HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	皮膚有棘細胞癌におけるミトコンドリア分裂関連分子Drp1の機能に関する研究
Author(s)	北村, 真也
Description	配架番号：2520
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14056号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14056
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78727
Type	doctoral thesis
File Information	Shinya_Kitamura.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文

皮膚有棘細胞癌におけるミトコンドリア分裂関連分子 Drp1 の機能に関する研究

(Studies on the function of Drp1 in cutaneous squamous cell carcinoma.)

２０２０年３月

北　海　道　大　学

北　村　真　也

学　位　論　文

皮膚有棘細胞癌におけるミトコンドリア分裂関連分子 Drp1 の機能に関する研究

(Studies on the function of Drp1 in cutaneous squamous cell carcinoma.)

２０２０年３月

北　海　道　大　学

北　村　真　也

目　　次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・・・・・・・　１頁

要旨・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　２頁

略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　４頁

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　６頁

方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　１０頁

結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　２７頁

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　６９頁

結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　７２頁

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　７３頁

利益相反・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　７４頁

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・　７５頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した.

Shinya Kitamura, Teruki Yanagi, Keisuke Imafuku, Hiroo Hata, Riichiro Abe, Hiroshi Shimizu
Drp1 regulates mitochondrial morphology and cell proliferation in cutaneous squamous cell carcinoma.
Journal of Dermatological Science 88: 298-307, (2017)

本研究の一部は以下の学会に発表した.

Shinya Kitamura, Teruki Yanagi, Keisuke Imafuku, Hiroo Hata, Riichiro Abe, Hiroshi Shimizu
Drp1 mediates cell proliferation and mitochondrial morphology in cutaneous squamous cell carcinoma.
The 42nd Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2017.12. Kochi, Japan.

要旨

【背景と目的】近年，nivolumab・pembrolizumab などの免疫チェックポイント阻害剤をはじめ，BRAF 阻害剤の dabrafenib・encorafenib，あるいは MEK 阻害剤の trametinib・binimetinib といった低分子標的薬などの新薬が登場したことで，悪性黒色腫を筆頭に一部の悪性新生物では治療方法や予後が劇的に変化している．しかしながらその一方で，悪性黒色腫以外の皮膚悪性腫瘍については，悪性黒色腫のような飛躍的な進歩には乏しい現状がある．その原因としては，皮膚悪性腫瘍の殆どが稀少癌であることや，セルラインが確立された癌種が限られていることなどが主な理由である．よって，臨床的マーカーや新薬の開発などの臨床的・基礎的な研究開発が大きな課題である．一般的に，皮膚悪性腫瘍は多くは紫外線が誘引となり，高齢化の進行とともに今後の発症増加が予想されている．皮膚有棘細胞癌（Squamous cell carcinoma，以下 SCC と略す）は表皮由来の皮膚悪性腫瘍であり，低悪性度のうちは，外科的切除で根治が期待できるが，遠隔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が少なくない．治療選択肢が限定的である本疾患は，高齢化の進行とともに今後の発症数のさらなる増加が見込まれており，新規の治療開発が急務である．近年，ミトコンドリア分裂関連分子の 1 つである dynamin-related protein 1（以下 Drp1 と略す）が，肺癌や甲状腺癌などの悪性新生物において，細胞の増殖や細胞周期などを調整することで，悪性腫瘍にとって有利にはたらく分子であることが報告されている．本研究では，この Drp1 に注目し，皮膚有棘細胞癌における機能について解析することで，新規治療ターゲット分子としてなりうるかを検討した．

【対象と方法】皮膚有棘細胞癌の細胞株である A431 および DJM1 に，RNA 干渉ベクター（siRNA, shRNA）をトランスフェクションして Drp1 ノックダウン細胞をそれぞれ作成し，in vitro および in vivo での細胞増殖や細胞周期などについて解析をおこなった．In vitro の実験系においては，培養細胞の増殖能を cell viability assay，direct cell count，コロニー増殖アッセイを用いてそれぞれ評価した．細胞周期については，fluorescence-activated cell sorting（以下 FACS と略す）を用いて細胞核の DNA 含量を分析して評価した．ミトコンドリアの形態学的解析には，Mito-tracker でミトコンドリアの蛍光染色を行い，ミトコンドリアネットワークの形状を可視化し，画像解析ソフトを用いて定量化し評価した．また，増殖シグナル経路の評価として，mitogen-activated protein kinase 経路（以下 MAPK 経路と略す）シグナル関連分子について免疫ブロット法にて評価した．In vivo の実験系においては，免疫不全マウスであるヌードマウスに

DJM1 細胞（Drp1 のノックダウン細胞株およびコントロール細胞）を異種皮下移植して xenograft model を作成し，経時的に腫瘍の動態を観察した．さらに，Drp1 阻害剤を腫瘍部に局所注射することで，Drp1 阻害剤の抗腫瘍効果について検討した. 摘出した腫瘍は, 病理組織学的な観察に加え, Ki-67 および TUNEL 染色によりそれぞれ細胞増殖・アポトーシスについて評価した．臨床検体を用いた実験系としては，北海道大学病院皮膚科で切除した SCC 30 症例について Drp1 の免疫染色を行い，Drp1 の発現量を検討した．また，Drp1 免疫染色のスコアリングを行うことで，Drp1 発現量を定量化した後，臨床情報との相関関係について統計学的な解析を行った.

【結果】細胞増殖能の解析では，Drp1 ノックダウン細胞はコントロールに比べて細胞増殖能が有意に低下していた．細胞周期については，Drp1 の欠失によって分裂直前の G2/M アレストに誘導されることが分かった．ミトコンドリアの形態学的解析では，Drp1 ノックダウン群では長い融合したミトコンドリアネットワークが観察された．シグナル経路の解析では，MEK 阻害剤の添加により ERK および Drp1 のリン酸化が阻害され，Drp1 は MAPK 経路の下流でリン酸化することで機能することが示された．また，ヌードマウスに異種移植した xenograft モデルの解析では，Drp1 ノックダウン細胞はコントロールに比べて有意に増殖が遅く，Ki-67 陽性細胞の低下，TUNEL 陽性細胞の増加が認められた．臨床検体の解析では，SCC では正常皮膚に比べて Drp1 の発現量が亢進していた．また，転移リンパ節ではさらに発現量が亢進していた．Drp1 の発現量と臨床情報の相関解析を行ったところ, 年齢, 腫瘍のサイズとは相関関係を認めなかったが, 臨床病期と正の相関関係を示した．また，分化度とは負の相関傾向を示した（P=0.08）.

【考察】本研究により，Drp1 は MAPK 経路の下流に位置しており，リン酸化されることで活性化し, 他の癌種で報告されているのと同様に, 皮膚有棘細胞癌における細胞増殖，細胞周期などを調整する重要な分子として機能していることが判明した．また，SCC においてもミトコンドリアの分裂を調整し，Drp1 のノックダウンにより長いミトコンドリアネットワークが観察された．Drp1 は予後規定因子としても有用であることが報告されているが, SCC においても Drp1 の発現量が臨床病期と正の相関関係にあり，既報告と合致した．また，皮膚有棘細胞癌は低分化であるほど予後が悪いことが知られている. 本研究では Drp1 の発現量が分化度とは負の相関関係を示したが，これらの結果は予後規定因子としての有効性を示唆するものであった.

【結論】Drp1 は皮膚 SCC において，細胞増殖や細胞分裂を制御する分子として機能しており，SCC における新規治療ターゲット分子候補となりうると考えられた.

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

ATP	Adenosine Triphosphate
BSA	Bovine serum albumin
CDK	Cyclin dependent kinase
CnT-PR	CnT-prime, epithelial culture medium
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EKO	Epidermis-specific Drp1 knockout
ERK	Extracellular Signal-regulated Kinase
Drp1	Dynamin-like protein 1
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum
GFP	green fluorescent protein
HE	Hematoxylin and Eosin
HPEKp	human primary epidermal keratinocyte progenitor
HRP	horseradish peroxidase
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MEK	Methyl Ethyl Ketone
Mfn1/Mfn2	Mitofusin1/2
mRNA	messenger RNA
NHDF	normal human dermal fibroblasts
Opa1	Optic atrophy 1
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PEI	Polyethylenimine
RNA	ribonucleic acid
SCC	Squamous cell carcinoma
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	short interfering RNA
TUNEL	TdT0mediated dUTP nick end labeling

WT	wild type

緒言

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（図 1，Blume-Peytavi U et al., 2016; Heidari M et al., 2013）．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（Burton KA et al., 2016）．SCC の発生には紫外線，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（石原和之, 2005）．

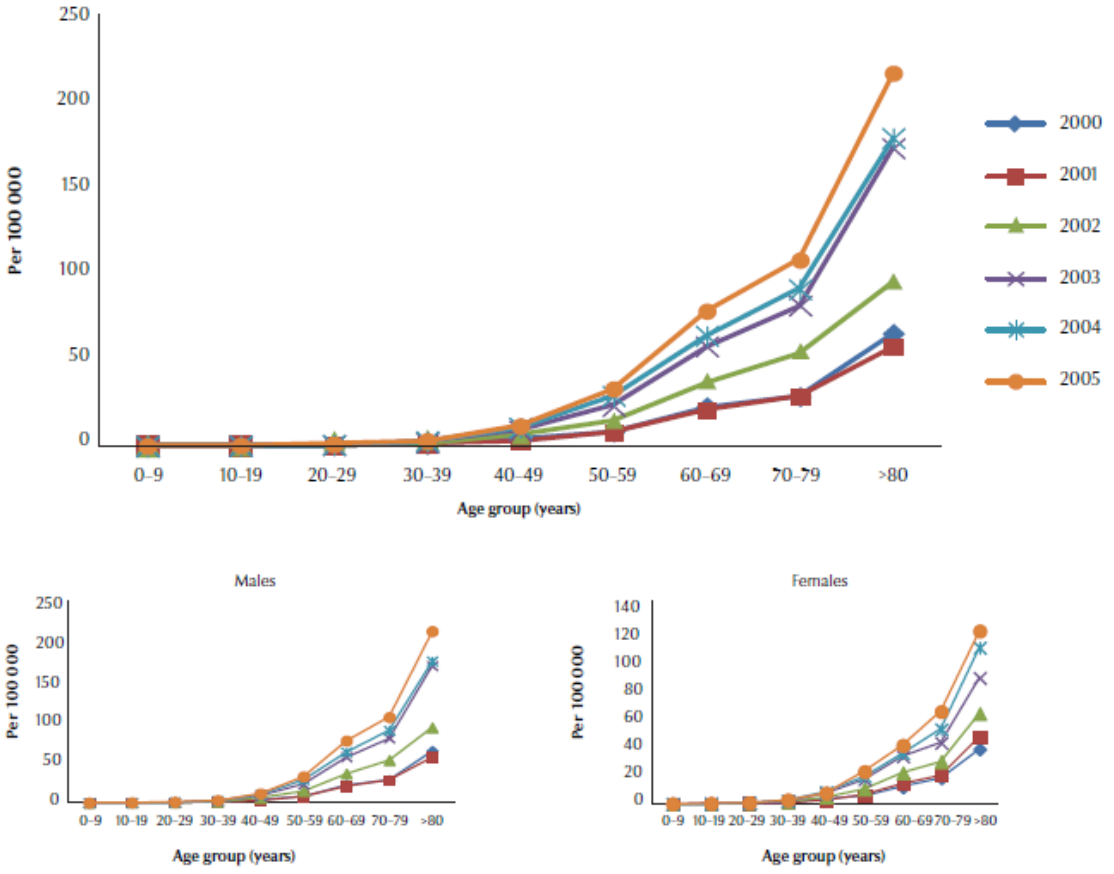


図 1：皮膚癌発生率の推移

皮膚癌は加齢とともに発生率が増加している．今後も高齢化が進むことで，さらなる発生の増加がみこまれている（Heidari M et al., Eastern Mediterranean Health Journal, 2013 より引用）．

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や結節として生じるが，増大すると腫瘤や難治性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る，表面が乳頭状の腫瘤性病変を呈する．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（図 2）．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・増殖能も強く，一般的には予後が悪くなる（図 3，You TK et al., 2012）．



図 2：皮膚 SCC の臨床像

自験例：71 歳，男性．後頭部原発の再発性 SCC．原発巣の切除 8 年後に局所再発し，その後 CT で頚部，腋窩，縦隔のリンパ節腫大，肺転移を認め，stage IV と診断された．FP 療法（フルオロウラシルとシスプラチンの併用療法）による化学療法で加療したが治療抵抗性であったため，緩和医療に移行した．本症例のように，SCC の進行期では，しばしば自壊して表面が壊死したカリフラワー状の外観を呈し，悪臭を伴い，ときに二次感染する．また，局所破壊により周囲の組織が露出したり，大量出血したりすることもあり，終末期になると局所のコントロールも課題のひとつである．

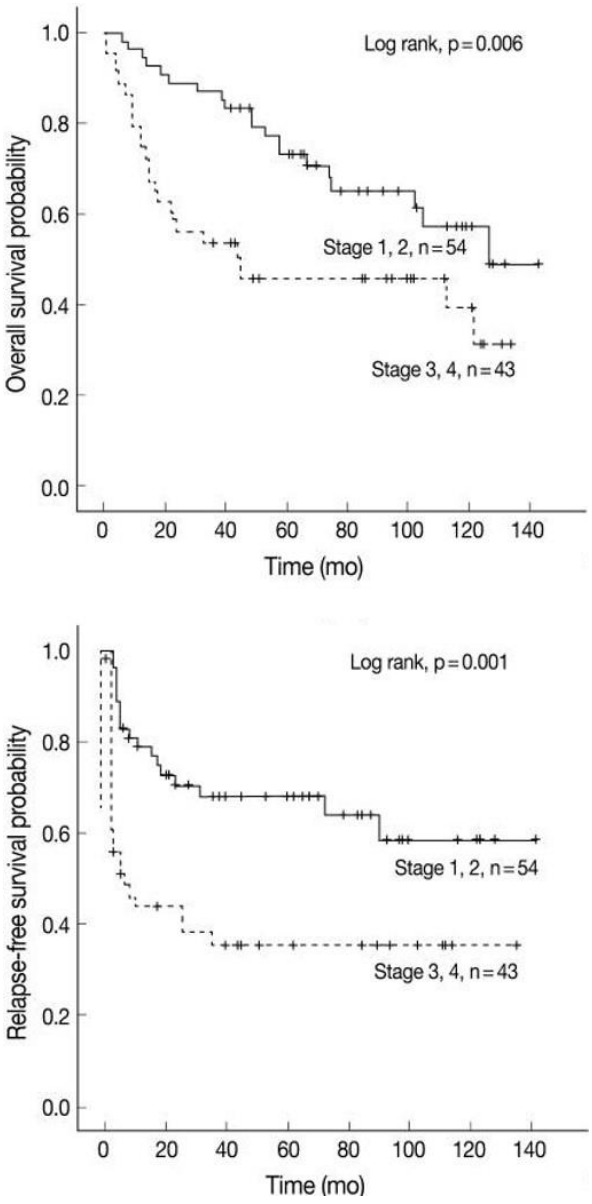


図 3：SCC の病期別の全生存期間，無再発生存期間

病期が進むと，生存期間・無再発生存期間のいずれも短縮し，生命予後が悪くなる（You TK et al., 2012 より抜粋）.

