotrophic hormone deficiency associated with nivolumab therapy

**J Dermatol**, 44: e70, 2017.

doi: 10.1111/1346-8138.13571. 査読有

Hirata Y, **Yanagi T\***, Yamaguchi Y, Sato K, Shinkuma S, Hata H, Shimizu H.

Ulcerative contact dermatitis caused by benzethonium chloride

**Contact Dermatitis**, 76:188-190, 2017

doi: 10.1111/cod.12682. 査読有

Sanada T, Hata H, Sato K, Imafuku K, Kitamura S, **Yanagi T**, Nomura T, Shimizu H.

Usefulness of dermoscopy in distinguishing benign lesion from angiosarcoma

**Clin Exp Dermatol**, 42:676-678, 2017

doi: 10.1111/ced.13141. 査読有

Imafuku K, Hata H\*, **Yanagi T**, Kitamura S, Inamura Y, Nishimura M, Kitamura S, Moriwaki S, Shimizu H.

Multiple skin cancers in patients with mycosis fungoides after long-term ultraviolet phototherapy.

**Clin Exp Dermatol**, 42:523-526, 2017

doi: 10.1111/ced.13121. 査読有

Inamura Y, **Yanagi T\***, Hata H, Kitamura S, Shimizu H.

Proliferating trichilemmal cyst on the mamma.

**J Dtsch Dermatol Ges**, 15(10):1019-1020, 2017

doi: 10.1111/ddg.13293\_g. 査読有

Inamura Y, **Yanagi T\***, Hata H, Kitamura S, Shimizu H.

Proliferating trichilemmal cyst on the mamma.

**J Dtsch Dermatol Ges**, 15(10):1019-1020, 2017

doi: 10.1111/ddg.13293. 査読有

Honda Y, Otsuka A\*, Ono S, Yamamoto Y, Seidel JA, Morita S, Hirata M, Kataoka TR,

