

紫外線曝露による皮膚老化・発癌において ミトコンドリア関連分子が果たす役割を解明する

北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室

柳 輝 希

Mitochondria exerts a central function in various cellular responses, and repeats fusion and division to change their morphology. In recent years, a group of GTP hydrolases involved with fusion and division of mitochondria has been identified. Mitofusin (Mfn) 1, Mfn 2, and OPA 1 are involved in the process of fusion, and DRP 1 (Dynamain Related Protein 1) is involved in the division process. Although it has been reported that DRP 1 is essential for maintaining the cell division of malignant tumors such as malignant melanoma, the molecular function in ultraviolet-related carcinogenesis of keratinocytes is unknown. Herein we conducted experiments using clinical specimens and cultured cells to analyze the function of DRP 1 in skin aging, UV-related skin disorders and cutaneous squamous cell carcinoma (SCC). We investigated cell proliferation, cell cycle, mitochondrial morphology, and MAPK signaling pathway using cutaneous SCC A431 and DJM1 cells that were transfected with shRNA vectors targeting Drp 1. The Drp 1 gene-knockdown SCC cells showed lower cell proliferation than scramble control cells, as assessed by direct cell counting and clonogenic assays. DNA content analysis showed Drp 1 knockdown to cause G2/M arrest. Morphologically, the depletion of Drp 1 resulted in an elongated, hyper-fused mitochondrial network. The MEK inhibitor PD325901 suppressed cell proliferation, as well as inhibiting the phosphorylation of ERK 1/2 and Drp 1 (Ser616). Also, PD325901 caused the dysregulation of the mitochondrial network. In tumor xenografts of DJM1 cells, the knockdown of Drp 1 suppressed tumor growth in vivo, and clinically, the expression levels of Drp 1 were higher in cutaneous SCCs than in normal epidermis, and correlated positively with the advanced clinical stages. Our findings suggest that the mitochondrial division-related molecule “DRP 1” may become a new biomarker in cutaneous SCC as well as a novel therapeutic target.

1. 緒 言

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だすオルガネラであり、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。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。融合にはMitofusin (Mfn) 1、Mfn2、OPA1、分裂にはDRP1 (Dynamain Related Protein 1)が関与する(図1)¹⁾。また、DRP1が悪性黒色腫などの悪性腫瘍の細胞分裂維持に必須であることが報告された²⁾。しかしながら、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。本研究では、紫外線発癌および皮膚老化(特に紫外線による光老化・皮膚障害)におけるミトコンドリア分裂関連分子DRP1の機能について、各種実験を行った。

高齢化のすすむ現代、皮膚癌の頻度は増加の一途をたどっている。有棘細胞癌(Squamous cell carcinoma、以下SCCと略す)は表皮由来の皮膚癌の一種であり、その発生率は高齢化とともに近年増加している。SCCの発生には

ミトコンドリアの融合と分裂

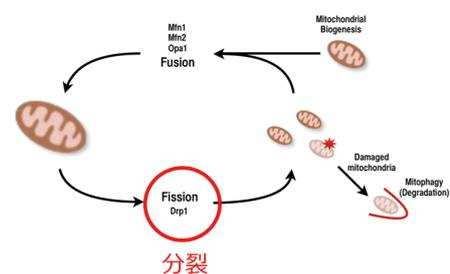


図1 ミトコンドリアは融合と分裂を繰り返している。DRP1は分裂を制御する。

紫外線、慢性的な炎症、機械的刺激、ウイルス、放射線などが関与する。なかでも、紫外線の関与は大きく、本邦でもSCCの6割が日光露光部に発生し、ますますSCCの発生数が増加することが予想されている。SCCは、日光角化症、Bowen病、熱傷瘢痕、慢性膿皮症などの先行病変の上に発生し、はじめのうちは小丘疹～結節として生じるが、増大すると腫瘍や難治性の潰瘍などを形成するようになる。さらに巨大になると、しばしばカリフラワー状と形容され、表面が乳頭状の腫瘍性病変を呈する。また、角質や痂皮、あるいは壊死組織などを付着し、細菌の二次感染を来たして、悪臭を伴うものも多く、患者のQOL (Quality of Life) を大幅に損ねることも多い。病理組織学的には、表皮と連続した異型細胞が、個細胞角化や細胞の配列の乱れ、核異型・細胞分裂・癌真珠などを形成しながら増殖する。未分化になるほど、角化傾向が少なくなり、浸潤・増



Functions for mitochondrial molecules in skin aging and tumorigenesis

Teruki Yanagi

Department of Dermatology, Faculty of Medicine and Graduate school of medicine, Hokkaido University

殖能も強く、一般的には予後が悪くなる。SCCは、低悪性度のうちは、外科的切除で根治が期待できるが、転移を伴うような進行例になると、化学療法にしばしば抵抗性を示し、治療に難渋することも少なくない。リンパ節転移を認める症例においては、リンパ節郭清を根治的に行うこともあり、外科的切除以外には放射線療法や化学療法などの集学的治療が行われる。近年では、Epidermal growth factor receptor 阻害剤や種々の免疫チェックポイント阻害薬を用いた治療などが試みられている。しかしながら、進行期のSCCにおいては、治療の選択肢は未だ限定的であり、さらなる治療の研究開発が望まれている。

2. 方法

2.1. 皮膚有棘細胞癌腫瘍部におけるDRP1の発現解析(免疫染色)