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が少なくない（Breuninger H et al., 2012）．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（以下 EGFR と略す）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験などが試みられている（Lewis CM et al., 2012; Maubec E et al.,

2011; Borradori L et al., 2016)．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．

ミトコンドリアは生命活動に極めて重要なはたらきを担う細胞内小器官であり，細胞活動に必須なエネルギーである adenosine triphosphate（以下 ATP と略す）の大部分を作り出している．よって，ミトコンドリアの恒常性を維持することは，細胞の活動に必須である．ミトコンドリアは，周囲の環境によりその数や形態を変えて，細胞の恒常性維持を行っている（Westermann B et al., 2008; Horbay R et al., 2016; Chan DC et al., 2012)．近年，ミトコンドリアの融合・分裂に関与する GTP 加水分解酵素群が同定された．ミトコンドリアの融合には Mitofusin 1，2（Mfn1, Mfn2）および Optic atrophy 1（Opa1）が，分裂には Dynamin-like protein 1（以下 Drp1 と略す）がそれぞれ関与している（図 4, Koshiba T et al., 2004; Frank S et al., 2001)．

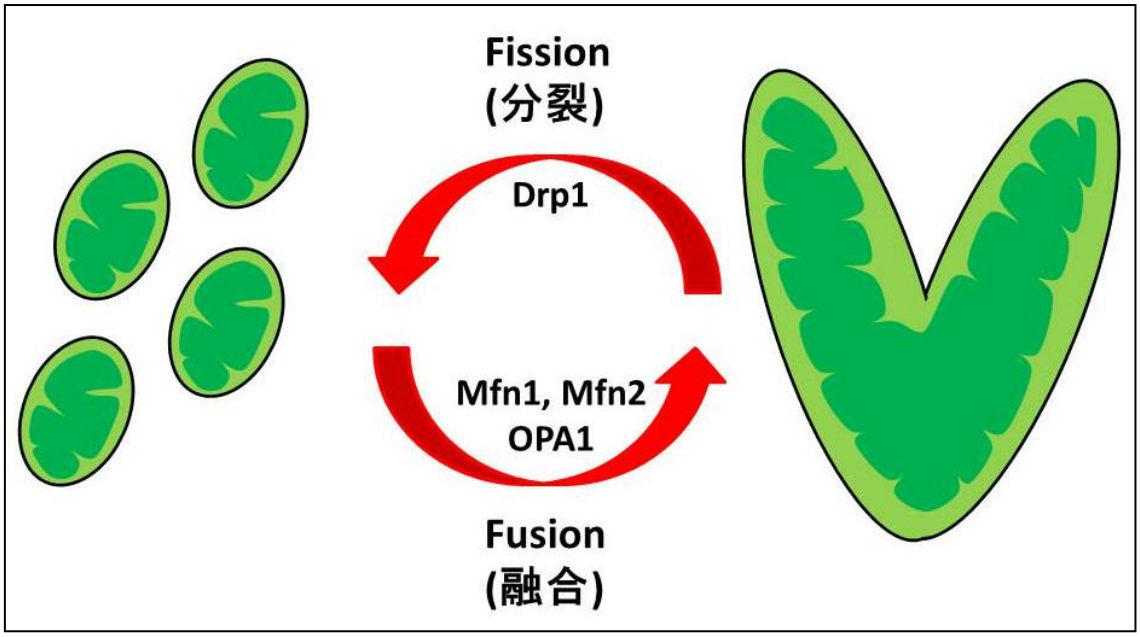


図 4：ミトコンドリアの分裂・融合に関連する分子
ミトコンドリアの融合には Mfn1, Mfn2, Opa1 が，分裂には Drp1 が関与している．Drp1 は細胞質および外膜に，Mfn1/Mfn2 は外膜に，Opa1 は膜間スペースにそれぞれ局在している．

近年，Drp1 は細胞増殖，細胞周期などを調整し，悪性新生物の機能に特に重要な分子であることが報告されている（Kashatus JA et al., 2015; Priet J et al., 2016）．さらに，膠芽腫，甲状腺腫瘍，乳癌などの悪性新生物においては，細胞増殖や浸潤能などを調整し，悪性腫瘍にとって有利にはたらいていることが報告された（Xie W et al., 2015; Ferreira-da-Silva A et al., 2015; Serasinghe MN et al., 2015）．しかしながら，皮膚科領域においては，Drp1 の機能について，これまでにまとまった報告は殆どされておらず，不明である．

本研究では，ミトコンドリア分裂関連分子である Drp1 に着目して，他の悪性新生物と同様に，皮膚 SCC において細胞増殖や細胞死などを調整する重要な分子として機能しているか検証することを目的とした. また, 正常表皮および SCC における Drp1 の機能解析を行うことで，Drp1 が SCC において具体的にどのような役割を果たしているかを明らかにし，新規治療ターゲットの分子候補となりうるか検討することを目的とした.

実験方法

本研究はヘルシンキ宣言に則り，北海道大学病院倫理委員会の承認を得て行った（承認番号 16-0138）.

また，本研究は，参加者全員から書面による同意を得て施行した．臨床検体の取り扱いおよび臨床研究に関しては，北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の承認を受け，「北海道大学における臨床研究の取り扱いに関する指針」に則って行われた．遺伝子組み換え実験については，「北海道大学遺伝子組み換え実験等安全管理規程」に則した.

１．使用した試薬および抗体

本研究に用いた試薬および抗体は以下の通りである.

細胞 ATP 活性測定キット Cell Titer Glo（Promega）
Drp1 阻害剤 Mdivi-1（sc-215291，Santa Cruz Biotechnology）
MEK 阻害剤 N-difluoro-2-benzamede（PD0325901，Cayman Chemical）
RNAiMAX Life Technology
抗 Drp1 抗体 mouse, #611113, BD Transduction Lab
抗 Drp1^{Ser616} 抗体 rabbit, #611738, Cell Signaling Technology
抗 ERK$^{1/2}$ 抗体 rabbit, #4695, Cell Signaling Technology
抗 ERK$^{1/2}$ リン酸化抗体 rabbit, #9191, Cell Signaling Technology
抗 CDK1 抗体 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 mouse 抗体, #A5441, Sigma
抗 Ki-67 抗体 mouse, #ab8191, Abcam
抗 TUNEL 抗体, #1168487910, Roche
抗 mTOR 抗体, #ab2732, Abcam
抗 Tom20 抗体, #FL-145, Santa Cruz
抗 BAX 抗体, #14796, Cell Signaling
抗 Cytochrome C 抗体, #556432, BD Transduction Lab
抗 Mfn1 抗体, #ab57602, Abcam
抗 Opa1 抗体, #612606, BD Transduction Lab
抗 cleaved-caspase-3 抗体, #9661, Cell Signaling
抗 p53 抗体, #p53-CM5P-L, Leica
HRP 標識抗マウス IgG 抗体 #7076, Cell Signaling Technology

HRP 標識抗ラビット IgG 抗体 #7074, Cell Signaling Technology

２．細胞と細胞培養

本研究では，ヒト有棘細胞癌の細胞株として A431（85 歳女性の外陰部有棘細胞癌から樹立された細胞株, Giard DJ et al., 1973），DJM1（87 歳女性の悪性外毛根鞘腫転移リンパ節から樹立された細胞株, Inoue T et al., 2001）の 2 種類を使用した．また，正常ヒト皮膚線維芽細胞の細胞株 normal human dermal fibroblasts（以下 NHDF と略す，American Type Culture Collection），および正常ヒト表皮細胞の細胞株 human primary epidermis keratinocyte progenitor（以下，HPEKp と略す，CELLnTEC）をそれぞれコントロール細胞として使用した．

細胞の培養は，37 度 5%CO_2 条件下のインキュベーターで行われ，A431，DJM1，NHDF は 10%ウシ胎児血清（Fetal bovine serum，以下 FBS と略す，Life Technology）添加 Dulbecco's modified Eagle's medium（以下 DMEM と略す，Nacalai Tesque）を培養液として使用し，HPEKp については CnT-prime, epithelial culture medium（以下 CnT-PR と略す，CELLnTEC）を培養液として使用した．

細胞の継代は，細胞の割合が 70-80%コンフルエントに達した時点で行った．PBS で 2 回洗浄した後，1mL の 0.25%Trypsin-EDTA（Thermo Fisher Scientific）に浸し，37℃で 7 分間静置した．タッピングしながら，顕微鏡下で細胞がディッシュから剥がれていることを視認した後，DMEM および 10%FBS を添加した phosphate buffered saline （HPEKp の細胞株のときに使用，以下 PBS と略す）を 9cc 加えて十分に懸濁し，15mL ファルコンチューブに全量を移した．室温で 3 分間, 1000rpm で遠心した後，上清をすべて吸引し，新しい培養液 10cc で再懸濁した．その後，新しい 10cm ディッシュに培養液を 9cc 添加しておき，懸濁液 1cc を一様になるように添加・混和して，10:1 の細胞比で播種した．本研究で行った実験は，継代数が 6 以下の細胞を使用した．

３．発現抑制実験

3-1：RNA 干渉実験

Drp1 の発現を RNA 干渉により抑制するため，small interfering RNA（以下 siRNA と略す）を設計した．Drp1 の発現を抑制できた配列は，3 種類であった（Scrambled-control， Drp1-siRNA#1 [s19560]，Drp1-siRNA#2 [s19559]，Drp1-siRNA#3[s19532]，Ambion）．細胞内へのトランスフェクションは 6 穴プレートで行った．20%コンフルエントになるようにあらかじめ細胞を播種しておき，24 時間 37℃でインキュベートした後，20μM の siRNA1μL と，RNAiMAX

5μL を 500μL の Opti-MEM で混和し，室温で 15 分静置した（これまで同様の Ambion の siRNA 実験において，最終 siRNA 濃度が 10nM で良好なノックダウン効果が見られており，この濃度で実施した）．その後各ウェルに添加してトランスフェクションした．

また，恒久的な Drp1 のノックダウンには，レンチウイルスを用いた short-hairpin RNA（図 5，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．本研究で使用した shRNA の配列は表 1 の通りである（Sigma：製品情報の mean knockdown level の高いものを選択して決定，http://www.sigmaaldrich.com/catalog/genes/DNM1L?lang=ja&region=JP）．

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℃でインキュベートした後，shRNA vector（pLKO-423,426,1097,scrambled-puromycin, 1μg/mL）3μL と DNAmix（pLP1, pLP2, pVSVG, 各 1μg/mL）9μL を 1mL の Opti-MEM で混和し，さらに polyethylenimine（以下 PEI と略す）15μL 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℃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 JCR-EGFP （1μg/mL） 3μL と，PEI 15μL 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℃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（10mL）は，45μm フィルタ（MILLIPORE）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 1μg/mL）を培地に加えてセレクションし，ノックダウン細胞株を樹立した．

3-2：阻害剤を用いた実験

Drp1，MEK 阻害剤として Mdivi-1（Santa Cruz Biotechnology）および N-difluoro-2-benzamede（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, 10-50μM の濃度で投与しているため（Tanaka A et al., 2008），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 10-100μM で使

用されており（Bain J et al., 2007），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 10μL, 6cm シャーレでは 5μL 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）．