- Takenouchi T, Fujii K, Kanekura T, Okubo Y, Takahashi K, **Yanagi T**, Hoshina D, Hata H, Abe R, Fujimura T, Funakoshi T, Yoshino K, Masuzawa M, Amoh Y, Tanaka R, Fujisawa Y, Honda T, Kabashima K\*. Infiltration of PD-1-positive cells in combination with tumor site PD-L1 expression is a positive prognostic factor in cutaneous angiosarcoma **Oncoimmunology**, 6: e1253657, 2017. doi: 10.1080/2162402X. 査読有
- Imafuku K, Hata H, Kitamura S, **Yanagi T**, Shimizu H. Ultrasonographic findings can identify 'pseudoprogression' under nivolumab therapy **Br J Dermatol**, 177: 1726-1731, 2017. doi: 10.1111/bjd.15198. 査読有
- 21 **Yanagi T**, Hata H\*, Homma E, Kitamura S, Imafuku K, Shimizu H. Adjuvant therapy with low-interferon-beta for stage II and III melanoma: results of a retrospective analysis. **Clin Exp Dermatol**, 42(7):781-785, 2017 doi: 10.1111/ced.13179. 査読有
- 22 Kitamura S, **Yanagi T\***, Imafuku K, Hata H, Fujii K, Nishihara H, Shimizu H. Seborrhic keratosis arising on an epidermal nevus with HRAS p.G13R mutation **Int J Dermatol**, 56:e177-e180, 2017. doi: 10.1111/ijd.13573. 査読有
- 23 Yamaguchi Y, **Yanagi T\***, Imafuku K, Kitamura S, Hata H, Nishihara H, Shimizu H. A case of linear basal cell carcinoma: evaluation of proliferative activity by immunohistochemical staining of PCTAIRE1 and p27 **J Eur Acad Dermatol Venerol**, 31(8):e359-e362, 2017. doi: 10.1111/jdv.14159. 査読有
- 24 Nakazato S, **Yanagi T\***, Inamura Y, Kitamura S, Hata H, Fujita Y, Anan T, Honma M, Shimizu H. Reticulated acanthoma with sebaceous differentiation **Eur J Dermatol**, 27:318-320, 2017. doi: 10.1684/ejd. 査読有
- 25 Miyazawa H, **Yanagi T\***, Yamaguchi Y, Imafuku K, Kitamura S, Hata H, Uehara J, Ichikawa N, Ohno Y, Yoshida T, Homma S, Kawamura H, Taketomi A, Shimizu H. Two cases of melanomas paradoxically metastasizing to the intestinal tract during nivolumab therapy. **J Dermatol**, 44: 959-962, 2017. doi: 10.1111/1346-8138.13825. 査読有
- 26 **Yanagi T\***, Hata H, Mizuno E, Kitamura S, Imafuku K, Nakazato S, Wang L, Nishihara H, Tanaka S, Shimizu H. PCTAIRE1/CDK16/PCTK1 is overexpressed in cutaneous squamous cell carcinoma and regulates p27 stability and cell cycle **J Dermatol Sci**, 86: 149-157, 2017. doi: 10.1016/j.jdermsci. 査読有
- 27 Kosumi H, **Yanagi T\***, Shiba K, Sugai T, Nakamura H, Shimizu H. Unusual tense bullae on the legs of a woman with rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, 56: 1471, 2017. doi: 10.1093/rheumatology/kex090. 査読有
- 28 Takahashi K, **Yanagi T\***, Imafuku K, Kitamura S, Inamura-Takashima Y, Yamaguchi Y, Hata H, Shimizu H. Ultrasonographic features of intravascular fasciitis: case report and review of the literature. **J Eur Acad Dermatol Venerol**, 31: e457-e459, 2017. doi: 10.1111/jdv.14293. 査読有
- 29 Kosumi H, Ito T\*, Fujita Y\*, Izumi K, Maya Y, **Yanagi T**, Natsuga K, Ujiie H, Shinkuma S, Nomura T, Sadanobu N, Shimizu H. Generalized Pustular Psoriasis. **J Pediatr**, 188: 305, 2017. doi: 10.1016/j.jpeds. 査読有
- 30 Kosumi H, **Yanagi T\***, Izumi K, Ito T, Shimizu H. Hair color shampoo dermatitis **Contact Dermatitis**, 77: 419-421, 2017. doi: 10.1111/1346-8138.14232. 査読有
- 31 **Yanagi T**, Nagai K, Shimizu H, Matsuzawa SI\*. Melanoma antigen A12 regulates cell cycle via tumor suppressor p21 expression. **Oncotarget**, 8:68448-68459, 2017. doi: 10.18632/oncotarget. 査読有
- 32 Maeda T, **Yanagi T\***, Imafuku K, Kitamura S, Hata H, Izumi K, Ujiie H, Iwata H, Shimizu H. Using immune checkpoint inhibitors without exacerbation in a melanoma patient with pemphigus foliaceus. **Int J Dermatol**, 56: 1477-1479, 2017. doi: 10.1111/ijd.13713. 査読有
- 33 **Yanagi T\***, Nishihara H, Fujii K, Nishimura M, Narahira A, Takahashi K, Iwata H, Hata T, Kitamura S, Imafuku K, Shimizu H. Comprehensive cancer-related gene analysis reveals that active KRAS mutation is a prognostic mutation in mycosis fungoides. **J Dermatol Sci**, 88; 367-370, 2017. doi: 10.1016/j.jdermsci. 査読有
- 34 Nakazato S, **Yanagi T\***, Inamura Y, Kitamura S, Hata H, Shimizu H. Cutaneous inflammatory myofibroblastic tumor: a case and a review of previous

cases

**Eur J Dermatol**, 2017 Dec 1;27(6):676-677.

doi: 10.1684/ejd. 査読有

35 Hotta M, Yanagi T\*, Sugai T, Nakazato S, Izumi K, Hata H, Okada K, Goto H, Matsuno Y, Shimizu H.

A case of peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified, presenting dyshidrosis-like eruptions as the first clinical manifestation

**J Dermatol**, 44: e359-e360, 2017.

doi: 10.1016/j.jdermsci. 査読有

36 Kitamura S, Yanagi T\*, Imafuku K, Hata H, Abe R, Shimizu H.

Drp1 regulates mitochondrial morphology and cell proliferation in cutaneous squamous cell carcinoma