北海道大学皮膚科にて治療歴のある皮膚有棘細胞癌30例について、抗DRP1抗体(BD611133)を用いて、免疫染色を行った。ホルマリン(Wako)固定パラフィン切片を4 μ mの厚さで切り出して、免疫染色を施行した。同一観察者(筆者)によりスコアリングは行い、別視野で少なくとも3回それぞれ100個の細胞をランダムに選択して評価した。免疫染色スコアは、proportional score(免疫強度; 0なし, 1 0-25%, 2 25-50%, 3 50-75%, 4 > 75%)、intensity score(染色強度; 0なし, 1 弱陽性, 2 中等度陽性, 3 強陽性)の2つのパラメータの和で算出した。

2.2. RNA干渉を用いたDRP1ノックダウンによる皮膚有棘細胞癌株の表現型観察

ヒト有棘細胞癌株A431細胞、DJM1細胞、シグマ社pLKO-shRNAシステムを用いてノックダウン実験を実施した。継続的なDrp1のノックダウンには、レンチウイルスを用いたshort-hairpin RNA(以下shRNAと略す)を使用した。細胞のセレクションはpuromycinにより行った。20%コンフルエントになるようにあらかじめ293FT細胞(Invitrogen, R700-07)を播種しておき、24時間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした後、20 μ molのshRNA vector(pLKO-423, 426, 1097, scrambled-puromycin, 1 μ g/mL) 3 μ LとDNAmix(pLP1, pLP2, pVSVG, 各1 μ g/mL) 9 μ Lをそれぞれ1mLのOpti-MEMで溶解し、さらにPolyethylenimine(以下PEIと略す) 15 μ Lを加えてよく混合し、室温で15分静置した。この混合液を、準備した293FT細胞に添加し、24時間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。トランスフェクション効率を確認するため、コントロールとしてenhanced green fluorescent protein(以下EGFPと略す)で標識したプラスミドのpcDNA3-EGFP(1 μ g/mL) 3 μ Lと、PEI 15 μ Lを1mLのOpti-MEMに混合し、室温で15分静置した混合液を293FT細胞に添加し、

24時間インキュベートして準備した。24時間後に蛍光顕微鏡でgreen fluorescent protein(以下GFPと略す)がどのくらいの割合で入っているかを視認し、トランスフェクション効率を確認した。また、A431、DJM1細胞を6cmディッシュに30%コンフルエントになるように播種しておき、24時間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。293FT細胞から得られたウイルス上清は、45 μ mフィルタを通して回収した。播種しておいたA431、DJM1細胞にウイルス上清を1mLずつ添加し、puromycin(最終濃度1 μ g/mL)を培地に加えて培養し、ウイルス産生細胞株を樹立した。以後、培養液にはpuromycinを添加してセレクションをかけて培養した。

2.3. DRP1ノックダウン時の、ミトコンドリア形態の観察

MitotrackerRedFM(Invitrogen)とBZ-9000(キーンズ社)にて、ミトコンドリア形態の観察を行った。ミトコンドリアの形態はMito Tracker Red(ThermoFisher)を用いて、蛍光染色を行い観察した。観察細胞をPBSで十分に洗浄した後、Mito Tracker Redを1 μ L添加し、37 $^{\circ}$ Cで30分静置した。その後、Phenol redの入っていないDMEM(Life Technology)を添加した。観察顕微鏡には、BIOREVO BZ-9000(KEYENCE)およびFluoview FV10i(Olympus)を使用した。ミトコンドリアの形態は、ミトコンドリア1つあたりの面積で評価した。ミトコンドリアの面積は、画像解析ソフトImage J(developed by Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD; available at <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>)を用いて導出し、定量化した。

2.4. DRP1活性化機構の解明

MEK阻害剤(PD325901)を0, 0.5, 1, 5, 10, 50 μ Mの濃度で添加し、RIPA Bufferにて細胞内タンパクを抽出し、SDS-PAGE・免疫ブロット法を実施した。Drp1、MEK阻害剤としてMdivi-1(Santa Cruz Biotechnology)およびN-difluoro-2-benzamide(以下PD325901と表記, Cayman Chemical)を使用した。Mdivi-1は分子量が353.22であり、まず5mgをDMSO 1.416mLに溶かして10mMの濃度になるように調整した。本剤を使用している論文では、10-50 μ Mの濃度で投与しているため、さらに希釈して各濃度のMdivi-1を調整した。またPD325901は分子量が482.2であり、5mgをDMSO 1.037mLに溶かして10mMの濃度になるよう調整した。本剤は10-100 μ Mで使用されており、これを希釈して各濃度の調整を行った。阻害剤の添加については、40-50%コンフルエントになるように対象細胞を10cmまたは6cmシャーレに播種しておき、対象濃度の1000倍に調整したMdivi-1およびPD325901を10cmシャーレでは10 μ L、6cmシャーレで

は5 μ Lそれぞれ添加した。コントロール群ではDMSOを投与した(最終DMSO濃度が0.1%になるように調整)。

2.5. DRP1 阻害剤による皮膚有棘細胞癌治療

DRP1 阻害剤 (Midivi-1, Santa Cruz) を使用して有棘細胞癌株への治療実験を実施した。

2.6. ATP 活性測定法を用いた Cell viability assay

対象となる細胞の細胞数を Cell counter (TC10TM, Bio-Rad) で測定した後、96 ウェルプレートに5000-10000 個/100 μ L・ウェルになるように細胞を播種した。このとき、熱による物理的的刺激を避けるため、播種したウェルの外側のウェルにもPBSを100 μ Lずつ分注・静置した。48時間37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした後、Cell titer glo solutionを各ウェルに100 μ Lずつ加えてピペッティングでよく混濁し、室温で遮光しながらさらに15分インキュベートした。各ウェルの混合液を観察用のwhite 96 well plateにそれぞれ移し換えた後、吸光度をSpectra Max Paradigm (Molecular Devices)を用いてそれぞれ測定した。