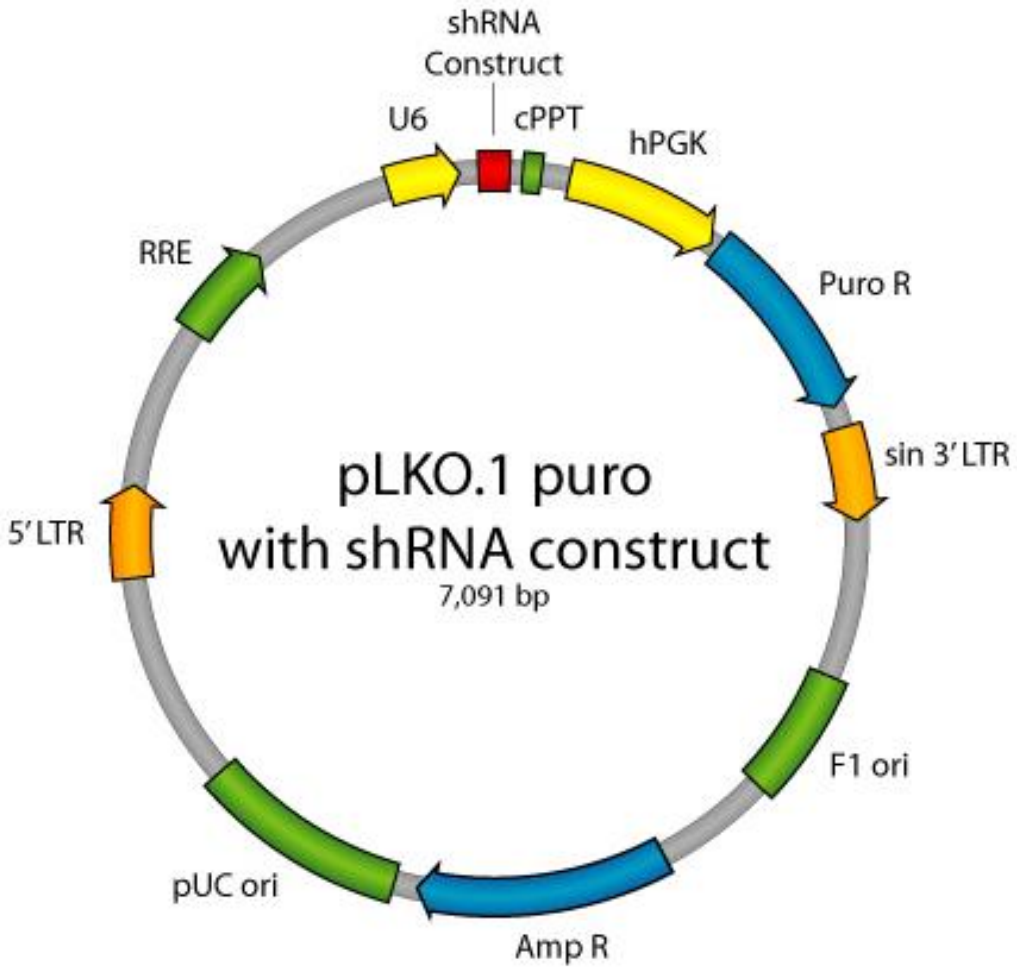


図 5：pLKO shRNA のプラスミド構造

ピューロマイシン耐性遺伝子が組み込まれており，トランスフェクション後はピューロマイシンによるセレクションをおこなった．

表 1：本研究で使用した shRNA の配列情報

shRNA	NO	配列
#1	423	CGGTTCATCAGTAATCCTAATC
#2	426	CGAGATTGTGAGGTTATTGAACTC
#3	1097	CGGTGGTGCTAGAATTTGTTACTC
Scrambled control	-	CAACAAGAYGAAGAGCACCAA

４．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（TC10™, Bio-Rad）で測定した後，96 ウェルプレートに 5000-10000 個／100μL・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 100μL ずつ分注・静置した．48 時間，37℃でインキュベートした後， Cell titer glo solution を各ウェルに 100μL 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 にそれぞれ移し変えた後，吸光度を Spectra Max Paradigm（Molecular Devices）を用いてそれぞれ測定した．

５．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℃でインキュベートした．1，3，5，7 日後に PBS で洗浄し，750μL の 0.25%Trypsin-EDTA（Thermo Fisher Scientific）をそれぞれ加えて，6 分間 37 度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)×100」として導出した．

６．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℃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.

７．ウエスタンブロット

7-1：ライセートの回収

Lysed buffer には, RIPA buffer（50 mM Tris pH7.5, 150 mM NaCl, NP40 1%, sodium deoxycholate 0.5%, SDS 0.1%, NaF, final concentration 1 nM, NaV_3O_4, final concentration 10 μM，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℃，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, pH 8.4, Invitrogen），NuPAGE Sample Reducing Agent（500 mM 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.

7-2：電気泳動，転写，ブロッキング

回収したライセートは，70℃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 polivinylidene 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, 150 mM 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.

7-3：1 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 $Drp1^{Ser616}$ 抗体（rabbit, #611738, Cell Signaling Technology），抗 $ERK^{1/2}$ 抗体（rabbit, #4695, Cell Signaling Technology），抗 $ERK^{1/2}$ 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℃で揺らしながら，抗原抗体反応行った．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）を二次抗体と

して 60 分間室温で抗原抗体反応させた．再度 1xTBS-T で 3 回洗浄した後，Image Quant LAS4000（GE Healthcare）で撮像した．

８．細胞周期解析

細胞周期は propidium iodide DNA staining を行い，FACS により解析した．PI solution（Wako）は PBS 1000μL あたり TritonX-100 1μL，RNAseA 20μL，PI 20μL 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℃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℃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 500μL ずつ添加し，37℃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（図 6）.

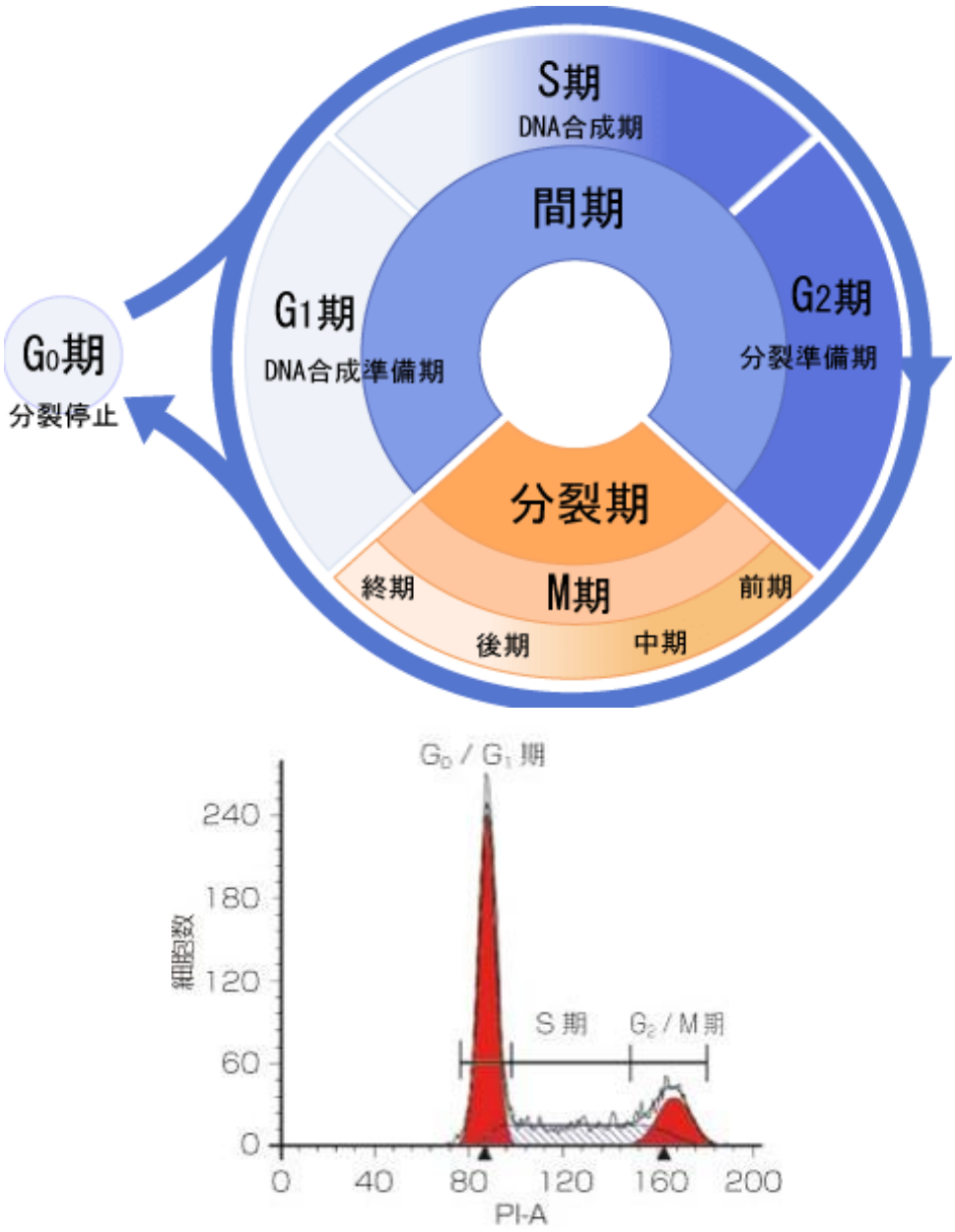


図 6：細胞周期と蛍光パラメータのヒストグラム

細胞周期は有糸分裂を行う M 期と DNA の合成を行う S 期のほかに，これらの間の DNA 合成および細胞成長に必要な多数の RNA・蛋白分子を細胞分裂前に生合成する G1 期，細胞周期の前段階に発生した DNA 損傷を修復する期間である G2 期に大きく分けられ，それぞれのフェーズで細胞の有する DNA 量が異なる．G1 期の細胞は全て同じ DNA 量（2N）をもち，細胞分裂が進むにつれて G2/M 期で分裂直前の倍量（4N）の DNA を有する．この性質を利用して，FACS で DNA 量の違いによりどれだけの細胞がどの細胞周期にいるかを解析できる（http://morido.wp.xdomain.jp/biology/cycle/, https://www.funakoshi.co.jp/contents/7388 より抜粋）．

９．ミトコンドリアの形態学的解析

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 1μL 添加し，37℃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.

１０．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（動物実験番号 19(46)-1）.

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℃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 200μL 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 DMSO25μL に溶解して腫瘍に直接局所注射した．コントロール群には，25μL 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 日目に頚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（Abbie）による吸入麻酔と，抱水クロラール（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．

１１．免疫組織学的解析

ホルマリン（Wako）固定パラフィン切片を 4μm 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．Drp1 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．また，分化度については，スコア 1：未分化細胞が全体の 75%以上，2：未分化細胞が 50-75%，3：未分化細胞が 25-50%，4：未分化細胞が 25%未満，でそれぞれ評価した．mTOR 免疫染色スコアについては，スコア 0：陽性細胞数が 5%未満，2：5%以上 25%未満，3：25%以上 50%未満，4：50%以上，でそれぞれスコアリングした．

１２．対象患者の選定

本研究には皮膚有棘細胞癌と北海道大学皮膚科で診断および治療した 30 名の患者がエントリーした．男女比は 10:20 で，年齢は 51 歳から 103 歳までの分布であった．予後解析のため，遠隔転移あり群と転移なし群の 2 群に分けて，15 名ずつの患者を選択した．また，臨床情報として，年齢，性別，原発巣の部位，大きさ，臨床病期，予後，分化度をカルテから抽出した．なお，本研究は北海道大学病院の臨床研究倫理委員会で審査承認済みである．臨床情報を表 2 に示す．

表 2：本研究で解析した患者臨床データ

Case #	Age	Sex	Site	Tumor volume [mm^3]	Metastasis	Clinical stage at diagnosis	Differentiation grade	Overall survival [month]	Prognosis
1	79	F	rt. temporal	4000	-	I	4	12	alive
2	89	F	lt. nasolabial	62.5	-	I	3	12	alive
3	80	M	lt. dorsum of hand	14297	-	I	4	28	alive
4	84	M	lt. preauricular	500	-	I	4	6	alive
5	51	M	rt. thigh	6125	-	I	4	51	alive
6	72	F	Genital	1440	-	I	4	21	alive
7	84	M	dorsum of nose	726	-	I	4	36	alive
8	103	M	lt. cheek	526.5	-	I	4	12	alive
9	91	F	lt. cheek	1267.5	-	I	4	24	alive
10	61	M	lt. preauricular	1470	-	I	4	61	alive
11	94	F	rt. lower leg	10937.5	-	I	4	4	alive
12	81	F	lt. 5th finger	1687.5	-	I	4	36	alive
13	68	F	lower lip	936	-	I	4	39	alive
14	70	M	thigh, lower leg	500	-	I	4	5	alive
15	75	M	rt. 2nd finger	500	-	I	4	59	alive
16	74	F	lt. thigh	125280	LN	IV	4	14	alive
17	66	F	Genital	1932	LN	III	4	33	alive
18	69	F	extra genital	4000	Lung	IV	3	45	alive
19	75	F	Abdomen	6612.5	LN	IV	3	29	alive
20	69	F	lt. lower leg	3072	Skin, Liver, Lung, LN	IV	3	29	dead
21	86	F	extra genital	77315	Lung	IV	4	3	dead
22	77	F	extra genital	4387.5	Skin, LN	IV	4	5	dead
23	64	F	extra genital	108000	Skin	III	4	6	dead
24	83	F	rt. jaw	7600	Lung	III	4	9	dead
25	80	M	rt. cheek	2304	Paroid gland, brain	I	4	4	dead
26	60	F	lt. head	20250	LN	II	3	94	alive
27	82	M	rt. groin	6174	Lung	IV	4	22	alive
28	88	F	lt. thumb	7812.5	LN	IV	4	95	alive
29	71	F	rt. thigh	384	LN	I	3	95	alive
30	89	F	extra genital	465.5	Skin, LN	I	4	57	dead
Mean	77.2			13581.6				31.53	

F; Female, M; Male, LN; Lymph node

また，有棘細胞癌以外の皮膚癌として 2001 年～2017 年までに北海道大学皮膚科で外科的に切除した 61 名の乳房外 Paget 病の患者についても臨床情報を

抽出した．男女比は 36:25 で，年齢は 53 歳から 94 歳までの分布であった．臨床情報として，年齢，性別，臨床病期，予後をカルテから抽出した．臨床情報を表 3 にまとめる．

表 3：乳房外 Paget 病 61 例の臨床情報のまとめ

Clinical information		Number of cases (%)
Year	-70	17 (27.9)
	71-80	31 (50.9)
	81-	13 (21.3)
	Range	53-94
	(mean, median)	(74.97, 75)
Sex	Male	36 (59.0)
	Female	25 (41.0)
Observation period [month] (mean, median)		1-84 (33.52, 24)
Invasiveness	in situ	27 (44.3)
	invasive	34 (55.7)
Clinical stage	Ia	27 (44.3)
	Ib	24 (39.3)
	II	1 (1.7)
	III	2 (3.3)
	IV	6 (9.8)
Outcome	Alive	54 (88.5)
	Dead	7 (11.5)

