

## 56. 上皮細胞の増殖・分化制御破綻がもたらす疾患発症機構

深見 希代子

東京薬科大学 生命科学部 ゲノム病態医科学研究室

Key words : イノシトールリン脂質代謝酵素, 上皮細胞, 増殖・分化制御, 大腸がん, 炎症性皮膚疾患

### 緒言

上皮細胞の主な特徴は、細胞接着機構と細胞極性を有することである。こうした細胞接着や極性の異常は、上皮間葉転換等を引き起こす結果、細胞のがん化を誘導することが報告されている。また皮膚のケラチノサイトにおいては、接着が減弱化することは、上皮バリア機能不全を引き起こす。一方、イノシトールリン脂質代謝は、細胞増殖・分化や細胞骨格の制御、細胞運動、小胞輸送など多くの細胞機能に関わる結果、がんを始めとする多くの疾患に関与する事が知られている<sup>1)</sup>。

我々は、イノシトールリン脂質代謝の要の酵素ホスホリパーゼ C $\delta$ 1 (PLC $\delta$ 1) が細胞接着に必須な E-カドヘリンの発現を誘導し、大腸がん細胞の浸潤転移を阻害することを見出した<sup>2)</sup>。また、PLC $\delta$ 1 遺伝子欠損(KO)マウスが体毛の減少を示すことや炎症を伴う表皮の過増殖や分化異常を示すことを見出している<sup>3-5)</sup>。またヒトケラチノサイト細胞で PLC $\delta$ 1 の発現抑制を行い、三次元培養 (人工皮膚モデル) すると、PLC $\delta$ 1 遺伝子発現抑制細胞では表皮の分化が抑制され過増殖になる事を最近見出している。これらの結果は PLC $\delta$ 1 が皮膚の恒常性維持に不可欠であり、上皮細胞の機能に深く関与する事を示すものである。そこで本研究では、PLC $\delta$ 1 の上皮細胞の増殖・分化への関与に着目し、その制御の乱れが上皮細胞の性質である細胞接着機能を破綻し、がん細胞の悪性化や表皮バリア機能異常を伴う炎症性皮膚疾患を発症するという仮説の検証を試みる事にした。

### 方法および結果

#### 1. PLC $\delta$ 1 は大腸がんの悪性化抑制因子として機能している

上皮間葉転換 (EMT) は発生初期の形態形成に必須であるのみならず、浸潤転移、薬剤耐性などがん細胞悪性化に関与する。また上皮細胞のマーカータンパク質で細胞接着に重要な役割を果たす E-カドヘリンの発現量の減少ががん細胞の悪性化と相関する事が判明している。そこでリン脂質代謝を制御する酵素である PLC $\delta$ 1 が、E-カドヘリンの発現に影響を与えるかを見当したところ、PLC $\delta$ 1 の過剰発現は E-カドヘリンの発現を誘導し、浸潤転移能を激減させた。逆に PLC $\delta$ 1 の発現抑制は大腸がん細胞の E-カドヘリンの発現を抑制したことから、PLC $\delta$ 1 が大腸がんにおいてがん抑制因子として機能することがわかった<sup>2)</sup>。また PLC $\delta$ 1 は大腸がん臨床検体においても著しく発現が低下している事が明らかになった (図 1)。がん細胞ではがん遺伝子 *Ras* の活性化、MEK、ERK 経路の活性化が生じているが、PLC $\delta$ 1 は E-カドヘリンの発現を誘導し、これらの経路を阻害していることも判明した。さらに最近大腸癌細胞において PLC $\delta$ 1 により活性制御を受ける PKC アイソフォームの探索を行ったところ、大腸癌細胞において、PLC $\delta$ 1 は特定の PKC アイソザイムをそれぞれ活性化・不活性化することを見出している。