2.7. 細胞増殖アッセイ

細胞を6cmディッシュに 1.0×10^5 個ずつ播種し、37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。1、3、5、7日後にPBSで洗浄し、750 μ Lの0.25% Trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific)をそれぞれ加えて、6分間37 $^{\circ}$ Cで静置して細胞をディッシュから剥がし、細胞の計測を行った。

Dead cell ratioの測定においては、死細胞を含む上清培養液を一度ファルコンチューブに集めておき、0.25% Trypsin-EDTAで細胞を剥がしたあとで、集めておいた培養液で再懸濁を行った(HPEKpの細胞株においては、上清のCnT-PRを一度回収し、Trypsin-EDTAの反応を10%FBS添加PBSでアンインキュベートし、遠心して上清を吸引した後、避けておいたCnT-PRで再懸濁した)。その後、細胞数を測定し、「dead cell ratio = (全細胞数 - 生細胞数) / (全細胞数) \times 100」として導出した。

2.8. コロニー増殖アッセイ

35mmの6ウェルプレートに、対象細胞を 5.0×10^2 個ずつ播種し、14日間37 $^{\circ}$ Cで静置した。培地は7日目に1度交換した。PBSで2回洗浄した後、70%エタノールを各ウェルに1.5mLずつ添加して30分間室温で静置し固定した。エタノールをすべて除去し、0.5% crystal violet dye (100mLあたり、0.5g crystal violetを25mlメタノールおよび75mLの滅菌水に溶解して精製)を各ウェルに1.5mLずつ添加し、30分室温で静置しコロニーの染色を行った。水道水で洗浄し、直接目視によりコロニー数を計測した。コロニーは最低50個以上の細胞数があるものを有意とみなした。

2.9. ウェスタンブロット

2.9.1. ライセートの回収

Lysed bufferには、RIPA buffer (50mM Tris pH7.5, 150mM NaCl, NP40 1%, sodium deoxycholate 0.5%, SDS 0.1%, NaF, final concentration 1nM, NaV3O4, final concentration 10 μ M, Roche)を使用した。対象細胞をPBSで2回洗浄した後、RIPA bufferを添加し、氷上で30分静置した。次に、セルスクレーパーを用いて各ウェルの表面を擦過し、融解液をすべて2mLのエッペンチューブに回収した。4 $^{\circ}$ C、15000rpmで20分遠心した後、上清を回収して別のエッペンチューブに移し、NuPAGE LDS Sample Buffer (lithium dodecyl sulfate, pH8.4, Invitrogen)、NuPAGE Sample Reducing Agent (500mM dithiothreitol at a ready-to-use 10x concentration, Invitrogen)を加え混和し、ライセートを回収した。

2.9.2. 電気泳動、転写、ブロッキング

回収したライセートは、70 $^{\circ}$ Cで10分間ボイルしてヒートブレイクした後、マーカーとともにSDS-PAGE5-10% Gel (Invitrogen)にセットした。バッファーにはMOPS SDS Running Buffer (#1908733, Life Technology)を使用し、電気泳動を行った。その後、iBLOT2 (Invitrogen)でpolyvinylidene difluoride membranes (Invitrogen)に転写した。転写したメンブレンは、5%スキムミルク (Wako)溶解1xTBS-T (20mM Tris, 150mM NaCl, 0.1% Tween20)に浸し、室温で揺らしながら60分間ブロッキングを行った。

2.9.3. 1次抗体、2次抗体による酵素抗体反応

上述の抗Drp1抗体 (mouse, #611113, BD Transduction Lab)、抗Drp1Ser616抗体 (rabbit, #611738, Cell Signaling Technology)、抗ERK1/2抗体 (rabbit, #4695, Cell Signaling Technology)、抗ERK1/2リン酸化抗体 (rabbit, #9191, Cell Signaling Technology)、抗CDK1抗 (mouse, #610037, BD Biosciences)、抗CDK2抗体 (mouse, #610145, BD Transduction Lab)、抗phospho-histone H3抗体 (rabbit, #3377, Cell Signaling Technology)、抗 β -actin抗体 (mouse, #A5441, Sigma)を1次抗体として使用し、4 $^{\circ}$ Cで揺らしながら、抗原抗体反応を行った。1xTBS-Tで20分3回洗浄した後、HRP標識ウマ抗マウスIgG抗体およびHRP標識抗ラビットIgG抗体 (Cell Signaling Technology)を2次抗体として60分間室温で抗原抗体反応させた。再度1xTBS-T3回洗浄した後、Image Quant LAS4000 (GE Healthcare)で撮像した。

2.10. 細胞周期解析

細胞周期はpropidium iodide DNA stainingを行い、fluorescence-activated cell sorting (以下、FACSと略す)により解析した。PI solution (Wako)はPBS 1000 μ Lあた