１３．統計学的解析

本研究での定量データはすべて平均±標準偏差で示した．統計学的解析には Microsoft Excel 2013（Microsoft Corporation, Washington, U.S.A.）を用いて行った．群間の比較は Student の t 検定を用い，エラーバーは平均値±標準偏差で示した．また，サンプル数は少なくとも n≧3 とした．Drp1 の発現量と臨床情報の相関解析には，Pearson の相関解析を用いた．生存曲線には Kaplan-Meier 法で導出し，生存期間を対象とした．全ての統計学的解析において，$P<0.05$ で有意差ありと判定した．

１４．表皮特異的 Drp1 ノックアウトマウスの作製

Cre-loxP システムを用いた遺伝子組み換えにより, Drp1 flox/flox と K14-Cre トランスジェニックマウス（Jackson Laboratory）を交配して, 表皮特異的 Drp1 コンディショナルノックアウトマウス（Epidermis-specific Drp1 knockout mice, 以下 EKO と略す）を作製した．マウスのジェノタイピングには，表 4 に示すプライマーを用い，以下の通り実施した．回収したマウスの尾に 50mM NaOH を添加し，95℃で 30 分ボイルした溶解液に，1M tris-HCL 40μL を加え十分に混和させ, スピンダウンした上澄みを回収してマウス由来の DNA 含有液を抽出した．抽出した DNA 含有液 1μL に，AmpliTag Gold 360 Master Mix 25μL，各プライマー2μL ずつ，さらに滅菌水を 18.5μL を加えて PCR 用混合液を作製した．PCR には Veriti 96-Well Thermal Cycler（Applied Biosystems）を用い，1st（96℃10 分），2nd（96℃30 秒→52℃30 秒→72℃30 秒，35 サイクル），3rd（72 度 7 分）の順で反応させた．PCR 産物は，1.5%アガロースゲル，0.5xTAE バッファ（2M tris-acetate, 50nM EDTA）を用いて，Mupid-evU（ADVANCE）で 100mV，20 分電気泳動させ，UVP BioDoc-lt（BIOTECHNOLOGY）を用いて観察した．

表 4：ジェノタイピング用のプライマー配列情報

プライマー	配列
D1	5’-CACTGAGAGCTCTATATGATTGC-3’
D3	5’-ACCAAAGTAAGGAATACTTTG-3’
D5	5’-GAGYACCTAAAGTACAAGAGGTCC-3’
K14-Cre forward	5’-GCGGTCTGCAGTAAAAACTATC-3’
K14-Cre reverse	5’-GTGAAACAGCATTGCTTCACTT-3’
Control forward	5’-CTAGCCACAAATTGAAAGATCT-3’
Control reverse	5’-TAGGTGAAATTCTAGCATCATCC-3’

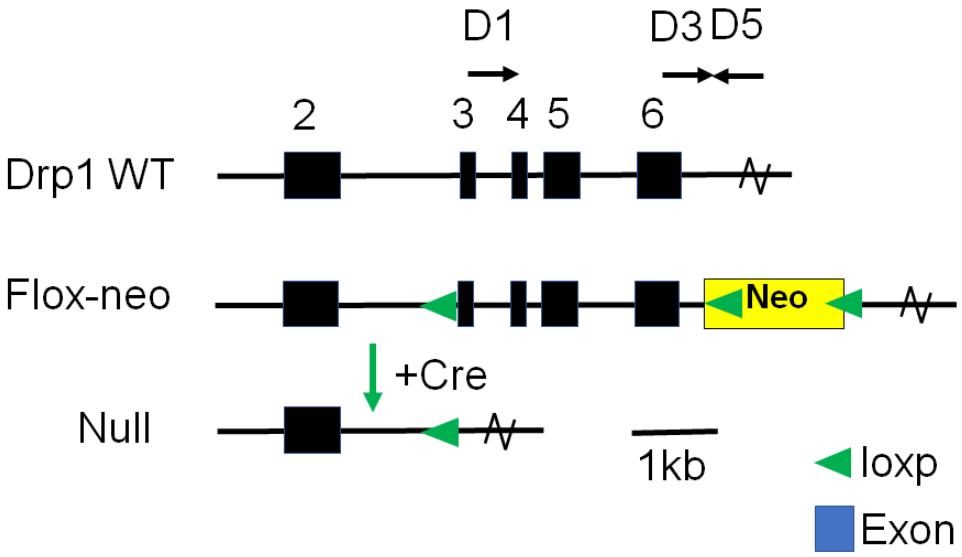


図７：Drp1 ノックアウトアレルのデザイン
Keratin14 プロモーターである K14-Cre を用いて，表皮特異的 Drp1 ノックアウトマウスをデザインした．WT: wild type.

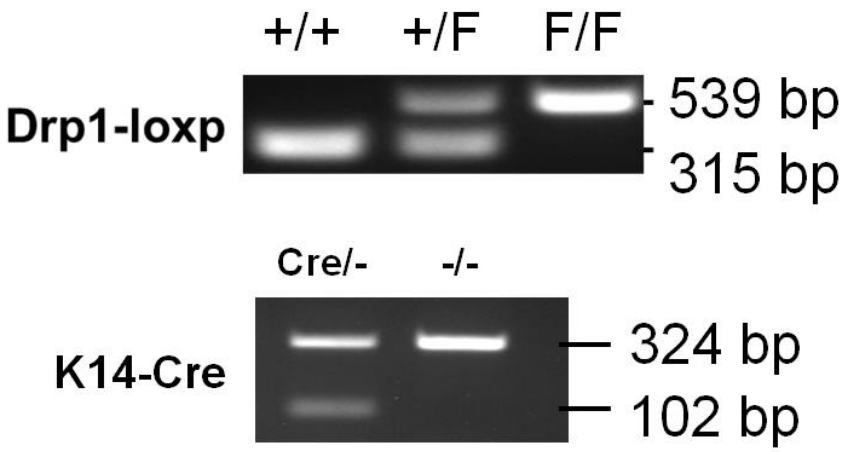


図８：ジェノタイピングの PCR 産物
Drp1 の WT，floxed はそれぞれ 315bp，539bp が，Cre トランスジェニック，インターナルコントロールはそれぞれ 102bp，324bp が検出される．

１５．正常表皮細胞における Drp1 の機能解析

15-1：皮膚の形態・分化の観察

作製した表皮特異的 Drp1 ノックアウトマウス（EKO），野生型マウス（Wild type，以下 WT と略す）について，出生前後の皮膚に肉眼的な変化があるかど

うかを観察した．また，病理組織学的な変化の有無については，HE 染色を行い光学顕微鏡下に比較した．さらに，ミトコンドリアの形態を電子顕微鏡下で観察した．電子顕微鏡の検体は，回収した皮膚を 5%グルタールアルデヒドで前固定し，4℃の 1%四酸化オスミウム液で 2 時間後固定ののち，エタノール脱水後にエポキシ樹脂（Epon812）で包埋固定し，薄切切片を 30 分ウラン染色液に浸して電子染色を施し観察した．

15-2：マウス由来の初代培養表皮細胞の獲得

出生直前のマウス(胎生 18.5 日)の皮膚を剥離尖で全周性に剥離して回収し，PBS で 2 回洗浄後，0. 5%Tripsin750μL を添加し 37℃で 2 時間静置した．ピンセットで肉眼的に表皮と真皮を分離させた後，表皮を PBS で洗浄し，2mL エッペンチューブに回収し，10%FBS 入り PBS500μL を加えてトリプシン反応を止めた．25℃，1000rpm で 5 分遠心してペレットダウンし，上清を吸引後，CnT-PR（CELLnTEC）1.5cc で懸濁し，5 分静置させた後で上清 1000μL をケラチンコーティング 24well ディッシュに滴下して、37℃でインキュベートした．24 時間後に培養表皮細胞がディッシュについていることを確認し, 以後は CnT-PR 培地を用いて細胞の培養を行った．

15-3：紫外線照射実験

UV ランプ（UVP, 8W, 302nm, Tokyo, Japan）を用いて，培養細胞およびマウスに直接 UVB 照射を行った．In vitro の実験系では, 培養細胞に 0-80mJ/cm^2 の UVB を照射し，細胞の形態を観察した．また，p53・cytochrome C などのアポトーシス関連分子については，免疫染色およびブロット法にて発現量を解析した．In vivo の実験では, 剃毛したマウス背部皮膚に 180mJ/cm^2 の UVB を 10 日間連続照射した後（induction phase），週に 2 度 180mJ/cm^2 の UVB を 40 週まで連続照射し（maintenance phase），長期的な UVB 刺激に対する反応を観察した（図９）．

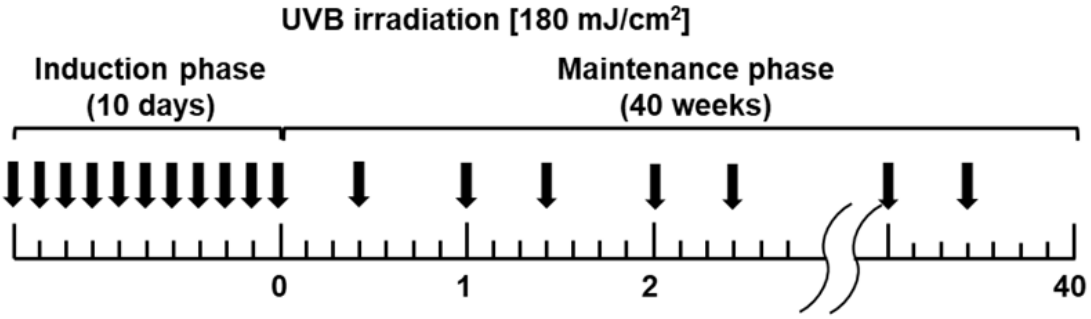


図 9 ：マウス皮膚への UVB 照射スケジュール

マウス背部皮膚を剃毛し，180mJ/cm² の UVB を 10 日間連続照射した後，週に 2 度頻度で同量の UVB を 40 週まで連続照射した（Ando S et al., 2009 に準じて）.

15-4：表皮細胞の蛍光染色

チャンバースライド（Lab-Tek II, Thermo Fisher）に対象の表皮細胞を播種し，UVB を照射した後，4%パラホルムアルデヒド（Wako）を加えて細胞を固定し，0.5%Triton-X100（Sigma）を添加して浸透化させた．次に PBS に溶かした一次抗体を当ててインキュベートさせた後，30 分 PBS で水洗し，二次抗体を当ててインキュベートした．DAPI 添加 Vectashield Hard Set Mounting Medium（H-1500，Vector Laboratories）にて細胞を保存し，BZ-9000 電子顕微鏡（Keyence）で観察を行った.

実験結果

１．Drp1 をノックダウンすると皮膚有棘細胞癌の増殖能は低下する

ヒト SCC の細胞株である A431，DJM1 に対して，siRNA をトランスフェクションして Drp1 のノックダウン細胞を作成した．3 種類の siRNA において，それぞれ Drp1 がタンパクレベルで発現が低下していることをウエスタンブロットで確認した（図 10）．また，細胞増殖能として Cell viability ratio を比較したところ，A431 ではコントロールと比べて有意に低下していたが，DJM1 細胞では有意差を認めなかった（図 11）．

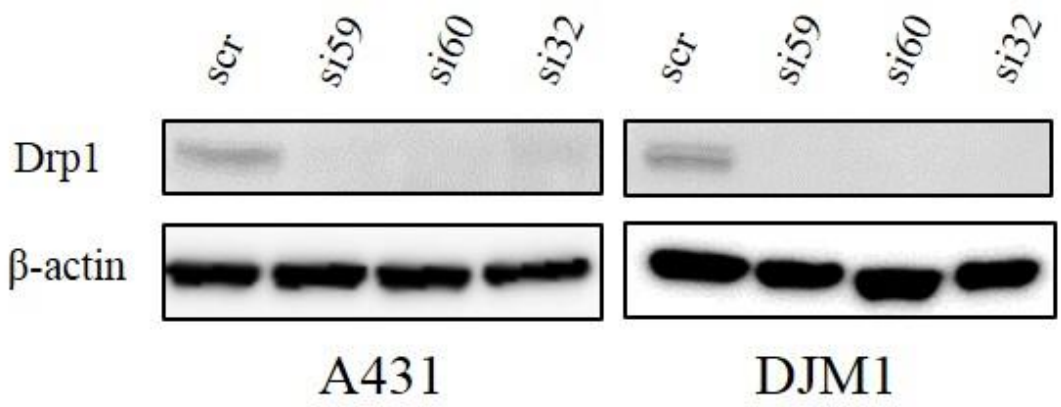


図 10：siRNA を用いた Drp1 のノックダウン

A431，DJM1 に siRNA をトランスフェクションし，Drp1 ノックダウン細胞を作成した（実験方法 3-1 を参照）．トランスフェクション 24 時間後にライセートを回収し，ウエスタンブロットを行ったところ，Drp1 の発現がタンパクレベルで低下していた（scr＝scrambled control）．