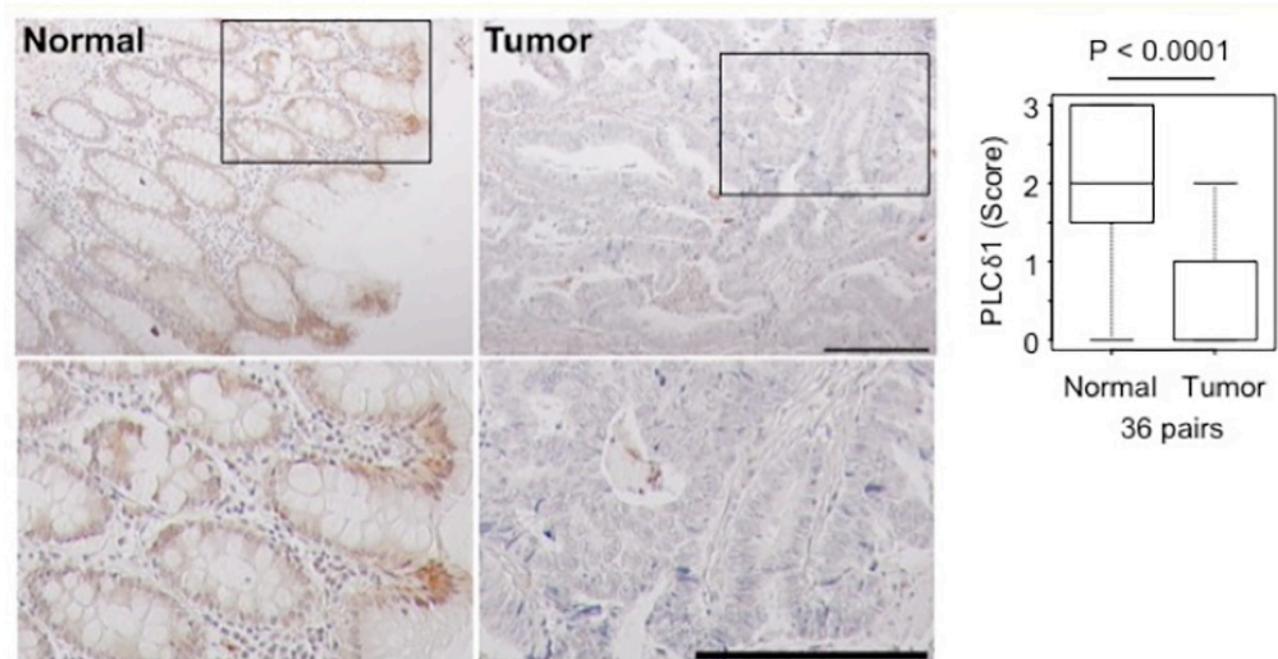


図1. 大腸がん臨床検体では PLC  $\delta$  1 の発現が低下し、PLC  $\delta$  1 はがん抑制因子として機能している  
 (左図)大腸がん組織 36 例と同一患者正常組織の切片を PLC  $\delta$  1 抗体を用いて組織染色を行った。正常組織では PLC  $\delta$  1 の発現が多い(茶色)のに対し、大腸がん組織では PLC  $\delta$  1 の発現が少ないのがわかる。下のパネルは上のパネル四角部分を拡大した。Scale bar: 200  $\mu$  m (右図) PLC  $\delta$  1 の発現レベルを Wilcoxon signed rank test によりスコア化した。

## 2. 炎症性皮膚疾患におけるリン脂質代謝酵素の機能解明

PLC  $\delta$  1 の上皮細胞の増殖・分化への関与が示唆されたことから、第一に、PLC  $\delta$  1 の欠損又は発現抑制が表皮バリア機能にどのような影響をもたらすのかを検討した。まず PLC  $\delta$  1 遺伝子欠損マウスを用いた皮膚バリア機能の解明を行った。PLC  $\delta$  1 遺伝子欠損マウス皮膚に色素液を添加した所、皮膚外からの色素液の浸透性が亢進していることが判明した。同様にヒトケラチノサイトで PLC  $\delta$  1 遺伝子を発現抑制後三次元培養法により人工表皮を作製し色素液を添加した所、色素液の浸透性が増大しバリア機能に異常がある事が判明した(図 2c)。またバリア機能に関与するフィラグリンの発現を検討した所、PLC  $\delta$  1 遺伝子を発現抑制細胞では、通常は存在しない分化層である角質層までフィラグリンの発現が観察された。これらの結果から、PLC  $\delta$  1 が表皮バリア機能に関与する事が明らかになった。