り TritonX-100 1 μ L, RNaseA 20 μ L, PI 20 μ L をそれぞれ添加して調製した。対象細胞は 10cm ディッシュで培養し、PBS で洗浄した後、1mL の 0.25% trypsin-EDTA を加え、37°C で 6 分間インキュベートした。血清培地を 9mL 添加して懸濁し、ファルコンチューブに全量を回収して 1000rpm, 室温で 3 分間遠心した。上清をアスピレーション後、PBS 5mL で再懸濁した後、1000rpm, 室温で 3 分間再遠心し、上清をすべて除去した。70% エタノール 5mL を添加し、サンプルを固定し 4°C に静置した。次に、サンプルを 1000rpm, 室温で 3 分間遠心した。エタノールを除去し、さらに PBS で 2 度洗浄した。次に PI solution をそれぞれ 500 μ L ずつ添加し、37°C で 15 分インキュベートした。FACS には、AriaIII (BD Biosciences) を使用し、縦軸に細胞数を、横軸に Phycoerythrin (PE) を設定した状態で、サンプル数を 10000 カウントし、ヒストグラムを描出した。

2. 11. In vivo 異種移植モデル (Xenograft)

5 週齢、メスの BALB/cAJcl-nu/nu (CLEA) を用いて実験を行った。マウスは北海道大学医学部の動物実験施設にて管理され、搬入されたマウスは少なくとも 5 日間当施設で飼育し、環境に適応したことを確認して実験に用いた。尚、本研究の動物実験申請については、ヘルシンキ宣言に基づき、当院動物実験承認機関で審査承認済である。移植する細胞株は、scrambled shRNA/shRNA#3 をトランスフェクションした DJM1 細胞を選択した。移植部位 1 か所あたり 5×10^6 個の細胞を使用した。対象細胞は PBS で洗浄後、0.25% Trypsin-EDTA を加えて 37°C で 6 分間静置し、DMEM を 9cc 加えて懸濁した。その後、懸濁液を全てファルコンチューブに回収し、1000rpm で室温で 3 分間遠心させ、上清を全て吸引し、PBS で再懸濁した。細胞の個数を測定し、1 箇所あたり少なくとも 5×10^6 個の細胞数になるように PBS を加えてトータル 200 μ L に調整した。この混合液を 1cc の注射器 (27G 針) に吸引し、氷上で保存した。これらを速やかにヌードマウスの両側側腹部に皮内注射して異種移植し、Xenograft を作成した。その後、経時的に腫瘍の動態を観察した。

Drp1 阻害剤添加の実験においては、腫瘍の長径が 5-7mm になった時点で、1.75mg の Mdivi-1 (Santa Cruz Biotechnology) を DMSO 25 μ L に溶解したものを、腫瘍に直接局所注射した。コントロール群には、25 μ L の DMSO を投与した。術後、腫瘍の長径・短径を 1 日おきに測定し、腫瘍の容積を“(1/2) × (長径) × (短径)²”で近似して導出した。移植後 15 日目に頸椎脱臼法によりマウスを安楽殺し、ピンセットと眼科用曲尖を用いて、生着していた皮下の腫瘍を周囲の軟部組織から剥離しながら摘出した後、腫瘍の重量を測定した。摘出した腫瘍組織は、十

分量のホルマリンで固定した後、パラフィン切片を作成し、Hematoxylin and Eosin (HE) 染色により病理組織学的解析を行った。また免疫染色として、Ki-67 染色および TUNEL 染色を行った。免疫染色の評価には、100 か所あたりの陽性細胞を異なる視野で 5 回カウントし、その平均値を免疫染色陽性細胞率として算出した。

なお、侵襲を伴う処置については、麻酔下に施行した。麻酔はイソフルレン (Abbi) による吸入麻酔と、抱水クロラル (Wako) の腹腔内投与 (300mg/kg) を併用した。また、鎮静剤として術後 3 日間はアスピリン (Wako) の経口投与 (150mg/kg) を行った。

3. 結果

3. 1. DRP1 は皮膚有棘細胞癌部で高発現している

51 検体 (紫外線発癌が疑われる「露光部」) の皮膚有棘細胞癌 Squamous cell carcinoma: SCC および正常皮膚) を用いた免疫染色を行ったところ、これらの腫瘍部分においてミトコンドリア分裂因子である DRP1 の発現が亢進していた (図 2)。

3. 2. DRP1 ノックダウンは有棘細胞癌の増殖を抑制する

皮膚有棘細胞癌細胞 A431 細胞、DJM1 細胞において RNAi 法 (shRNA) を用いた DRP1 遺伝子発現ノックダウンを実施した。2・3 種類の塩基配列にて DRP1 のノックダウンを行ったところ、蛋白レベルで 90% 以上のノックダウン効率を認めた (図 3)。これらの細胞について、細胞増

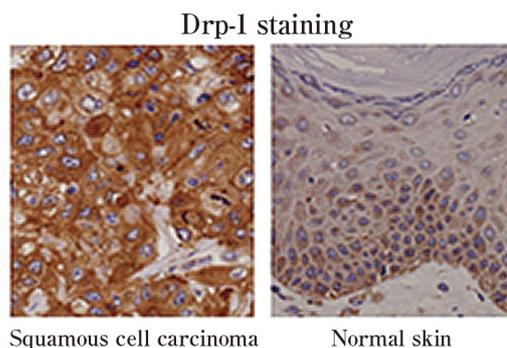


図 2 皮膚有棘細胞癌では DRP1 発現が亢進している。

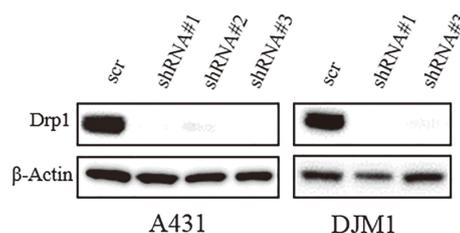


図 3 皮膚有棘細胞癌細胞株 A431 および DJM1 細胞に対して、DRP1 ノックダウンを行った (J Dermatol Sci, 88; 298-307, 2017)。

