

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20591330
 研究課題名（和文） 中心体数制御異常を通じたボーエン病の病態形成メカニズムの解析とモデルマウスの作製
 研究課題名（英文） The analysis of centrosome replication cycle in Bowen's disease

研究代表者
 久保 亮治（KUBO AKIHARU）
 慶應義塾大学・医学部・講師
 研究者番号：70335256

研究成果の概要（和文）：

中心体は母・娘中心小体と中心体周辺物質から構成されるオルガネラであり、1細胞周期あたり1回のみ複製されるように厳密にコントロールされている。中心体複製のコントロールが外れ、ゲノムDNAの複製周期と中心体の複製周期が乖離すると、多極分裂や細胞質分裂異常が生じ、複製したゲノムを正確に娘細胞に分配することができなくなり、癌細胞の発生または悪性化を招くと考えられている。今回、娘中心小体を特異的に染色する抗体を作成し、ヒトボーエン病臨床検体において、母・娘中心小体を別々に染色することに成功した。結果、ボーエン病組織において中心体複製異常が存在することが明らかとなった。母・娘中心小体がそれぞれほぼ同数増えていることから、ボーエン病組織における中心体複製異常が細胞質分裂の失敗により起こっていることが示唆された。さらに、ボーエン病モデルマウスとして、中心体制御キナーゼであるAurora Aの皮膚特異的過剰発現マウスを作成した。本欠損マウスでは、基底細胞層に多核の細胞を生じ、その多核細胞では中心体の複製異常が観察され、ボーエン病の組織学的異常を反映したモデルマウスであると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Centrosome consists of mother and daughter centrioles and pericentriolar materials. Centrosome duplicates only once per cell cycle and the duplication cycle is strictly regulated. In many cancer cells, the centrosomal cycle is dysregulated, which induces multi-polar spindles or cytokinesis failure and aneuploidy. In this study, we established a specific antibody against daughter centrioles and succeeded to count the number of mother and daughter centrioles per cell in the biopsy specimens of Bowen's disease and squamous cell carcinoma. Centrosome duplication cycle was dysregulated and multiple centrioles were observed in so-called "clumping cells" of Bowen's disease. In clumping cells, the number of mother and daughter centrioles are almost same, which indicated that cytokinesis failure causes the formation of "clumping cells". We found that Aurora-A kinase was overexpressed in "clumping cells". So we established transgenic mice that overexpress Aurora-A kinase specifically in the epidermis. In these mice, binuclear cells were found in the basal layer of epidermis, suggesting that Aurora-A overexpression is associated with the pathogenesis of Bowen's disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：扁平上皮癌、Bowen病、中心体、Aurora A kinase

1. 研究開始当初の背景

ボーエン病とは、皮膚における Squamous cell carcinoma (SCC) in situ のうち、ある特殊な病態を呈するものに対して命名された病名である。その特徴は、病理学的には多数の細胞分裂像が観察され、clumping cell と呼ばれる多核の細胞が出現するなど、強い悪性を示唆する組織像であるにも関わらず、臨床的には長期間にわたって非常に緩徐に進行し極めて良性の経過を示すことである。しかし、その特徴的な組織像に至る病態形成の分子メカニズムはほとんど不明のままであった。

2. 研究の目的

申請者は中心体制御異常がボーエン病の病態形成メカニズムの本態であるという仮説を立てた。すなわち、中心体数の異常増加により clumping cell や多紡錘体極を持つ細胞が出現、中心体の細胞極性形成能の異常により個々の細胞の極性が乱れ、中心体が担う細胞増殖のコントロールが不完全になることにより多数の細胞分裂像が出現するなど、中心体の異常により極めて悪性を示唆する組織像が形成される。しかし、p53 に代表される各種の癌抑制遺伝子が正常に機能しており、また重層扁平上皮全体としての極性と分化も保たれているため、臨床的には極めて緩徐に進行する良性の経過をとる。その後、癌抑制遺伝子に変異が入ると初めて進行癌、すなわちボーエン癌となる、という仮説である。本仮説を証明するために、(1) ボーエン病組織における中心体複製制御異常の証明と解析、(2) 皮膚特異的に中心体制御機構を破綻させたボーエン病モデルマウスの作成、を行った。

3. 研究の方法

ボーエン病組織を用いた免疫組織染色にて、中心体制御マスターキナーゼである Aurora A キナーゼの発現変化、様々な細胞周期制御蛋白質の発現変化について検討した。娘中心子特異的蛋白 centrobilin に対する抗体を作成し、中心子を染色する C-napI 抗体と二重染色することで、母中心子と娘中心子の数をそれぞれカウントし、clumping cell における中心体数増加のメカニズムについて評価した。K5 プロモータ下で cre を発現するマウスと、cre による recombination が

起こると Aurora-A を過剰発現するマウスを掛け合わせ、表皮にて Aurora-A を過剰発現するマウスを作成し、その組織学的フェノタイプを解析した。

4. 研究成果

ボーエン病組織を用いた免疫組織染色にて、中心体制御マスターキナーゼである Aurora A キナーゼの発現変化について検討した。多核の clumping cell において Aurora A キナーゼの過剰発現が見られた。(図1)