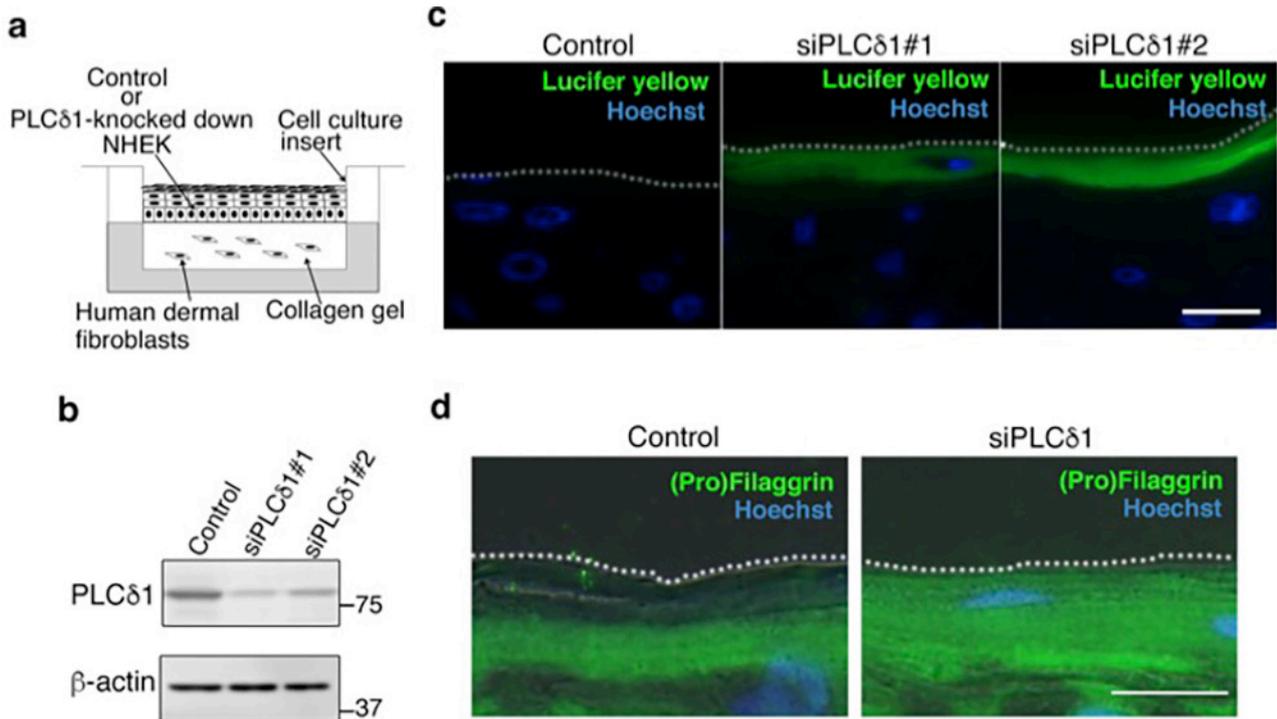


図2. 三次元培養法を用いたヒトケラチノサイトでの *PLCδ1* 遺伝子発現抑制は、表皮バリア機能の異常を誘導する

a) 三次元培養法の模式図。配列の異なる2種類の siRNA で *PLCδ1* 遺伝子発現抑制したヒトケラチノサイトを線維芽細胞を含むコラーゲンゲルに重層し、空気に触れた状態で6日間培養し人工皮膚を作製した。b) *PLCδ1* 遺伝子発現をウエスタンブロットにより確認した。β-actin はゲル添加量が同じであることを示す。c) Lucifer yellow を作製した人工皮膚上部に添加し、浸透性を検討した。*PLCδ1* 遺伝子発現抑制した人工皮膚で Lucifer yellow の浸透性が増大しているのがわかる。Hoechst で核を染色。点線は人工皮膚上部を示している。Scale bar = 30 μm。d) フィラグリン抗体を用いたフィラグリン組織染色像。*PLCδ1* 遺伝子発現抑制した人工皮膚で、フィラグリンの発現が人工皮膚上部まで広く局在している。Hoechst で核を染色。点線は人工皮膚上部を示している。Scale bar = 20 μm。