殖能をセルカウントにて評価したところ、DRP1 ノックダウン群は、コントロールに比べて有意に増殖能が抑制された (図4)。さらにノックダウン細胞のClonogenic assayを行ったところ、同様にDRP1 ノックダウン細胞にて細胞増殖

の抑制が認められた(図5)。次に、DRP1 阻害剤(Mdivi-1, 0-100 μ M) を添加したところ、濃度依存性に細胞増殖が抑制された (Cell viability assay, Clonogenic assay, 図6)。次に、細胞増殖抑制機序を解明するためFACSを用いた

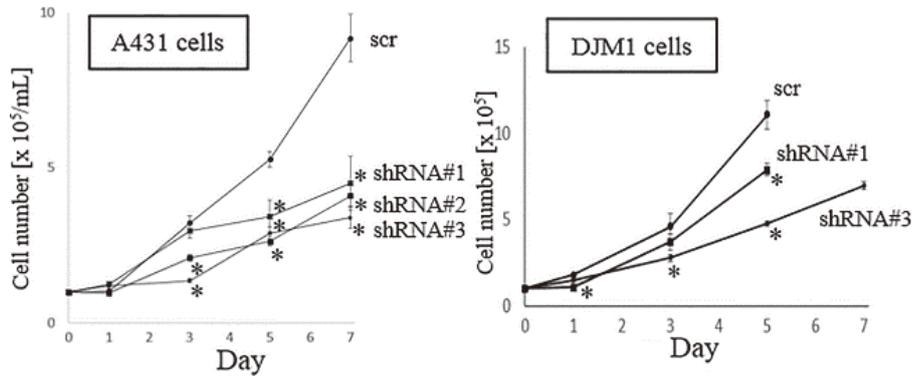


図4 DRP1 ノックダウン細胞は細胞増殖が抑制される (J Dermatol Sci, 88; 298-307, 2017)。

Clonogenic assay

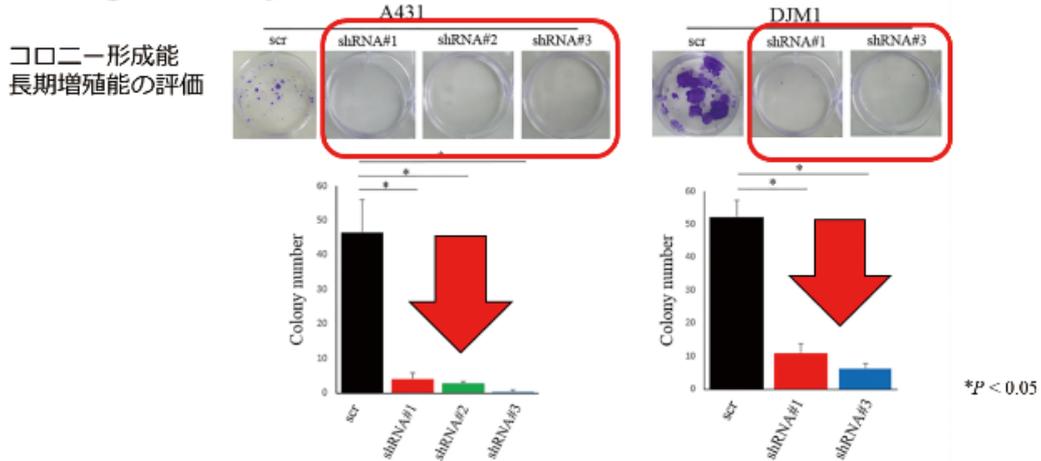
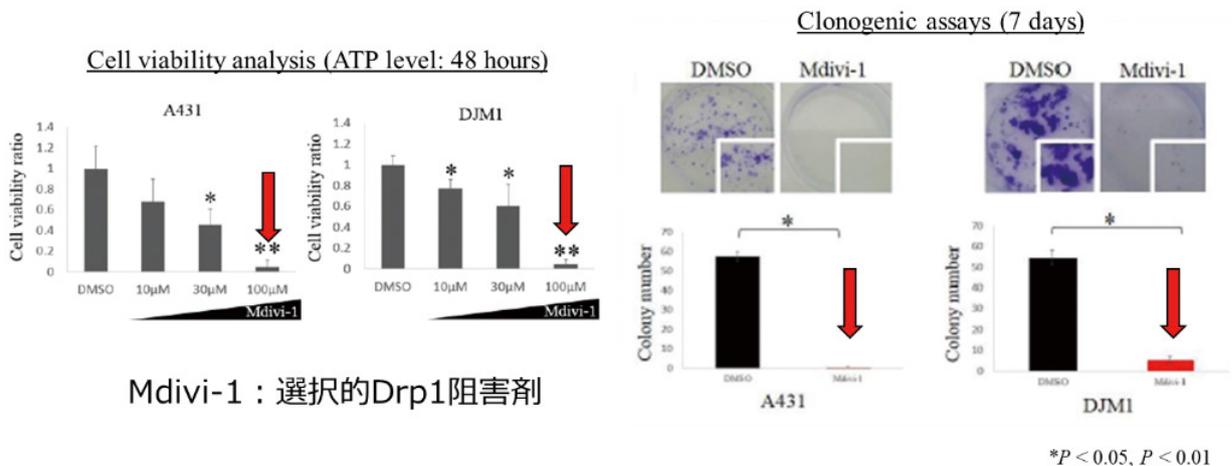