**J Dermatol Sci**, 88; 298-307, 2017.

doi: 10.1016/j.jdermsci. 査読有

37 Maeda T, Yanagi T\*, Imafuku K, Kitamura S, Hata , Shimizu H.

Photodynamic Eye reveals the border of pilonidal sinus precisely

**Int J Dermatol**, 56: 1514-1515, 2017.

doi: 10.1111/ijd.13745. 査読有

38 Yoshimoto N, Yanagi T\*, Matsumura W, Ujiie I, Izumi K, Ando S, Nishie W, Fujii K, Nishihara H, Shimizu H.

Primary cutaneous diffuse large B-cell lymphoma presenting a solitary subcutaneous nodule with TP53 and FBXW7 mutations

**Int J Dermatol**, 56: 1459-1461, 2017.

doi: 10.1111/ijd.13756. 査読有

39 Yamaguchi Y, Hata H, Kitamura S, Yanagi T, Shimizu H.

A case of chondroma cutis showing callus-like appearance

**J Eur Acad Dermatol Venerol**, 31: e37-e38, 2017.

doi: 10.1111/jdv.13624. 査読有

40 Saito S, Hata H, Inamura Y, Kitamura S, Yanagi T, Shimizu H.

Vulvar basal cell carcinoma showing adhesion of the labia majora and minora.

**Clin Exp Dermatol**, 42; 92-93, 2017.

doi: 10.1111/ced.12956. 査読有

41 Milutinovic S, Kashyap AK, Yanagi T, Wimer C, Zhou S, O' Neil R, Kurtzman AL, Faynboym A,

Xu L, Hannum CH, Diaz PW, Matsuzawa SI, Horowitz M, Horowitz L, Bhatt RR, Reed JC. Dual agonist Surrobody™ simultaneously activates death receptors DR4 and DR5 to induce cancer cell death.

**Mol Cancer Ther**, 15: 114-124, 2016.

doi: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0400. 査読有

42 Kitamura S, Hata H, Inamura Y, Imafuku K, Yanagi T, Oishi Y, Maruyama S, Shimizu

H.

Chronic papillomatous dermatitis around an ileostoma.

**J Dermatol**, 43: 220-221, 2016

doi: 10.1111/1346-8138.13175. 査読有

43 Kitamura S, \*Hata H, Inamura Y, Imafuku K, Muramatsu K, Yanagi T, Shimizu H.

Lessons from 20 cases of digit malignant melanoma

**J Eur Acad Dermatol Venerol**, 30: e161-e163, 2016.

doi: 10.1111/jdv.13467. 査読有

44 Kitamura S, Hata H, Yamaguchi Y, Imafuku K, Yanagi T, Shimizu H.

The Unique Dermoscopic Structure “Large Black Web” in basal cell carcinoma on the areola.

**J Eur Acad Dermatol Venerol**, 30: e221-e223, 2016.

doi: 10.1111/jdv.13552. 査読有

45 Nakazato S, Yanagi T\*, Inamura Y, Kitamura S, Hata H, Shimizu H.

A case of nodular hidradenoma of the auricle mimicking squamous cell carcinoma

**Eur J Dermatol**, 26: 409-410, 2016.

doi: 10.1684/ejd. 査読有

46 Yanagi T, Shi R, Aza-Blanc P, Reed JC, Matsuzawa S\*.

PCTAIRE1-knockdown sensitizes cancer cells to TNF family cytokines.

**PLoS One**, 10 (3): e0119404, 2015.

doi: 10.1371/journal.pone.0119404. 査読有

47 Yang Z, Wilkie-Grantham RP, Yanagi T, Shu CW, Matsuzawa S, Reed JC.

ATG4B (Autophagin-1) phosphorylation modulates autophagy.

**J Biol Chem**, 290: 26549-26561, 2015.

doi: 10.1074/jbc.M115.658088. 査読有

[学会発表](計 2 件)

Yanagi T, Nishihara H, Iwata H, Shimizu H.

Targeted gene analysis reveals that active KRAS mutation is a prognostic mutation in mycosis fungoides

2018 Annual Meeting, American Academy of Dermatology, San Diego, USA, Feb 16-21, 2018.

Yanagi T.

PCTAIRE1/CDK16/PCTK1 phosphorylates p27 and regulates mitosis in cancer cells, implying a novel target for cancer therapy.

The 41<sup>st</sup> NAITO conference, Sapporo, Japan, July 5-8, 2016.

[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  
<http://www.derm-hokudai.jp/jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者  
柳 輝希 (YANAGI, Teruki)

北海道大学医学研究院  
研究者番号：50755973

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )