

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461674

研究課題名(和文) 皮膚表皮細胞におけるポドプラニンの機能解析

研究課題名(英文) Evaluation of functional roles of podoplanin in skin

研究代表者

浅井 純 (Asai, Jun)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50438222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、正常皮膚および病的状態(特に創傷治癒ならびに皮膚悪性腫瘍)の表皮細胞におけるポドプラニンの機能を解析した。創傷治癒において、表皮細胞におけるポドプラニンの発現は亢進しており、その機能として、細胞の増殖や遊走を促進させ上皮化を促進させることが明らかになった。皮膚悪性腫瘍の一つである乳房外パジェット病において、腫瘍周囲の表皮細胞の一部にポドプラニンの発現亢進が見られ、それは腫瘍の浸潤の程度が強いところほど発現が強い傾向にあり、表皮細胞のポドプラニン発現が乳房外パジェット病での予後予測因子となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the functional roles of podoplanin in keratinocytes in normal and pathological conditions, especially wound healing and malignant tumor. In wound healing, podoplanin upregulation was observed at the keratinocytes at wound edge. Podoplanin mediated keratinocytes proliferation and motility which resulted in accelerating wound healing. In Extramammary Paget's disease, podoplanin expression was observed at the site of invasion. Podoplanin expression on keratinocytes could predict aggressive behavior of Extramammary Paget's disease.

研究分野：皮膚腫瘍学、皮膚外科学

キーワード：創傷治癒 表皮細胞 ポドプラニン

1. 研究開始当初の背景

ポドプラニンとは膜貫通型糖タンパクの一種で、正常組織ではリンパ管内皮細胞や腎臓のポドサイトなどに発現している。正常皮膚においては毛包上皮基底細胞にのみ発現し、毛包間の表皮細胞には通常発現がみられない。しかし近年、ポドプラニンが毛包上皮だけでなく、尋常性乾癬や創傷治癒過程における表皮細胞、さらには有棘細胞癌などの皮膚悪性腫瘍においても発現が認められることが報告されている。だが表皮細胞におけるポドプラニンの役割、機能についてはほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

そこで本研究は正常皮膚および病的状態の表皮細胞におけるポドプラニンの機能を解明すること。その結果をもとに病的状態、特に創傷治癒および皮膚悪性腫瘍においてポドプラニンの発現を制御することにより治療効果が得られるかどうかを検討することを目的とする。

3. 研究の方法

平成 25 年度は主に培養表皮細胞を用いた *in vitro* の実験によりポドプラニンの機能、分子メカニズムについて検討する。平成 26 年度、27 年度は、平成 25 年度の実験結果をもとに、マウス皮膚潰瘍モデルを用いた *in vivo* でのポドプラニンの機能解析について検討する。皮膚悪性腫瘍については、各種皮膚悪性腫瘍におけるポドプラニンの発現を免疫組織学的に検討し、臨床経過（浸潤のあるなし、転移の有無など）とポドプラニン発現との相関について検討する。

4. 研究成果

培養ヒト表皮細胞(NHEK)におけるポドプラニンの発現と機能解析

NHEK のポドプラニンの発現を realtime PCR、Western blotting 法を用いて検討したところ、NHEK ではポドプラニンの発現が認められた。(Figure 1A)そこで、siRNA の遺伝子導入によりポドプラニン発現を低下させ、細胞の運動性について scratch wound assay にて検討したところ、ポドプラニン発現を低下させた NHEK では、対照群と比較して有意に細胞の運動性が低下した。(Figure 1C) また、細胞内伝達経路を検討したところ、ポドプラニン siRNA 遺伝子導入により RhoA 活性が低下しており、ポドプラニンによる細胞運動性の制御は、RhoA を介した機序であることが示唆された。(Figure 1E)

以上より、ポドプラニンは、正常培養表皮細胞において、細胞の運動性促進作用を有し、その作用は RhoA シグナルを介した機序であることが判明した。

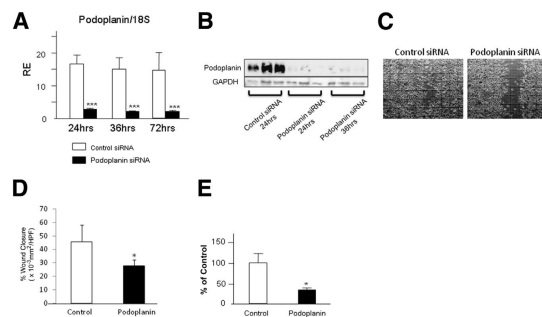


Figure 1 NHEKにおけるポドプラニンの発現とsiRNAを用いたポドプラニン遺伝子制御による運動性への影響。A. RT-PCR B. Western blotting C, D. scratch wound assay E. RhoA activity assay

創傷辺縁表皮細胞におけるポドプラニン発現とカドヘリンとの関係について

創傷治癒における再上皮化において、強固な細胞接着は細胞の運動性を妨げる要因となる。そこで、潰瘍辺縁部の表皮細胞におけるカドヘリンの発現とポドプラニンの発現について検討を行った。まず、培養 NHEK におけるカドヘリンの発現について、ポドプラニン遺伝子抑制群と対照群とで比較したところ、ポドプラニンの発現と E-カドヘリンの発現との間に逆の相関関係があった (Figure 1A)。創傷辺縁部の免疫組織学的検討においても、ポドプラニン陽性細胞では E-カドヘリンの発現低下が見られた。逆にポドプラニン陽性部位と N-カドヘリンの発現はほぼ一致していた (Figure 2B)。

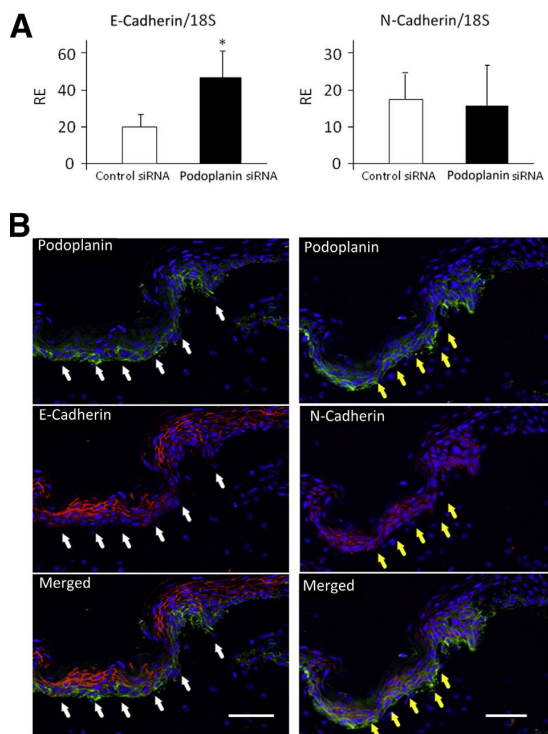


Figure 2 A. RT-PCR B.免疫蛍光染色法 緑色：ポドプラニン、赤色：左、E-カドヘリン、右、N-カドヘリン、青色：DAPI

以上より、皮膚創傷治癒過程において、表皮細胞におけるポドプラニンが細胞の運動性を制御し、再上皮化において重要な役割を担っていることが示唆された。

乳房外パジェット病における表皮細胞ポドプラニンの役割

皮膚がんにおいて、リンパ管浸潤の有無は重要な予後規定因子となることはよく知られている。ポドプラニンはリンパ管内皮細胞に発現し、リンパ管浸潤の有無を検討するために必須の免疫染色である。乳房外パジェット病は皮膚がんの一種であり、進行期ではしばしばリンパ節転移を来すため、ポドプラニン染色によるリンパ管浸潤の検討がよく行われる。我々は、ポドプラニン染色を施行した検体においてしばしば腫瘍周囲の表皮細胞がポドプラニン陽性となる症例を経験した。そこで、過去に当科で経験した乳房外パジェット病について、腫瘍周囲の表皮細胞におけるポドプラニンの発現と、癌の浸潤や転移などの相関について検討した (Table 1)。また Figure 3 にポドプラニン染色の図を示した。

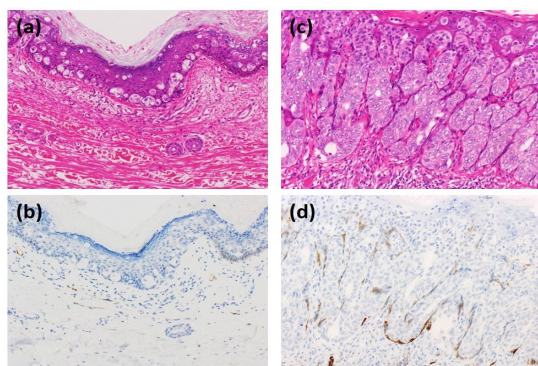


図3 乳房外パジェット病におけるポドプラニン染色 a,b ポドプラニン陰性例 c,d ポドプラニン陽性例

Parameters	Number of cases	Podoplanin expression in keratinocytes		
		Positive (%)	Negative (%)	P value
Sex				
Male	29	22 (88)	7 (58)	
Female	8	3 (12)	5 (42)	
Median age		74	75	
Tumor invasion				
In situ	18	9 (36)	9 (75)	0.026
invasive	19	16 (64)	3 (25)	
Tumor thickness				
< 0.5mm	13	5 (20)	8 (67)	0.0028
0.5mm ≤ < 1.0mm	13	9 (36)	4 (33)	
1.0mm ≤	11	11 (44)	0 (0)	
LN metastasis				
positive	4	4 (16)	0 (0)	0.192
negative	33	21 (84)	12 (100)	

Table 1 当科における乳房外パジェット病症例のまとめ

Table 1 に示すように、腫瘍周囲表皮細胞におけるポドプラニンが陽性である症例は、有意差を持って、浸潤癌に多いことが判明した。リンパ節転移の有無については、リンパ節転移を認めたと4例のすべてでポドプラニン陽性であった。

以上のことから、腫瘍周囲のポドプラニン陽性表皮細胞は、乳房外パジェット病において予後不良因子となりうる可能性が示唆された。

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 2 件)

1. Asai J, Hirakawa S, Sakabe J, Kishida T, Wada M, Nakamura N, Takenaka H, Mazda O, Urano T, Suzuki-Inoue K, Tokura Y, Katoh N. Platelets regulate the migration of keratinocytes via podoplanin/CLEC-2 signaling during cutaneous wound healing in mice. *Am J Pathol.* 2016 Jan; 186(1): 101-8. 査読有
2. Kan S, Konishi E, Arita T, Ikemoto C, Yanagisawa A, Katoh N, Asai J. Podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts predicts aggressive behavior in melanoma. *J Cutan Pathol.* 2014 Jul; 41(7): 561-7. 査読有

[学会発表](計 5 件)

1. Cho Z, Asai J, Konishi E, Arita T, Takenaka H, Yanagisawa A, Katoh N. Podoplanin expression in peritumoral keratinocytes predicts aggressive behavior in extramammary Paget's disease. 45th Annual ESDR Meeting. 2015 Sep 9-12; Rotterdam, The Netherlands.
2. Asai J, Kan S, Konishi E, Arita T, Ikemoto C, Takenaka H, Yanagisawa A, Katoh N. Podoplanin expression in

cancer-associated fibroblasts predicts poor prognosis in melanoma but not in non-melanoma skin cancer. (44th Annual ESDR meeting, Copenhagen, Denmark) Sep 10-13. *J Invest Dermatol* 2014; 134: Supple 2 S95(#540)

3. Asai J, Hirakawa S, Sakabe J, Takenaka H, Urano T, Suzuki-Inoue K, Tokura Y, Kato N. Platelets inhibit keratinocyte migration and proliferation by downregulation of podoplanin. International Investigative Dermatology, May 8-11, 2013 Edinburgh, Scotland.
4. Asai J, Hirakawa S, Sakabe J, Kishida T, Mazda O, Urano T, Suzuki-Inoue K, Tokura Y, Kato N. Regulation of Keratinocyte proliferation by podoplanin during cutaneous wound healing in mice. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Dec7-9, 2012 Loisir Hotel & Tower Naha, Naha, Okinawa, Japan
5. Asai J, Hirakawa S, Sakabe J, Kishida T, Mazda O, Urano T, Suzuki-Inoue K, Tokura Y, Kato N. Regulation of Keratinocyte migration by podoplanin during cutaneous wound healing in mice. (43th Annual ESDR meeting, Venice, Italy) Sep 19-22. *J Invest Dermatol* 2012; 132: Supple 9 (#049)

〔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

浅井 純 (ASA I, Jun)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：50438222

(2) 研究分担者

加藤 則人 (KATOH, Norito)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：30244578

竹中 秀也 (TAKENAKA, Hideya)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号：80254358

(3) 連携研究者

平川 聡史 (HIRAKAWA, Satoshi)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50419511