

# 表皮ケラチノサイトの角化プロセスにおけるPLD/mTORシグナリングの関与

財団法人岐阜県研究開発財団岐阜県国際バイオ研究所

大口 健司

Calcium has been known to be a major factor for triggering the differentiation of keratinocytes. In the current study, the involvement of mammalian target of rapamycin (mTOR) in the regulation of calcium-induced differentiation was examined using normal human epidermal keratinocytes (NHEK). Treatment of NHEK with calcium was found to cause marked decreases in p70 ribosomal S6 kinase (p70S6K) phosphorylation level. The activity of mTOR is essential for phosphorylation of p70S6K and the treatment of NHEK with rapamycin, a potent inhibitor of mTOR effectively potentiated calcium-induced differentiation. Moreover, treatment of NHEK with rapamycin caused marked decreases in protein level of cyclin D1, a cell cycle regulator. These results indicate that mTOR would be involved in the calcium-induced differentiation by modulating the expression of cyclin D1 in NHEK.

## 1. 緒言

細胞は外来刺激を受けると固有の情報変換酵素が活性化され、様々なシグナル伝達系を介して細胞機能が発揮される。情報変換の引き金として、ホスホリパーゼに代表される脂質変換酵素の役割が重要であり、膜脂質の大部分を占めるホスファチジルコリンは、ホスホリパーゼD (PLD) により分解されホスファチジン酸 (PA) に変換される。PA自身、あるいはその変換体であるリゾPAやジアシルグリセロールは、種々のシグナル伝達分子の活性制御に関わる重要なセカンドメッセンジャーとして機能する。最近、mTOR (mammalian target of rapamycin) と呼ばれるタンパク質が、PLDの産生するPAによって直接的に活性化されることが報告された<sup>1)</sup>。mTORは、マクロライド系有機化合物ラパマイシン (rapamycin) の細胞内標的分子として同定されたセリン・スレオニンキナーゼであり、ターゲット分子のp70S6K (p70 S6 kinase) ならびに4E-BP1 (eIF4E-binding protein<sup>1)</sup>) を介して種々の細胞機能制御、特に細胞の分裂や成長 (サイズ) における調節因子として重要な役割を果たしている<sup>2)</sup>。mTORは、ある種のアミノ酸やPI3K/Akt経路によって活性が調節されることが知られていたが、PAがmTORのFRBドメインに結合することによっても活性化されることが明らかにされている<sup>1)</sup>。この作用はPA以外のリン脂質ではみられないことから、mTORの活性化はリン脂質の中でもPA特有の作用であり、新しいシグナル経路としてのPLD/mTORシ

グナリングの機能が注目されている。

これまでに我々は、種々の細胞機能制御におけるPLD/mTORシグナリングの関与について検証してきた。メラニン細胞がもつメラニン生合成機能 (メラノジェネシス) におけるPLDの関わりについて、マウスB16メラノーマ細胞系を用いて解析した結果、PLDアイソザイムのひとつであるPLD1の発現量および酵素活性がメラニン生成量と逆相関の関係にあることを突き止め、PLD1はメラノジェネシスのネガティブレギュレーターとして作働することを見出した<sup>3)</sup>。さらに、PLD1の作用メカニズムについて解析を行った結果、PLD1はmTORを介してチロシナーゼ (メラニン生合成過程の律速酵素) の発現をmRNAレベルから抑制することを明らかにした<sup>4)</sup>。

メラノジェネシスのみならず、PLD1が真皮線維芽細胞のもつコラーゲン産生機能の制御分子としても作用することを見出している<sup>5)</sup>。ヒト真皮線維芽細胞のPLD1遺伝子をノックダウンすると、mTOR活性の低下に伴い細胞外へのコラーゲン分泌が抑制されることが明らかとなった。PLD1ノックダウンによるコラーゲン産生の減弱は、細胞内のプロコラーゲン発現量の低下と相関しており、PLD1がmTORを介してコラーゲン合成を促進的に制御するという新知見を得ている<sup>5)</sup>。このように、PLD/mTORシグナリングは、各々の皮膚細胞がもつ重要機能の制御に関与することが明らかになってきた。

一方、皮膚の主要細胞であるケラチノサイト (表皮角化細胞) は、活発に増殖と分化を繰り返すユニークな特色をもつ。細胞分裂は基底層でのみ行われ、分裂によって生じた新しい細胞は上層へ移動しながら幾つかのステージを経て分化し、最終的にapoptoticな角質細胞となる。すなわちケラチノサイトの分化は、増殖→分化→終末分化 (角化) という一連のプロセスをみることができ、ケラチノサイトの分化を制御するシグナル伝達系にPLDが関与する可能性は、Bollagらにより報告されているが<sup>6,7)</sup>、その意義



Involvement of PLD/mTOR signaling in differentiation of human epidermal keratinocytes

Kenji Ohguchi

Gifu International Institute of Biotechnology

や分子機構は十分に明らかにされていない。また、ケラチノサイト分化シグナリングにおけるmTORの関与については知られていないのが現状である。そこで、ケラチノサイトの分化制御におけるPLD/mTORの関わりについて解析することを目的とし、本研究ではカルシウムによる角化誘導におけるmTORの関与について検証した。