次にバリア機能の低下の原因として、角質バリアとタイトジャンクションバリアの異常を検討した。角質バリアの形成に重要なフィラグリンの発現を検討した所、本来皮膚の有棘層・顆粒層に局在するフィラグリンの発現が、人工皮膚上部まで広く局在する事が判明した(図2d)。細胞間接着に重要な細胞外脂質量の減少等も観察された。またタイトジャンクションバリアの機能を見当するため、タイトジャンクション構成タンパク質である ZO-1 の発現を免疫染色により検討した所、PLCδ1 を発現抑制したケラチノサイトでは、ZO-1 の正常な局在が観察されず、タイトジャンクションの形成不全が生じている事が判明した(図3)。こうしたことから、*PLCδ1* 遺伝子の発現抑制は、角質バリアとタイトジャンクションバリアの異常を介して表皮バリア機能不全を引き起こしていると考えられた。

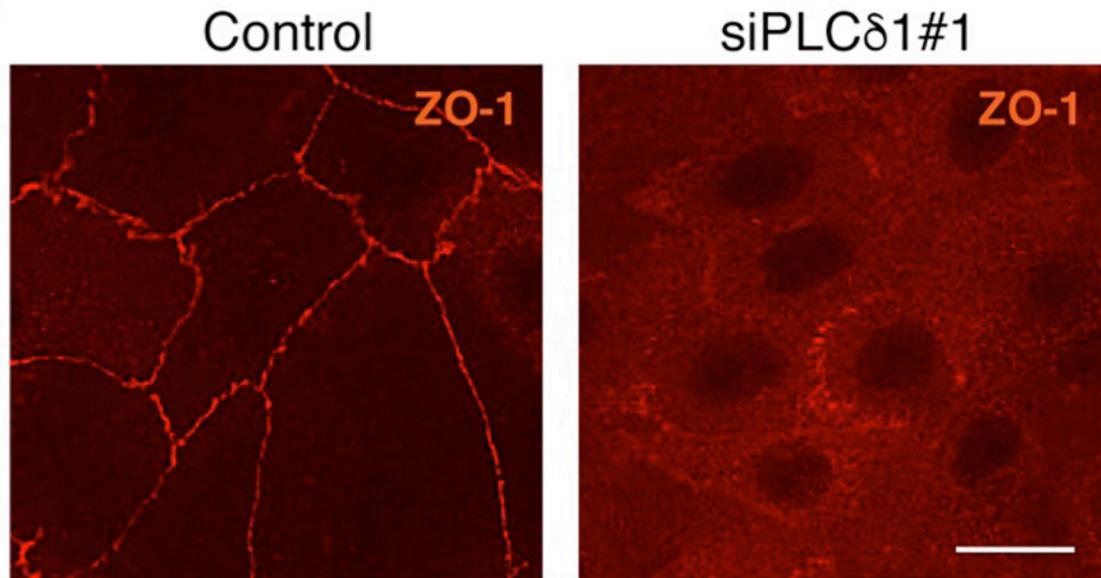


図3. *PLCδ1* 遺伝子発現抑制は、タイトジャンクションの形成不全を誘導する

タイトジャンクション構成タンパク質 ZO-1 の免疫染色像。正常なケラチノサイトではタイトジャンクション形成が見られるのに対し、*PLCδ1* 遺伝子発現抑制したケラチノサイトではタイトジャンクション形成が見られない。Scale bar = 50  $\mu$ m.