図5 DRP1 ノックダウン細胞株を用いた Clonogenic assay (J Dermatol Sci, 88; 298-307, 2017 を改変)。



Mdivi-1 : 選択的Drp1阻害剤

図6 有棘細胞癌株に対する Mdivi-1 を用いた DRP1 阻害実験 Mdivi-1 投与によって細胞増殖が抑制された (J Dermatol Sci, 88; 298-307, 2017)。

細胞周期解析を実施したところ (DNA contents analysis)、DRP1 のノックダウン細胞では、G2/M期の細胞の割合が多くなっており、さらにphospho histone H3の発現レベルから、G2期における細胞周期の停止と考えられた(図7)。

3. 3. Drp1の欠損は、長いミトコンドリアネットワークを誘導する

Mitotracker (Thermo Fisher Scientific)をもちいてミトコンドリアの形態学的評価を実施した。その結果、DRP1のノックダウン細胞およびDRP1阻害剤を加えた細胞では、コントロールに比べて長いネットワーク構造を呈した

ミトコンドリアが観察された(図8)。以上より、DRP1が皮膚有棘細胞癌においてもG2/M期のミトコンドリアの分裂に関与しており、DRP1の欠損あるいは阻害によって分裂不全となることが示唆された。

3. 4. MAPK経路によりDrp1は活性化する

DRP1は増殖シグナルの一つであるMAPK経路を介して活性化するという既報告がある²⁾。そこで、私たちが皮膚有棘細胞癌においてMAPK経路について観察したところ、経路の上流に位置するMEK阻害剤を添加すると、その下流にあるERKと同調してDRP1のリン酸化Ser616が

Cell cycle analysis (DNA contents)

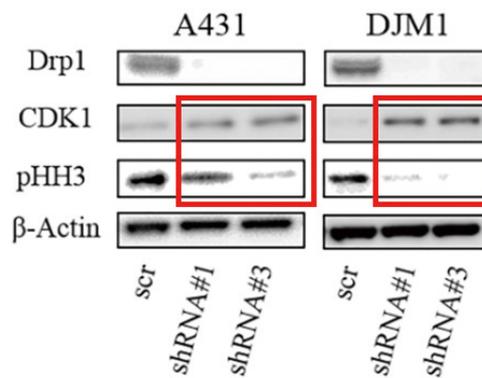
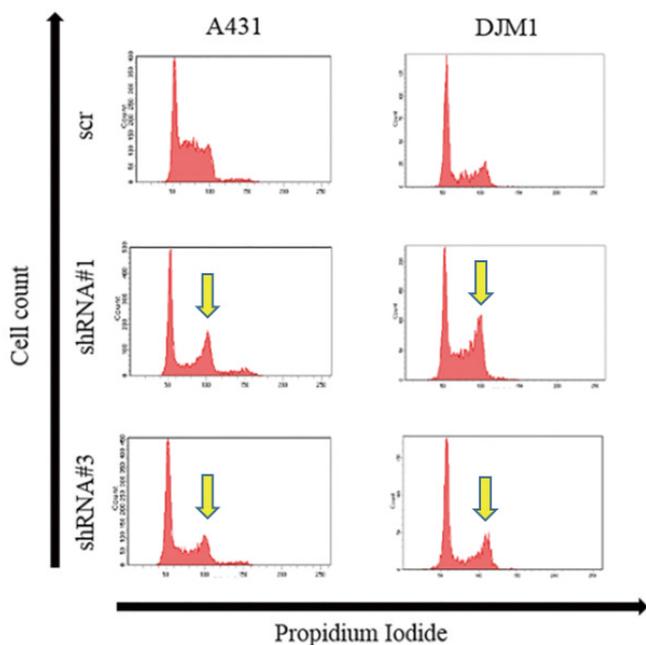