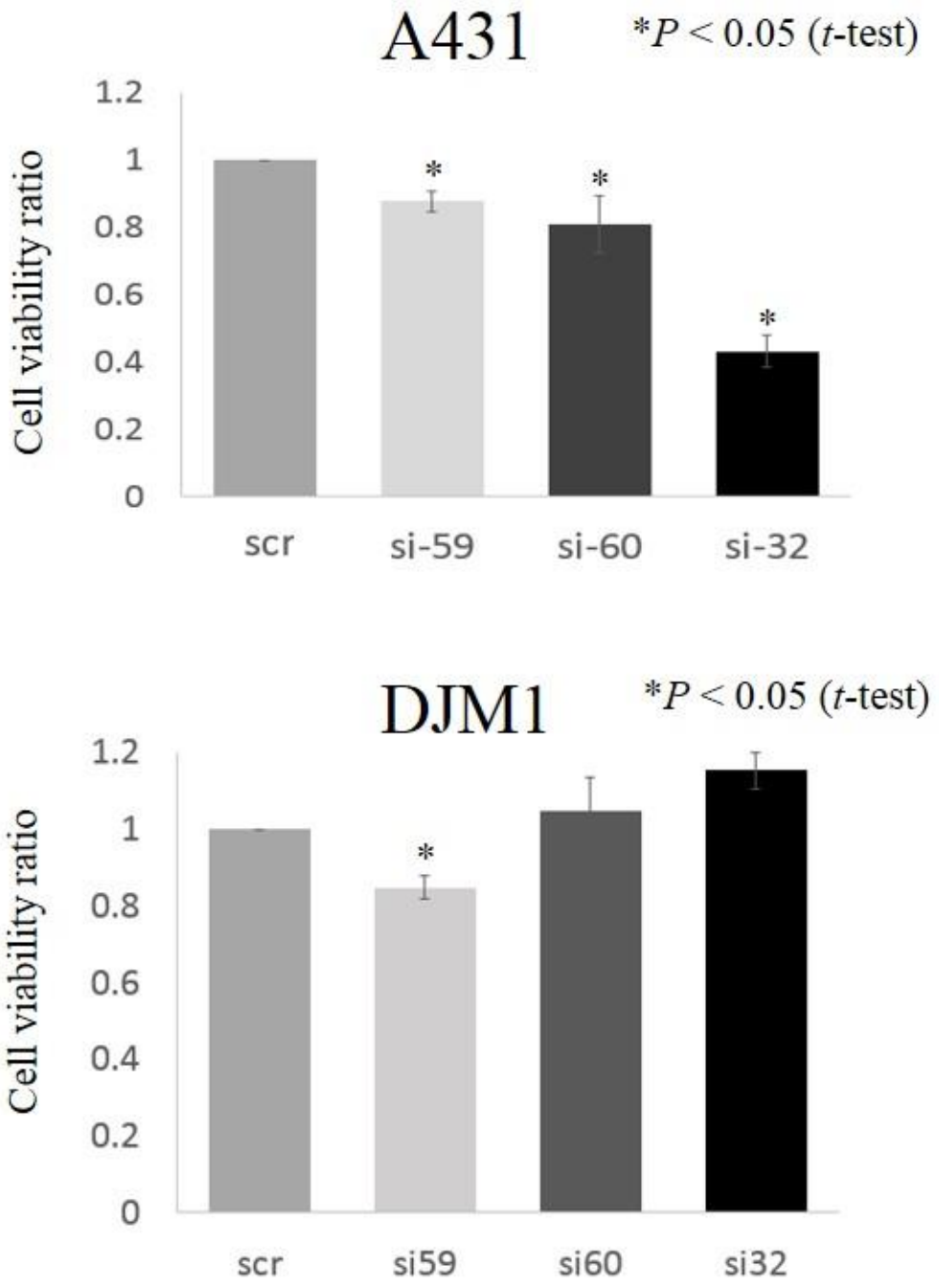


図 11：siRNA で Drp1 をノックダウンした細胞株の cell viability ratio
A431 細胞ではすべての siRNA で有意な低下が認められたが，DJM1 細胞ではコントロールと siRNA 群間で有意差はなかった（48 時間後に測定，各群 N＝3）.

増殖能にうまく差がでなかった理由としては, オフターゲット効果や RNA 干渉が短期的であることが要因として考えられたため, 次に shRNA による恒久的なノックダウンを行うこととした. 3 種類の shRNA でノックダウン細胞を作成し, 免疫ブロット法にてタンパクレベルで Drp1 の発現が低下していることを確認した（図 12）.

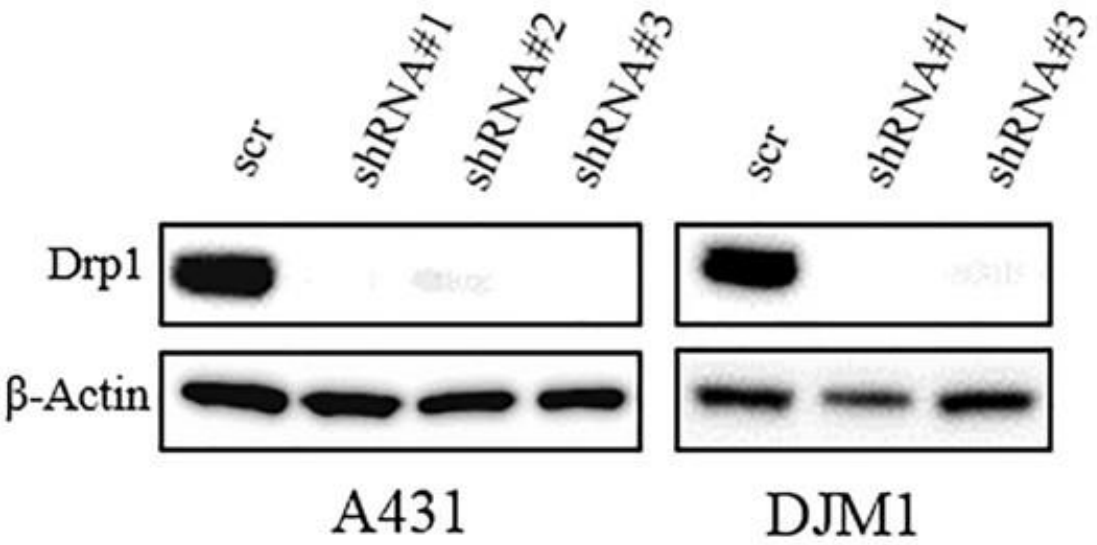


図 12：shRNA による Drp1 のノックダウン実験
A431，DJM1 細胞にそれぞれ shRNA を用いて Drp1 をノックダウンした細胞株を作成した（実験方法 3-1 を参照）．ウエスタンブロットにより，タンパクレベルで A431，DJM1 いずれの細胞株でも Drp1 の発現量が低下していることを確認した.

続いて，細胞増殖能について評価した．Direct cell counting による増殖曲線を作成したところ，Drp1 のノックダウン群はコントロール群に比べて細胞増殖が有意に低下していた（図 13）．また，コロニー形成能で長期増殖能について比較を行ったところ，Drp1 のノックダウン群はコントロール群に比べて，有意にコロニー増殖能が低下していた（図 14）.

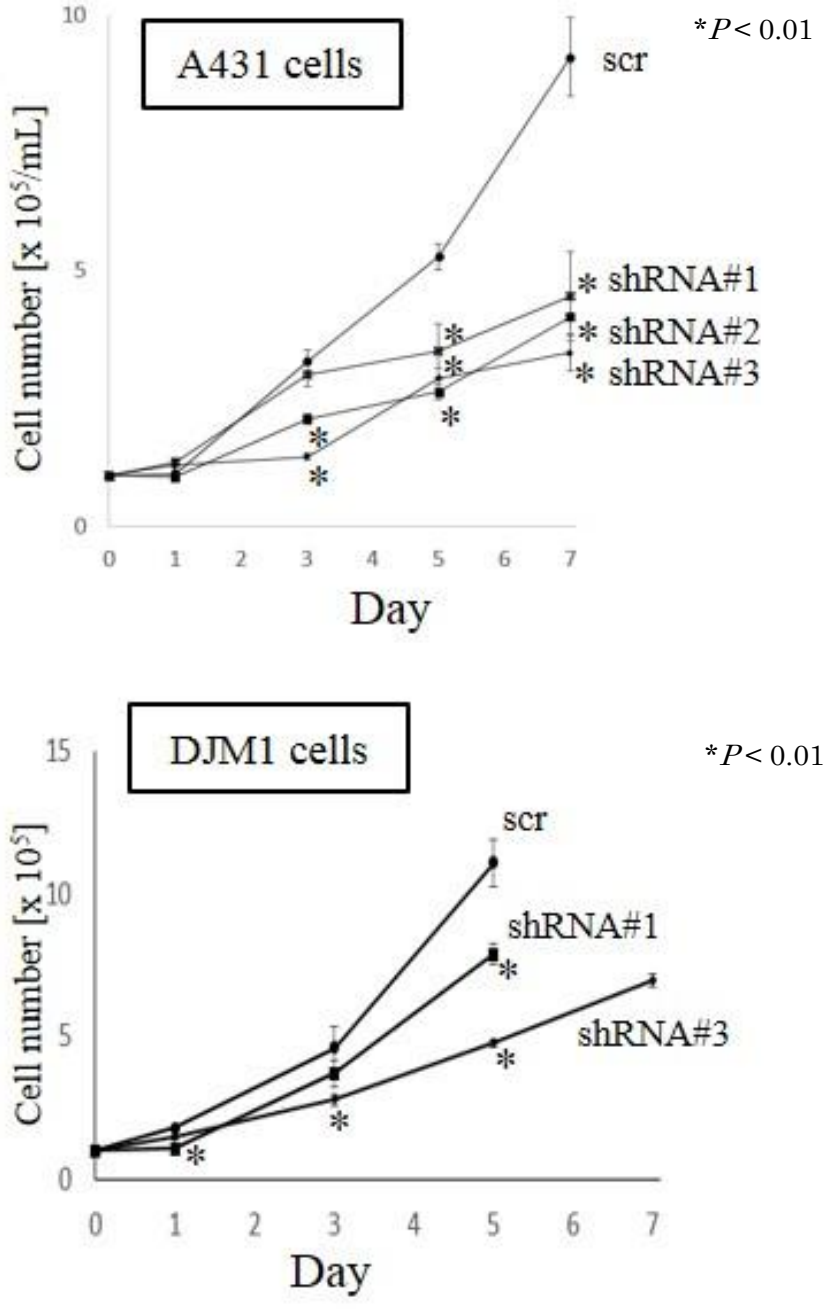


図 13：Drp1 をノックダウンしたときの増殖曲線

A431,DJM1 のいずれにおいても，Drp1 のノックダウンにより細胞増殖は有意に低下していた（各群 N=3，*t*-test）.

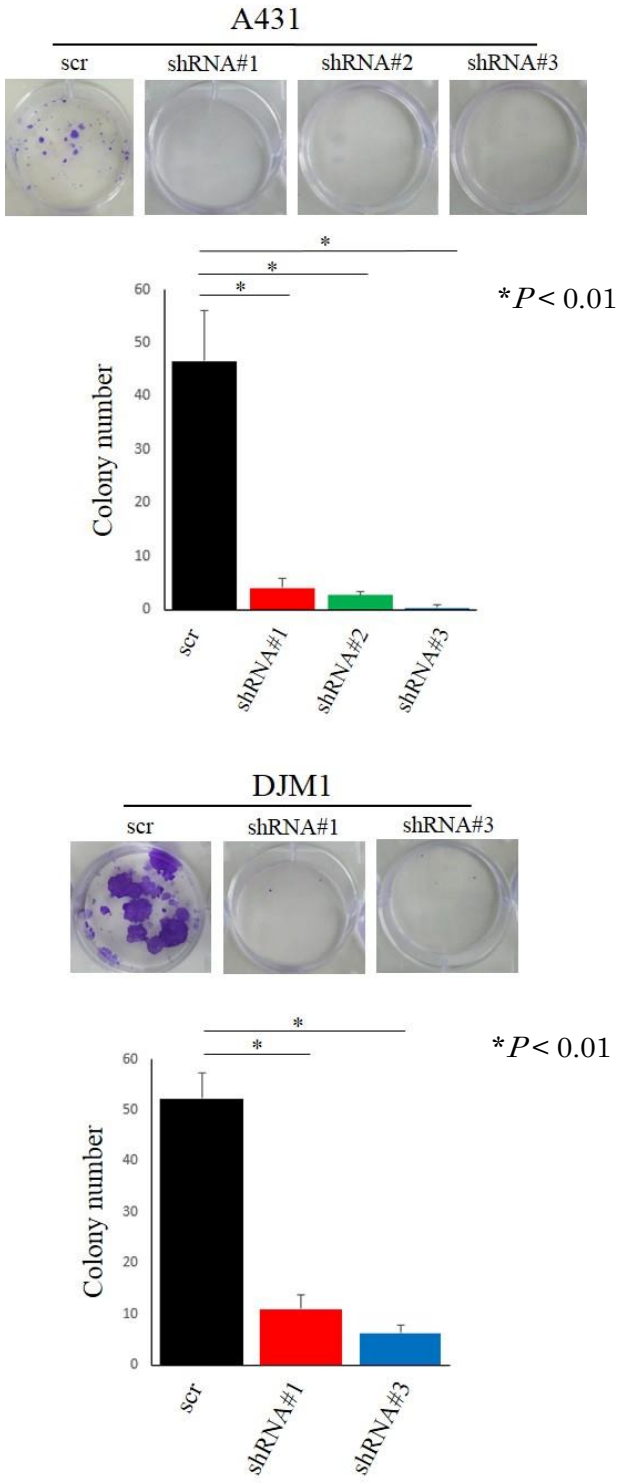


図 14：Drp1 ノックダウンによるコロニー形成能の評価
A431,DJM1 ともに Drp1 のノックダウンによりコロニー形成能が有意に低下しており，長期の細胞増殖能を阻害した（各群 N=3，*t*-test）.

次に，短期間の Drp1 ノックダウンの影響を評価するため， Drp1 をノックダウンした DJM1 細胞の 48 時間後の dead cell ratio を測定したところ，2 群間に有意差は認められなかった（図 15）.