## 考 察

本研究では、リン脂質代謝のトリガーを引く要の酵素の1つ *PLCδ1* が細胞の増殖・分化を制御し、その破綻が上皮細胞の特徴である細胞接着の異常をもたらし、疾患を誘導するという仮説の検証を目的とした。

*PLCδ1* が細胞接着に重要な E-カドヘリンの発現を誘導し、大腸がん細胞の浸潤転移を阻害すること、大腸癌臨床検体で *PLCδ1* の発現が顕著に減少し、*PLCδ1* ががん抑制因子として機能していることを明らかにした。また *PLCδ1* の活性制御を受ける下流シグナル PKC アイソフォームの探索を行ったところ、大腸癌細胞において、*PLCδ1* は特定の PKC アイソザイムをそれぞれ活性化・不活性化することを見出した。今後こうした *PLCδ1* による大腸癌悪性化のメカニズムをより詳細に解明する事で、分子標的薬の開発に繋がる事が期待できる。

一方、*PLCδ1* 遺伝子の欠損又は発現抑制が表皮細胞の増殖・分化のバランスを崩し、表皮バリア機能の異常を引き起こす事が判明した。バリア機能の低下の原因として、角質バリアの形成に重要なフィラグリンの発現変化やタイトジャンクションの形成不全が生じていた。バリア機能の異常を示す皮膚疾患として乾癬やアトピー性皮膚炎が挙げられる。*PLCδ1* 遺伝子を表皮細胞で欠損すると乾癬様の皮膚炎を起こす事を報告してきたが、*PLCδ1* は乾癬・アトピー性皮膚炎などのバリア機能異常を示す炎症性皮膚疾患に深く関わる可能性が考えられ、治療ターゲットになる可能性が考えられる。

## 共同研究者

本研究の主な共同研究者は、東京薬科大学生命科学部ゲノム病態医学研究室の中村由和博士、佐藤礼子博士、米田敦子博士である。最後に本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深謝致します。

## 文 献

- 1) Y. Nakamura, Kiyoko Fukami. Roles of phospholipase C isozymes in organogenesis and embryonic development. *Physiology*.2009 Dec;24:332-41. doi: 10.1152/physiol.00031.2009. Review. PMID: 19996364
- 2) R. Satow, T. Hirano, R. Batori, T. Nakamura, Y. Murayama, K. Fukami. Phospholipase C delta 1 induces E-cadherin expression and suppresses malignancy in colorectal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Sep 16;111(37):13505-10. doi: 10.1073/pnas.1405374111. Epub 2014 Sep 2. PMID: 25197077

- 3) Y. Nakamura, K. Fukami, H. Yu, K. Takenaka, Y. Kataoka, Y. Shirakata, S. Nishikawa, K. Hashimoto, N. Yoshida, T. Takenawa. Phospholipase C  $\delta$  1 is required for skin stem cell lineage commitment. *EMBO J.* 2003 Jun 16;22(12):2981-91. PMID: 12805213
- 4) Y. Nakamura, M. Ichinohe, M. Hirata, H. Matsuura, T. Fujiwara, T. Igarashi, M. Nakahara, H. Yamaguchi, S. Yasugi, T. Takenawa, K. Fukami. Phospholipase C-  $\delta$  1 is an essential molecule downstream of Foxn1, the gene responsible for the nude mutation, in normal hair development. *FASEB J.* 2008 Mar;22(3):841-9. Epub 2007 Oct 15. PMID: 17938256
- 5) K. Kanemaru, Y. Nakamura, K. Sato, R. Kojima, S. Takahashi, M. Yamaguchi, M. Ichinohe, H. Kiyonari, G. Shioi, K. Kabashima, K. Nakahigashi, M. Asagiri, C. Jamora, H. Yamaguchi, K. Fukami. Epidermal phospholipase C  $\delta$  1 regulates granulocyte counts and systemic interleukin-17 levels in mice. *Nat Commun.* 2012 Jul 17;3:963. doi: 10.1038/ncomms1960. PMID: 22805570