図7 DRP1 ノックダウンによって、G2/M期での細胞周期の停止が認められる (J Dermatol Sci, 88; 298-307, 2017 を改変)。

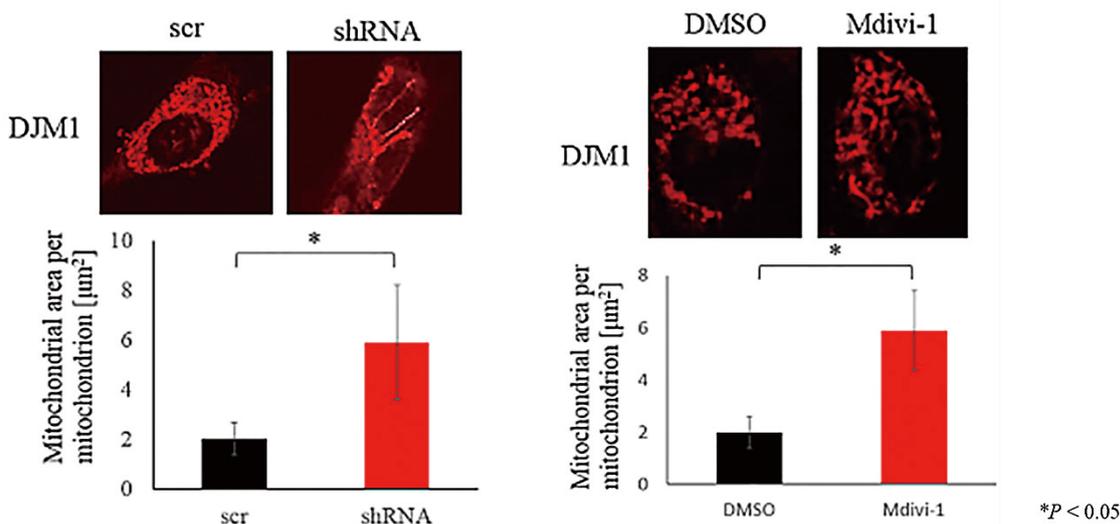


図8 DRP1 ノックダウンによってミトコンドリア形態が変化する (J Dermatol Sci, 88; 298-307, 2017)。

阻害された。この結果から、DRP1はMAPK経路を介して活性化されることが解明された(図9)。

3.5. 異種皮下移植モデルにおいて有棘細胞癌の細胞増殖はDrp1欠損により抑制される

ヌードマウスの皮下に皮膚有棘細胞癌DJM1細胞を投与して異種移植を行い、腫瘍の動態について観察したとこ

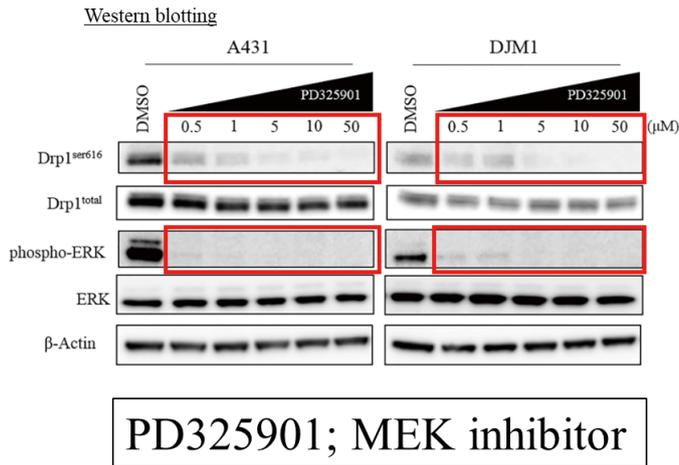


図9 MEK阻害剤によってDRP1のリン酸化が抑制される(J Dermatol Sci, 88; 298-307, 2017)を改変。

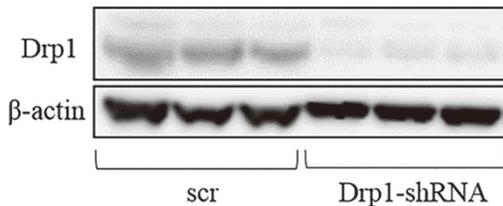


図10 異種皮下移植後の組織抽出物を用いた、免疫ブロット法(J Dermatol Sci, 88; 298-307, 2017)

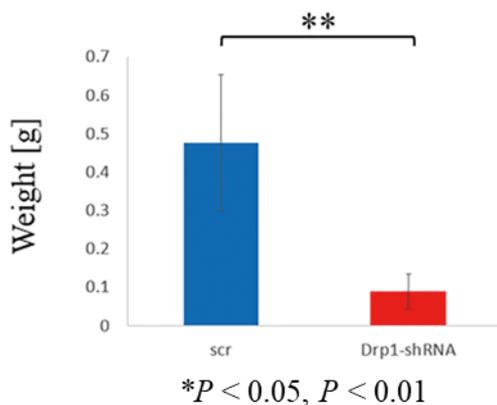


図12 DRP1ノックダウン腫瘍細胞は生体内でも細胞増殖が抑制された(腫瘍重量)(J Dermatol Sci, 88; 298-307, 2017)。

ろ、DRP1のKD群では、有意に細胞の増殖が抑制された。同様に、DRP1阻害剤を腫瘍内に局所注射した、腫瘍の動態を観察したところ、DRP1阻害剤添加により、腫瘍の増殖が抑制された(図10-12)。

4. 考察・まとめ

本研究では、皮膚有棘細胞癌では、他の癌種でも報告されているように、DRP1は細胞の増殖、細胞周期、ミトコンドリアの分裂などを調整していることが分かり、有棘細胞癌の新規治療ターゲット分子の候補となりうる可能性が示唆された(図13)³⁾。

肺癌、転移性乳癌、神経芽細胞腫、結腸直腸癌、膵臓癌、および黒色腫を含むいくつかの癌の細胞において、DRP1の高発現または活性化の更新が観察されている。例えば、Rehmanらは、DRP1の喪失は肺癌細胞増殖の減少および自発的アポトーシスの増加をもたらすことを報告した⁴⁾。