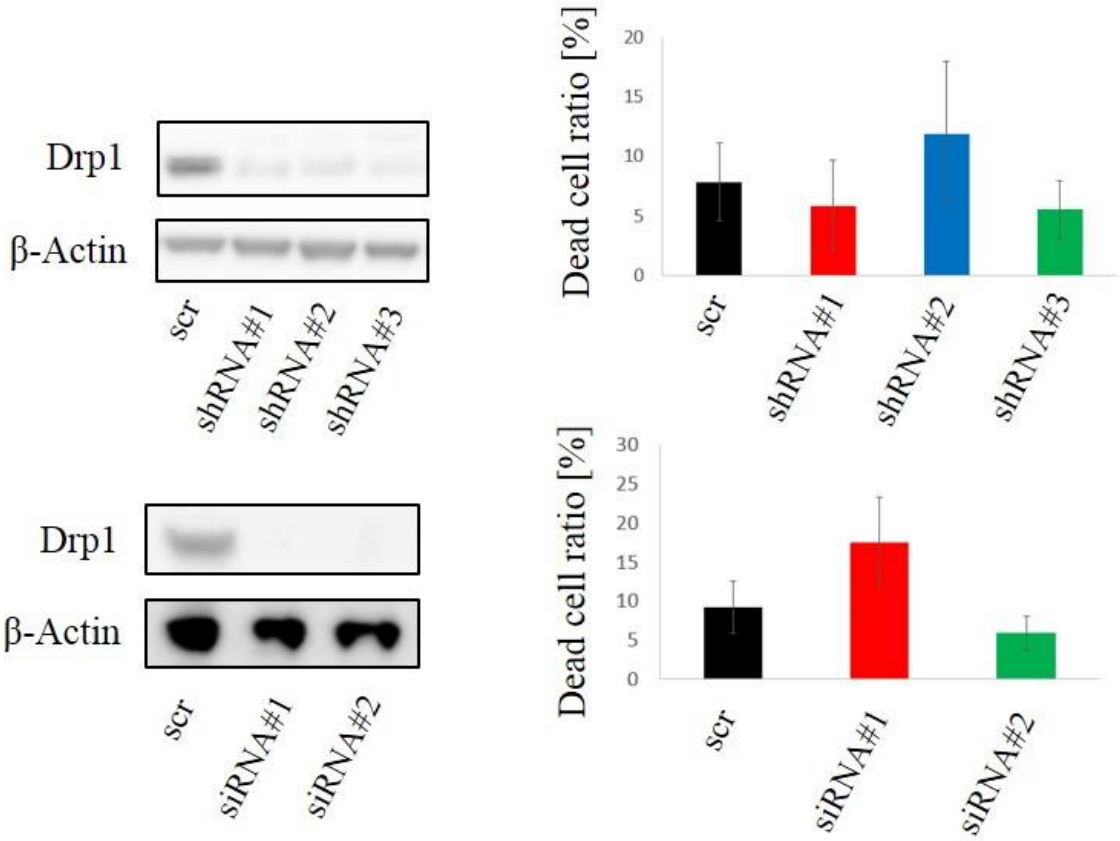


図 15：Drp1 をノックダウンしたときの dead cell ratio（DJM1 細胞）
shRNA および siRNA を用いて Drp1 ノックダウン細胞株をそれぞれ作成した．Drp1 のノックダウンは，ウエスタンブロットによりそれぞれ確認した（siRNA: トランスフェクション 24 時間後，shRNA: puromycin セレクション後にそれぞれライセートを回収）．48 時間後の dead cell ratio は，コントロールと比較して，ノックダウンした細胞株で有意な差はみられなかった．

続いて，Drp1 阻害剤（Mdivi-1）添加時の増殖能について，A431，DJM1，HPEKp，NHDF 細胞のそれぞれで評価を行った．いずれも濃度依存的に cell viability ratio が低下していたが，NHDF のみ Mdivi-1 30μM 添加下でも有意差を認めなかった．コロニー形成能は，4 種類いずれも Mdivi-1 添加下で有意に低下していた（図 16，図 17，図 18）．

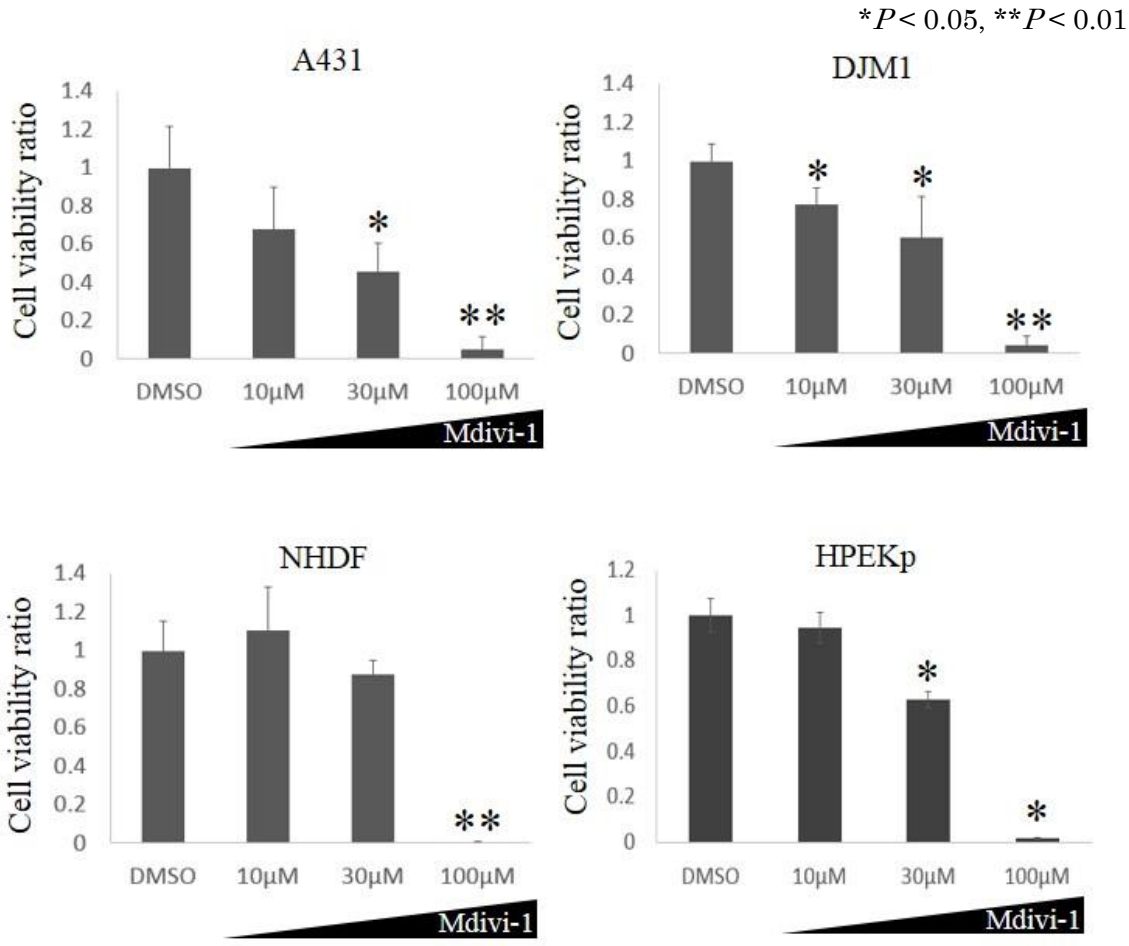


図 16：Mdivi-1 添加時の cell viability ratio

DJM1 は 10μM で細胞増殖が抑制され，A431, HPEKp は 30μM で有意に低下していた．100μM では，NHDF の cell viability ratio も低下した．これより，濃度依存性に Mdivi-1 は活性を示すことが示唆された（*t*-test，各群 N=3）．

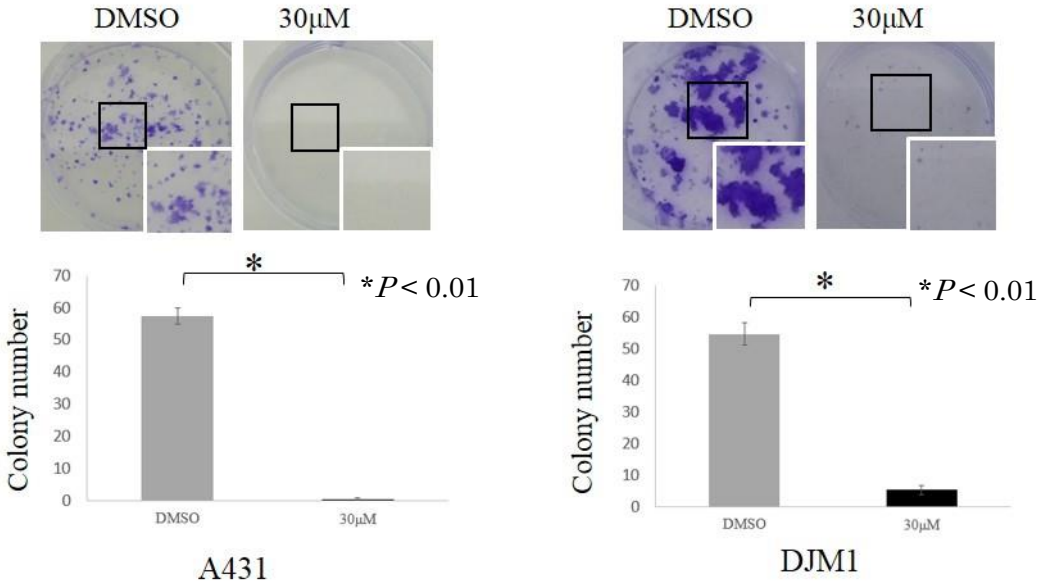


図 17：Mdivi-1 添加時（30μM）のコロニー形成能の変化（A431,DJM1）
A431,DJM1 のいずれにおいても，Mdivi-1（30μM）添加により，コロニー形成能は DMSO 投与群に比べて有意に低下していた（*t*-test，各群 N=3）.

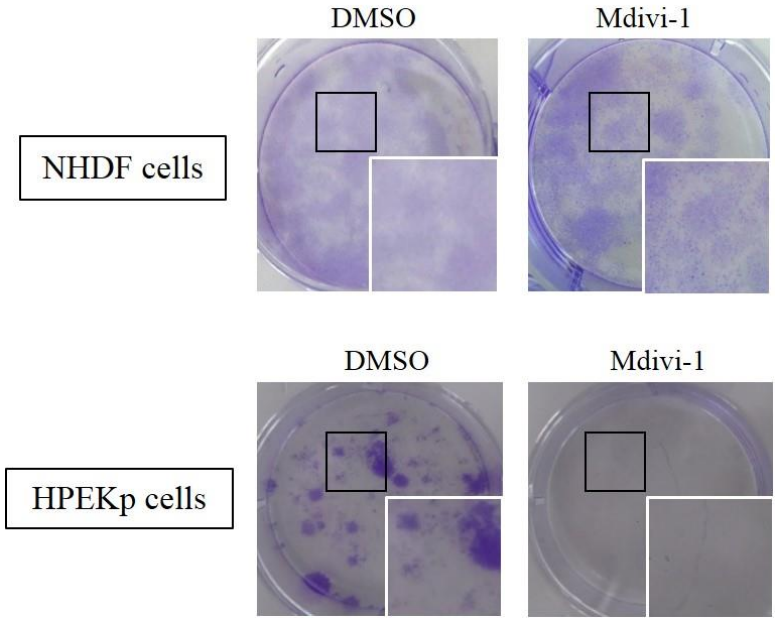
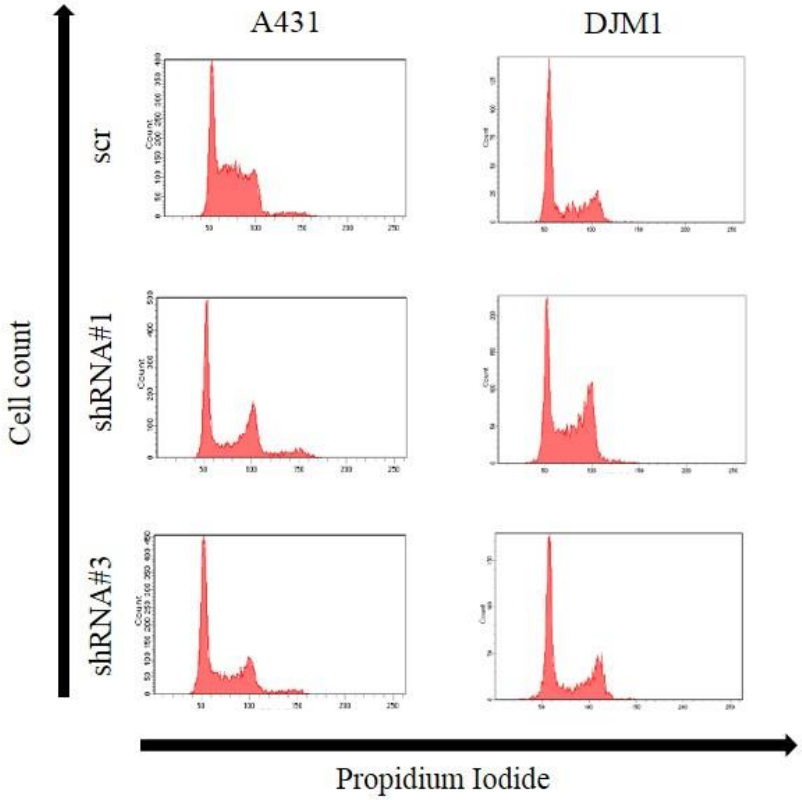


図 18：Mdivi-1 添加時（30μM）のコロニー形成能（NHDF, HPEKp）
30μM の Mdivi-1 添加により，NHDF のコロニー形成能は低下しなかったが，HPEKp では DMSO 投与群に比べてコロニー形成能の低下を認めた.

以上の結果より，Drp1 のノックダウンによって，皮膚有棘細胞癌は短期的・長期的いずれにおいても増殖能が抑制されることが明らかになった．また，正常ケラチノサイトも含めて細胞増殖に寄与する分子であることが示唆された.