## 2. 実験

細胞は、正常ヒト表皮ケラチノサイト(NHEK、クラボウ)を用いた。ケラチノサイト分化の制御機構にmTORが関わっているか否かについては、mTORの直下に位置するターゲット分子であるp70S6Kのリン酸化状態を指標に、カルシウムスイッチ(1.5mMカルシウム添加)による分化誘導系にて検証した。P70S6Kのリン酸化は、Phospho-p70S6K(Thr389) AntibodyおよびPhospho-p70S6K(Thr421/Ser424) Antibody(Cell signaling)を用いたウエスタンブロット法により検出した。

## 3. 結果および考察

### 3.1. カルシウムによるケラチノサイト分化誘導とp70S6Kのリン酸化レベルの変化

細胞外カルシウムは、ケラチノサイトの分化調節に重要な役割を演じている。実際に、表皮では基底細胞から上層に向かって高くなるカルシウムの濃度勾配が存在し、角化調節因子の重要因子と考えられている。NHEKの細胞外カルシウム濃度を上昇させると、角化が誘導され分化マーカーとして知られているinvolucrin(エンベロップ蛋白質)

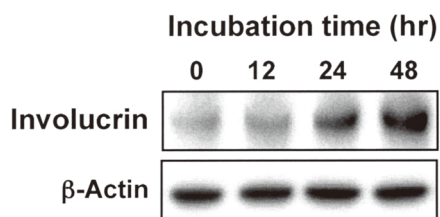


Fig.1 Induction of differentiation marker by calcium in normal human epidermal keratinocytes.

の発現増加がみられた(Fig. 1)。

次に、カルシウムによる分化誘導後のmTOR活性の変動について、mTORの代表的なターゲット分子であるp70S6Kのリン酸化レベルを指標に調べた。リン酸化タンパク質に特異的な抗体(2種類)を用いたウエスタンブロット法により、分化誘導後のリン酸化p70S6Kの経時変化を解析した。Fig. 2に示すように、2種類の抗体により検出したp70S6Kのリン酸化レベルは、分化誘導直後から低下が見られた。両者の変化には若干のタイムラグがあり、Thr389の脱リン酸化は分化誘導5分後から、Thr421/Ser424の脱リン酸化は分化誘導10分後から起こることが分かった。また、両者の脱リン酸化状態は一過性であるが、Thr389においては60分後には定常レベルに戻るのに対し、Thr421/Ser424はリン酸化レベルの低い状態が24時間後まで続いた。

Extracellular signal-regulated kinase(ERK)もカルシウムによる分化誘導に伴いリン酸化レベルが低下することが報告されている。Fig. 3に示すように、p70S6K(Thr389)とほぼ同様の挙動を示したが、脱リン酸化の回復時間や程度に相違がみられたことから、mTOR経路との連係(相互のクロストーク作動機構)解析が今後の課題である。

### 3.2. カルシウムによるケラチノサイト分化誘導に対するmTOR阻害の影響

ケラチノサイト分化の制御機構におけるmTORの関与とその意義を明確にするために、カルシウムによる分化誘導に対するラパマイシン(mTORの選択的阻害剤)の影響

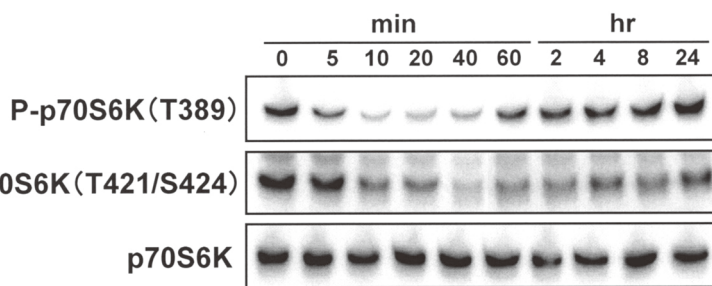


Fig.2 Changes in phosphorylation levels of p70S6K during calcium-induced differentiation in normal human epidermal keratinocytes.

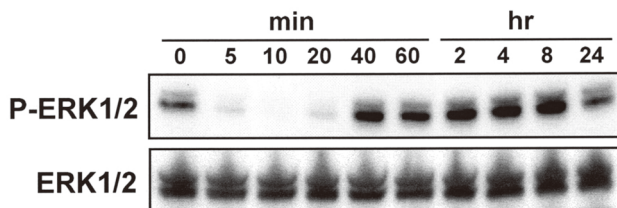


Fig.3 Changes in phosphorylation levels of ERK1/2 during calcium-induced differentiation in normal human epidermal keratinocytes.