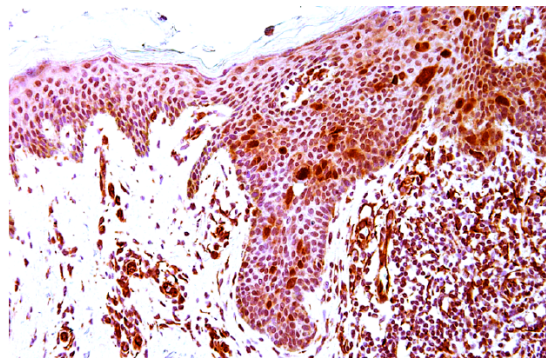


図1：病変部(右側)において、clumping cell に Aurora-A kinase の過剰発現を認める。

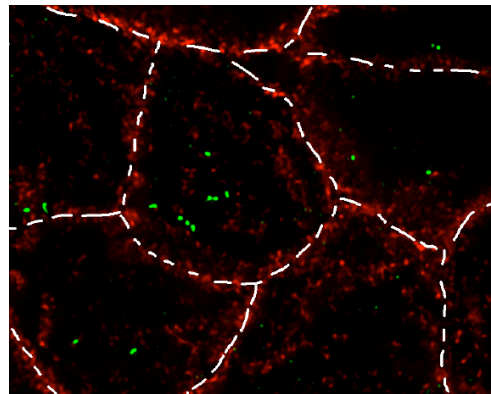


図2：Bowen病病変部組織の C-napI 抗体による中心子染色。中央の細胞にて中心子の過剰複製を認める。

一方、多核化していない腫瘍細胞および正常ケラチノサイトでは Aurora A キナーゼの発現は見られなかった。次にこれらの細胞での中心体数異常について検討を加えた。正常ケラチノサイトおよび多核化していない腫瘍細胞においては中心体数の異常は見られなかったが、clumping cell ではほぼ必ず中心体数の増加が見られた。また、娘中心子特異的

分子 centrobilin に対する抗体で染色したところ、母中心子と娘中心子がほぼ同数増加していることが判明した。すなわち、clumping cell 出現のメカニズムとして、細胞質分裂の失敗による多核化と多中心体化が起こっている事が強く示唆された (図2)。

一方、様々な細胞周期制御蛋白質の異常について、ボーエン病病理組織を用いた組織染色により検討した。検討した16のボーエン病組織の約半数ではRb+p53+の一層の基底細胞様の細胞と、Rb-p53+の有棘細胞様の細胞の2種類の細胞から腫瘍が構成されているパターンが見られた。残り半数ではRb+p53+の基底細胞様の細胞が見られず、ほぼ全ての腫瘍細胞がRb-p53+であった。しかしp53+ではあるもののp53の下流にあるp21も+であり、p53は機能を失っていないと考えられた。一方、p16染色ではほぼ全ての腫瘍細胞が陽性に染まっており、ボーエン病腫瘍細胞はcell senescenceの状態にあると考えられた (図3)。

次に、K5プロモータ下でcreを発現するマウスと、creによるrecombinationが起こるとAurora-Aを過剰発現するマウスを掛け合わせ、表皮にてAurora-Aを過剰発現するマウスを作成した。その組織を観察したところ、基底層に2核の細胞が観察された。有棘層・顆粒層に多核の細胞は見られなかった。Aurora-Aの過剰発現のみではclumping cellは生じず、細胞分裂が有棘層でも起こるような細胞周期制御異常と組み合わせることで初めてBowen病の組織が形成されるものと考えられた。

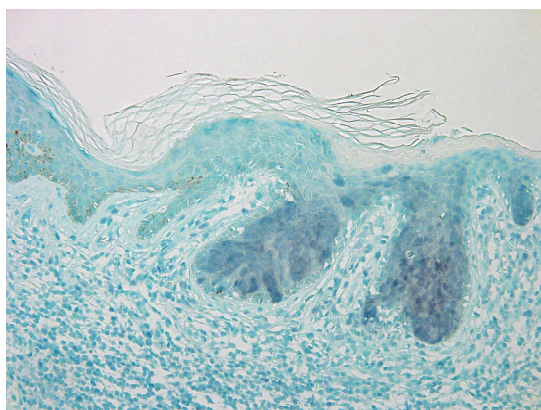


図3 : Bowen 病組織における P16 過剰発現。病変部 (右側) にのみ p16 の過剰発現を全ての腫瘍細胞において認める。

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3件)

① Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H,

Amagai M. External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *J. Exp. Med.* 2009, 206: 2937-2946. 査読あり

② Tanese K, Akiyoshi A, Saito M, Kubo A, Takanashi M, Ishiko A. Periungual squamous cell carcinoma induced by human papillomavirus type 59 in an immunosuppressed patient. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2009, 61: 167-169. 査読あり

③ Kubo A, Yuba-Kubo A, Tsukita S, Tsukita S, Amagai M. Sentan: a novel specific component of the apical structure of vertebrate motile cilia. *Mol. Biol. Cell* 2008 19: 5338-5346. 査読あり

[学会発表] (計1件)

① 久保亮治. Bowen 病における中心体制御異常の検討. 第108回日本皮膚科学会総会. 福岡. 2009年4月24-26日

[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://web.sc.itc.keio.ac.jp/derma/r_research/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 亮治 (KUBO AKIHARU)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号 : 70335256

(2) 研究分担者

石井 健 (ISHII KEN)
慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：50296670

天谷 雅行 (AMAGAI MASAYUKI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：90212563

(H20 年度)

(3) 連携研究者

なし