２．Drp1 の発現抑制は細胞周期を G2arrest に誘導する

次に，ヒト有棘細胞癌株 A431，DJM1 を用いて，Drp1 のノックダウンによる細胞周期への影響を FACS で評価した．その結果，A431，DJM1 細胞のいずれにおいても，Drp1 ノックダウン細胞では 4N 細胞（G2/M 期に相当）の割合がコントロール群と比べて高かった（図 19）．



		G0/G1	S	G2/M
A431	scr	42.5	36.8	20.6
	shRNA#1	55.3	17.9	26.7↑
	shRNA#3	48.6	14.2	37.1↑
DJM1	scr	59.9	16.9	23.1
	shRNA#1	40.8	22.6	36.5↑
	shRNA#3	56.8	14.8	28.3↑

(%)

図 19：Drp1 の欠失による細胞周期の変化

Drp1 のノックダウンにより，4N の DNA 量をもつ細胞集団が増えており，細胞周期は G2/M 期に誘導された．

免疫ブロット法では，Drp1 ノックダウン細胞は，コントロール群に比べて M 期の細胞周期マーカーである phospho-histone H3 が低発現しており，また G2 期のマーカーである CDK1 は高発現していた（図 20）.

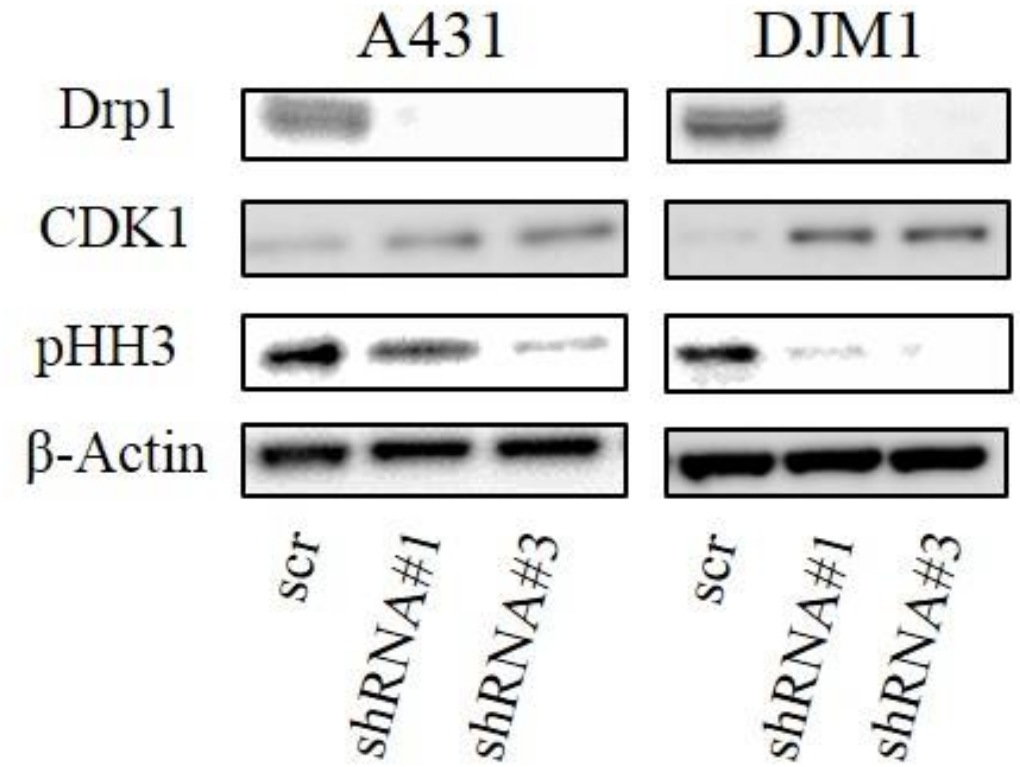


図 20：Drp1 のノックダウンと細胞周期関連蛋白の免疫ブロット結果
A431,DJM1 のいずれにおいても，Drp1 のノックダウンにより CDK1 は高発現，pHH3 は発現量が低下していた（scr = scrambled control）.

これらの結果より，Drp1 のノックダウンにより細胞周期は G2 アレストに誘導されることが示唆された.

３．Drp1 の低下はミトコンドリアネットワークを延伸する

これまでの報告で，Drp1 はミトコンドリアの分裂に関与していることが分かっている（Westermann B et al., 2008; Horbay R et al., 2016; Frank S et al., 2001）．そこで，皮膚有棘細胞癌でも同様の結果が得られるか，ミトコンドリアの形態学的評価を Mito-tracker を用いて行った．その結果，Drp1 のノックダウン細胞は，コントロール群と比べて長く融合したミトコンドリアネットワークが観察された（図 21）．

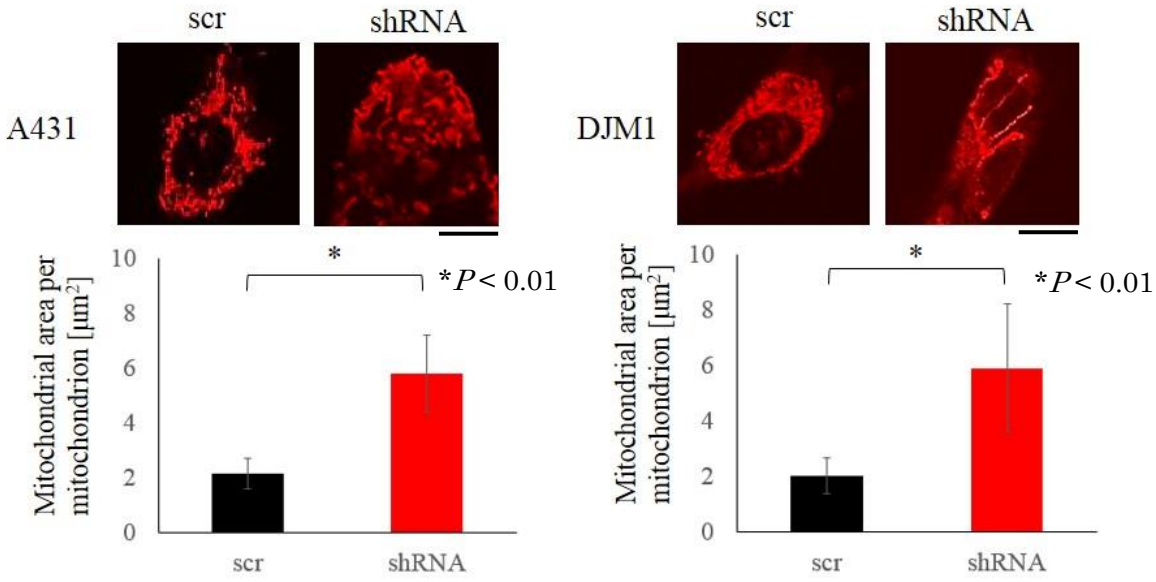


図 21：shRNA により Drp1 をノックダウンしたときのミトコンドリアの形態
A431,DJM1 のいずれの細胞においても shRNA で Drp1 をノックダウンすると，コントロール群と比較して，長いミトコンドリアネットワークが観察された（*t*-test，各群 N=10，scale bar = 20μm）．

また，Drp1 阻害剤添加条件下（30μM）においても，Drp1 をノックダウンしたときと同様に，コントロール群に比べて長く融合したミトコンドリアネットワークが観察された（図 22）．

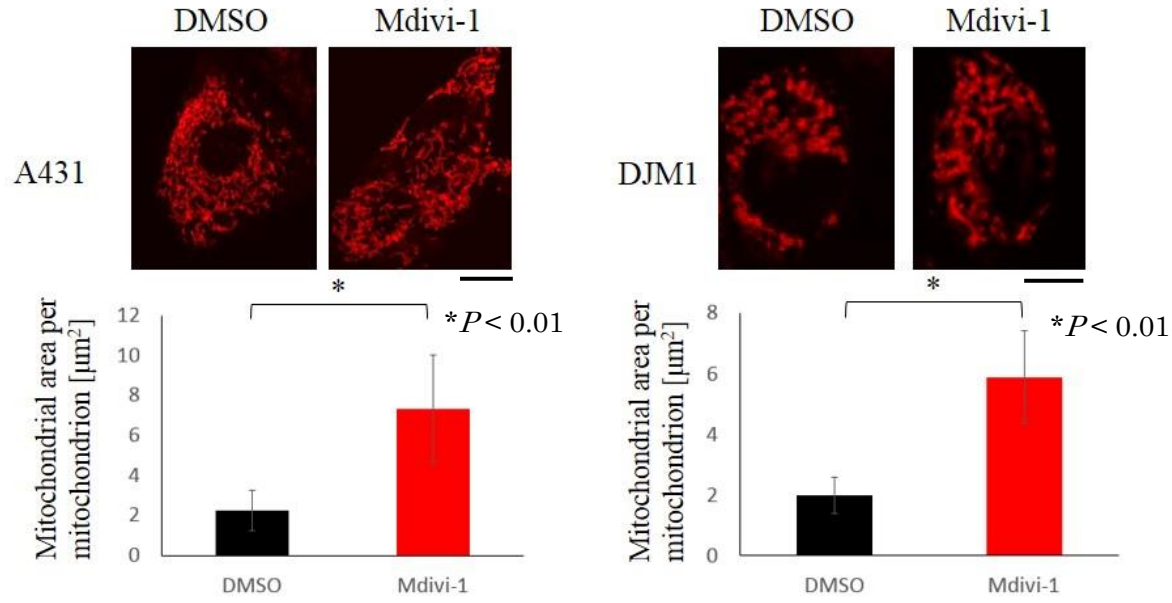


図 22：Mdivi-1 添加時（30μM）のミトコンドリアの形態

6cm ディッシュに 30-40%コンフルエントになるように細胞を播種し，Mdivi-1 30μM の添加した．24 時間後に Mito-tracker を用いてミトコンドリアを蛍光染色して観察した（コントロールには DMSO を添加）．その結果，Mdivi-1 の添加によって長いミトコンドリアネットワークが観察された（*t*-test，各群 N=10，scale bar = 20μm）．

これらの結果から，皮膚有棘細胞癌においても，Drp1 の発現低下また阻害により，ミトコンドリアは分裂がうまくできず，融合した長いミトコンドリアネットワークが見られ，Drp1 はミトコンドリアの分裂を調整していることが分かった．

４．皮膚有棘細胞癌においては，MAPK シグナルが Drp1 活性化経路としてはたらく

MAPK シグナル経路が Drp1 のリン酸化（Ser616）を調整し，ミトコトンドリアの分裂を誘導すると報告されている（Kashatus JA, et al., 2015）．そこで，皮膚有棘細胞癌における MAPK-Drp1 シグナル機構について調べるため，MEK 阻害剤 PD325901（Cayman Chemical）を培養細胞株に添加して動態を観察した．その結果，PD325901 は $ERK^{1/2}$ および $Drp1^{Ser616}$ のリン酸化を阻害した（図 23，図 24）．

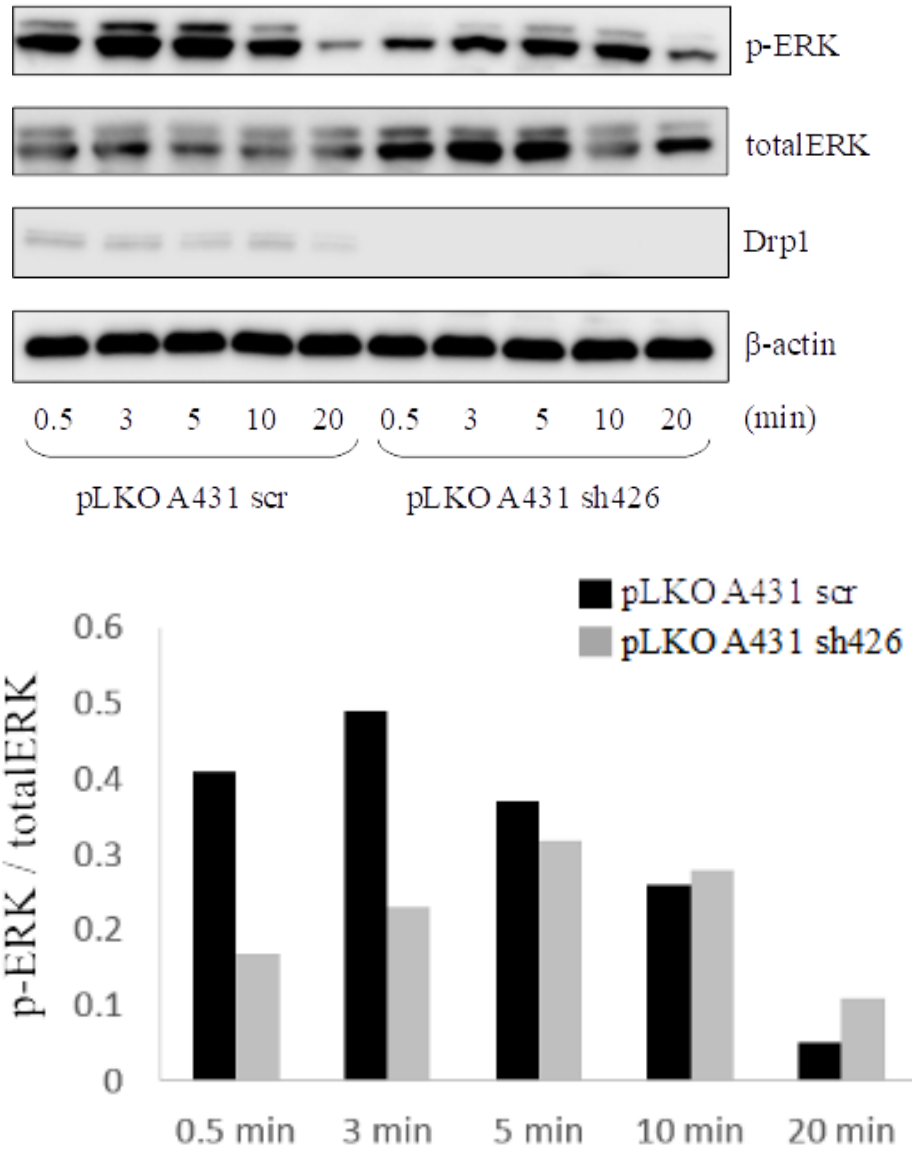


図 23：FBS 刺激によるリン酸化の時間的変異

0.1%FBS 入り DMEM で 24 時間静置した後に，10%FBS で刺激を行い，タイムラプスで時間を振った後にライセートを回収し，ウエスタンブロットで ERK のリン酸化量がどのように変化するかを確認した．刺激 5 分で発現量が最も多かったため，以後のリン酸化刺激は FBS 刺激後 5 分でライセートを回収して行った．