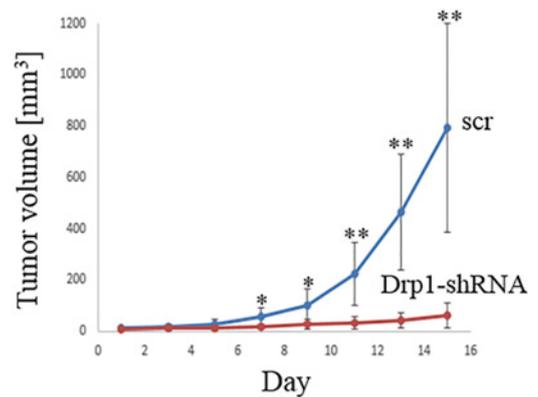


図11 DRP1ノックダウン腫瘍細胞は生体内でも細胞増殖が抑制された(腫瘍体積)(J Dermatol Sci, 88; 298-307, 2017)。

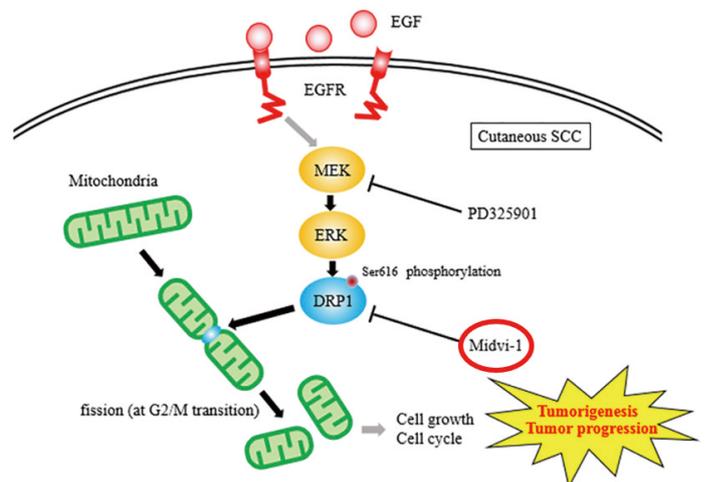


図13 皮膚有棘細胞癌におけるDRP1の機能(模式図)(J Dermatol Sci, 88; 298-307, 2017から改変)

また、Inoue-Yamaguchi らは、DRP1の消失が結腸癌におけるアポトーシスを増加させることを示した⁵⁾。皮膚科領域においては、リン酸化されたDrp1S616はBRAFV600Eメラノーマの発生率と相関し、DRP1の阻害はBRAFV600Eメラノーマ細胞の生存を抑制することが報告されている⁶⁾。さらに、DRP1活性化機構としては、2つの独立した研究グループが、Ras-MAPKシグナル伝達がDRP1活性を調節することを報告した⁴⁾。皮膚有棘細胞癌では、EGFRは過剰発現しており、予後不良と相関する⁷⁾。EGFRは、Ras-MAPKの主な活性化因子の1つとしても知られており、EGFR-Ras-MAPKシグナル伝達は、皮膚有棘細胞癌におけるDRP1活性化を調節するための重要な経路である可能性が高い。

ミトコンドリア分裂は、細胞周期停止およびアポトーシスを促進する機構に関連している⁸⁾。細胞周期において、Drp1Ser616は主にS期初期にリン酸化され、ミトコンドリア分裂促進に至り、細胞をG2/Mに移行させる。報告では、DRP1の喪失がミトコンドリアの過剰融合を誘導し、ATM依存性のG2/M停止およびアポトーシスを引き起こすとされている。今回の私たちのデータは、これまでの研究結果と一致しており、皮膚腫瘍においても同様の細胞機構があることが考えられた。

DRP1はまた、いくつかの悪性腫瘍における予後因子となる可能性がある。Chiangらは、DRP1の核発現が肺腺癌の不良予後と相関することを報告している⁹⁾。我々の研究では、DRP1の発現レベルは、皮膚有棘細胞癌の病期の進行と相関していた。DRP1の免疫染色スコアと分化度との間に相関関係に有意差はなかったが、相関の負の傾向はP=0.08として示された。DRP1の発現レベルも、有棘細胞癌において、低分化病変よりも分化した病変の方が低かった。

私たちは、DRP1が皮膚有棘細胞癌における「細胞増殖・アポトーシス・細胞周期」の重要な分子であることを示した。今後、DRP1の正常皮膚組織における解析を進めたいと考えている。

謝 辞

本研究はコスメトロジー研究振興財団の助成を得て実施いたしました。深く感謝いたします。

(引用文献)

- 1) Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM, Chan DC: Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 305: 858-862, 2004.
- 2) Kashatus JA, Nascimento A, Myers LJ, Sher A, Byrne FL, Hoehn KL, Counter CM, Kashatus DF: Erk2 phosphorylation of Drp1 promotes mitochondrial fission and MAPK-driven tumor growth. *Mol Cell* 57: 537-551, 2015.
- 3) 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.
- 4) Rehman J, Zhang HJ, Toth PT, Zhang Y, Marsboom G, Hong Z, Salgia R, Husain AN, Wietholt C, Archer SL: Inhibition of mitochondrial fission prevents cell cycle progression in lung cancer. *FASEB J* 26: 2175-2186, 2012.
- 5) Inoue-Yamauchi, A. and Oda, H. Depletion of mitochondrial fission factor DRP1 causes increased apoptosis in human colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 421: 81-85, 2012.
- 6) Wieder, SY, Serasinghe MN, Sung JC, Choi DC, Birge, MB, Yao JL, Bernstein E, Celebi JT, Chipuk JE: Activation of the mitochondrial fragmentation protein DRP1 correlates with BRAF (V600E) melanoma. *J Invest Dermatol* 135: 2544-2547, 2015.
- 7) Cañueto J, Cardenoso E, García JL, Santos-Briz Á, Castellanos-Martín A, Fernández-López E, Blanco Gómez A, Pérez-Losada J, Román-Curto C: Epidermal growth factor receptor expression is associated with poor outcome in cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 176: 1279-1287, 2017.
- 8) Zhao J, Zhang J, Yu M, Xie Y, Huang Y, Wolff DW, Abel PW, Tu Y: Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene*. 32: 4814-4824, 2013.
- 9) Chiang YY, Chen SL, Hsiao YT, Huang CH, Lin TY, Chiang IP, Hsu WH, Chow KC: Nuclear expression of dynamin-related protein 1 in lung adenocarcinomas. *Mod.Pathol* 22: 1139-1150, 2009.