を検証した。ラパマイシンの添加により involucrin の発現に変化はみられなかったが、ラパマイシン存在下にて高カルシウム処理した細胞では、involucrin 発現が増強しており、mTOR を阻害することで分化誘導がより促進されることが示された (Fig. 4)。すなわち、mTOR はカルシウムによる分化誘導シグナリングにおいてネガティブレギュレーターとして作動している可能性が示唆された。

### 3. 3. カルシウムによるケラチノサイト分化誘導に伴う cyclin D1 発現レベルの変化

Cyclin D1 は、細胞周期の G1 期から S 期への進行因子であることから、その発現量を減少させることで、増殖から分化へのスイッチ切り替えに寄与する重要な因子として知られている。NHEK におけるカルシウム分化誘導に伴う cyclin D1 発現の変化を調べたところ、p70S6K の脱リン酸化がみられた直後から、顕著なダウンレギュレーションがみられた (Fig. 5)。

### 3. 4. Cyclin D1 のダウンレギュレーションにおける mTOR の関与

ケラチノサイト分化誘導に伴う cyclin D1 のダウンレギュレーション機構における mTOR の関与を調べるために、cyclin D1 のタンパク質発現に対するラパマイシンの影響を検証した。その結果、ラパマイシンの添加により cyclin D1 の発現が減少した (Fig. 6)。すなわち、カルシウムによる分化誘導シグナリングにおける mTOR のネガティブレギュレーターとしての機能は、cyclin D1 発現の調節に起因する可能性が示唆された。

## 4. 総括

PLD/mTOR シグナリングは、新しい細胞内シグナル伝達経路として注目されている。これまでに、サバイバル

(抗アポトーシス) や細胞成長 (サイズ) の制御などに関与することが報告されているが、細胞分化への関わりはあまり知られていない。本研究では、mTOR 経路を中心としたシグナリングの視点からケラチノサイト特有の分化プロセスである角化の制御機構について解析した。その結果、分化誘導後の cyclin D1 のダウンレギュレーションに mTOR が関わっている可能性が示唆された。分化誘導初期にみられる p70S6K の脱リン酸化機構については不明であるが、mTOR 活性の阻害 (上流シグナルの遮断) あるいは p70S6K をターゲットとする脱リン酸化酵素 (ホスファターゼ) の活性化が考えられることから、mTOR に対する siRNA を用いた検証などから明らかにしていきたい。ケラチノサイトの分化異常は、種々の角化異常症のみならず皮膚の自然老化現象としても頻繁に観察される。これらの発症に、これらのシグナリング異常が関与する可能性もあり、今後の検討課題としたい。

## 謝 辞

本研究にご助成頂きました財団法人コスメトロジー研究振興財団に心よりお礼申し上げます。

## (引用文献)

- 1) Fang Y, Vilella-Bach M, Bachmann R. et al. Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science*, 294, 1942-1945 (2001)
- 2) Fingar DC, Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene*, 23, 3151-3171 (2004)
- 3) Ohguchi K, Banno Y, Akao Y. et al. Involvement of phospholipase D1 in melanogenesis of mouse B16 melanoma cells. *J Biol Chem*, 279, 3408-3412 (2004)

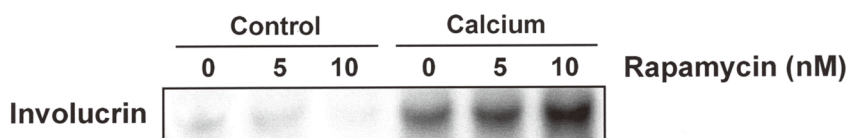


Fig. 4 Effects of rapamycin on calcium-induced differentiation in normal human epidermal keratinocytes.

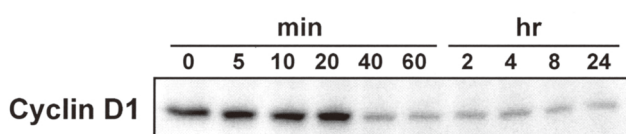


Fig. 5 Changes in expression of cyclin D1 during calcium-induced differentiation in normal human epidermal keratinocytes.

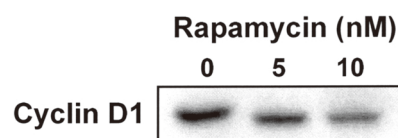


Fig. 6 Effects of rapamycin on cyclin D1 expression in normal human epidermal keratinocytes.

- 4) Ohguchi K, Banno Y, Nakagawa Y. et al. The negative regulation of melanogenesis by phospholipase D1 through mTOR/p70 S6 kinase 1 signaling in mouse B16 melanoma cells. *J Cell Physiol*, 205, 444-451 (2005)
- 5) Ohguchi K, Banno Y, Akao Y. et al. Involvement of phospholipase D1 in collagen type I production of human dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 348, 398-402 (2006)
- 6) Bollag WB, Zhong X, Dodd ME. et al. Phospholipase D signaling and extracellular signal-regulated kinase-1 and -2 phosphorylation (activation) are required for maximal phorbol ester-induced transglutaminase activity, a marker of keratinocyte differentiation. *J Pharmacol Exp Ther*, 312, 1223-1231 (2005)
- 7) Bollag WB, Xie D, Zheng X. et al. A potential role for the phospholipase D2-aquaporin-3 signaling module in early keratinocyte differentiation: production of a phosphatidylglycerol signaling lipid. *J Invest Dermatol*, 127, 2823-2831 (2007)