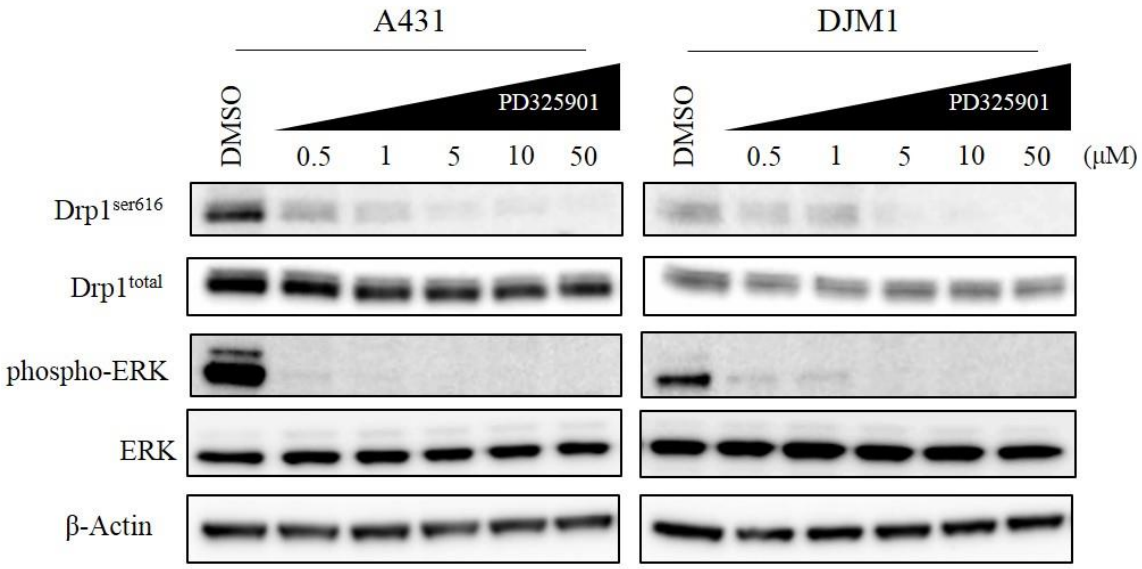


図 24：MEK 阻害剤添加による MAPK 経路関連分子の動態

PD325901 の添加により，Drp1 のリン酸化（Ser616）は濃度依存性に発現量が低下した．また，ERK リン酸化も同様に濃度依存性に発現量が低下しており，MEK の下流で Drp1,ERK が機能することが示された．

次に，MEK 阻害剤が長期増殖能に与える影響について評価した．5.0×10^3 個の観察対象細胞を 6well plate に播種し，DMSO および 1μM の PD325901 を添加してそれぞれにおけるコロニー形成能を観察した．その結果 A431，DJM1，HPEKp の細胞株でコロニー形成能の低下が見られた．NHDF は PD325901 の添加によりコロニー形成能は変化しなかった（図 25，図 26）．

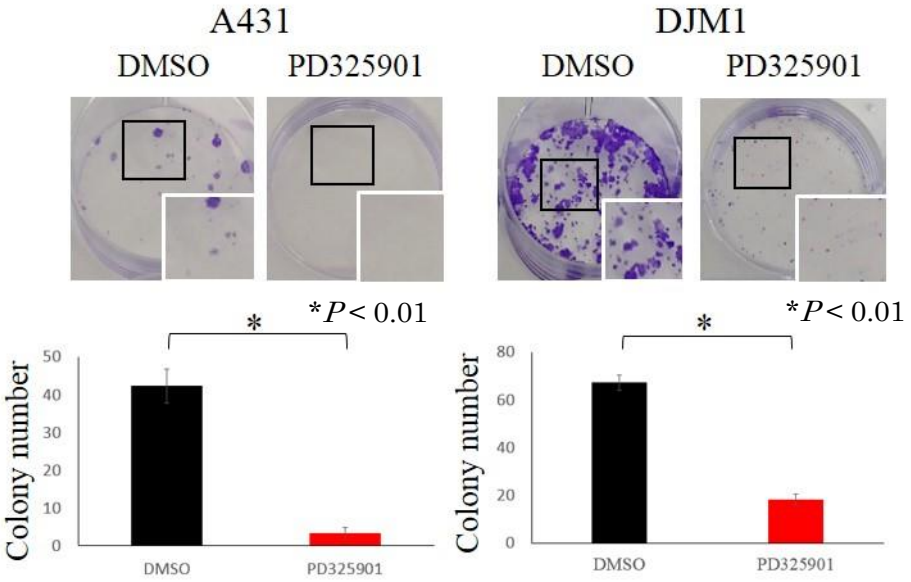


図 25：MEK 阻害剤添加下でのコロニー形成能（A431，DJM1）
PD325901（1μM）を添加すると，A431，DJM1 いずれの細胞株においてもコロニー形成能が低下した（*t*-test，各群 N=3）.

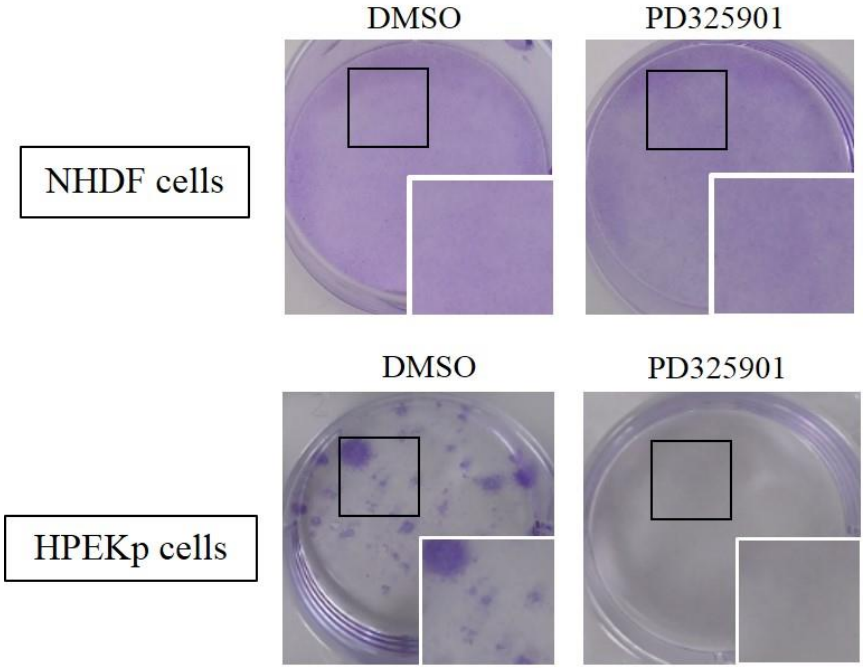


図 26：MEK 阻害剤を添加したときのコロニー形成能（NHDF，HPEKp）
PD325901 を添加すると，HPEKp ではコロニー形成能が低下するが，NHDF では変化しなかった.

ミトコンドリアの形態学的観察においては，PD325901 添加群では長く融合したミトコンドリアネットワークが認められた. これらの結果は Drp1 ノックダウン実験と同様であった（図 27）.

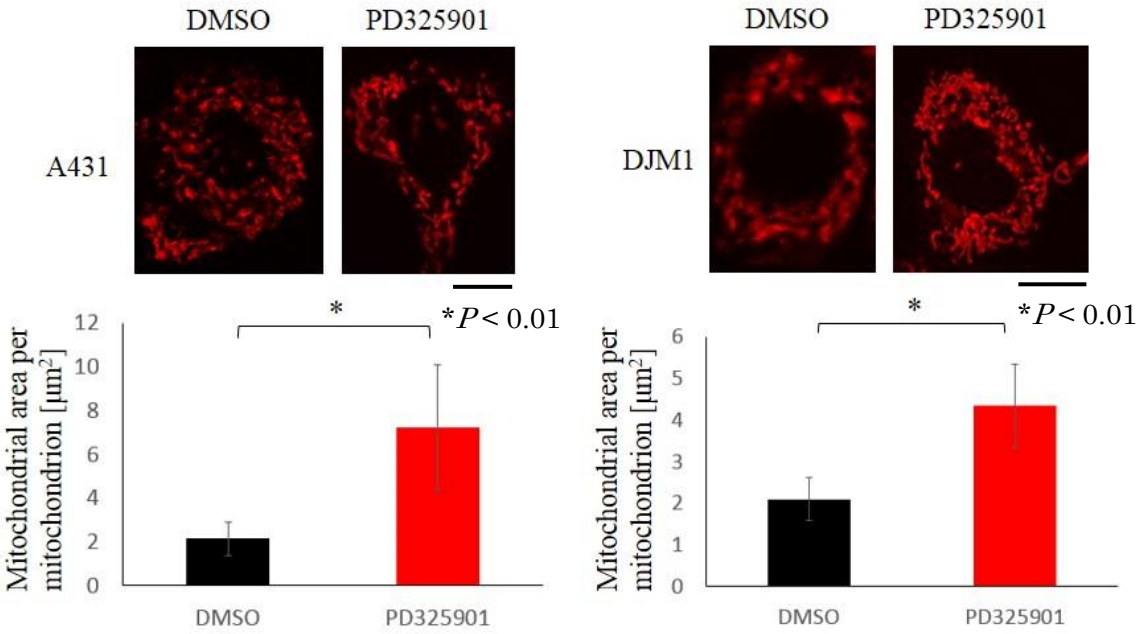


図 27：MEK 阻害剤を添加したときのミトコンドリアの形態変化
A431,DJM1 のいずれの細胞においても，PD325901 添加により，融合した長いミトコンドリアネットワークが観察された（*t*-test，各群 N=10, scale bar = 20μm）.

５．Drp1 のノックダウンは in vivo でも腫瘍を抑制する

In vivo における Drp1 の有棘細胞癌の機能について評価するため，shRNA（scrambled control, shRNA#3）トランスフェクション処理した DJM1 細胞を，5.0×10^6 個ずつ 3 匹のヌードマウスの側腹部にそれぞれ皮下注射して異種移植を行い，Xenograft を作製した．経時的に腫瘍の動態について観察したところ，Drp1 をノックダウンした shRNA#3 の群では，コントロールに比べて腫瘍の volume，重量ともに有意に低くなっていた（図 28，図 29，図 30）．Drp1 のノックダウンは，免疫ブロット法にて確認した（図 31）.



図 28：ヌードマウスに移植した皮膚 xenograft
術後 15 日で腫瘍を摘出した．Drp1 をノックダウンした群では，コントロールに比べて有意に腫瘍のサイズが有意に小さかった（scr = scrambled control）.

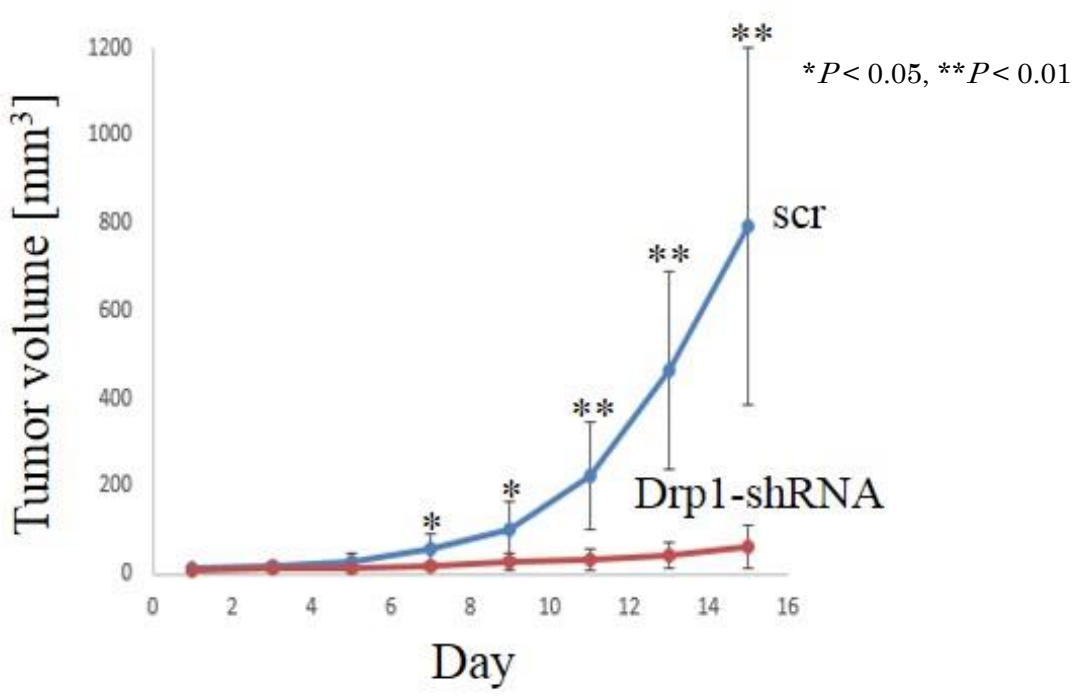


図 29：Xenograft の腫瘍サイズの動態
Drp1-shRNA 群はコントロール群に比べて，移植後 7 日後より有意に腫瘍の増大スピードが遅かった（*t*-test，各群 N=5, scr = scrambled control）.

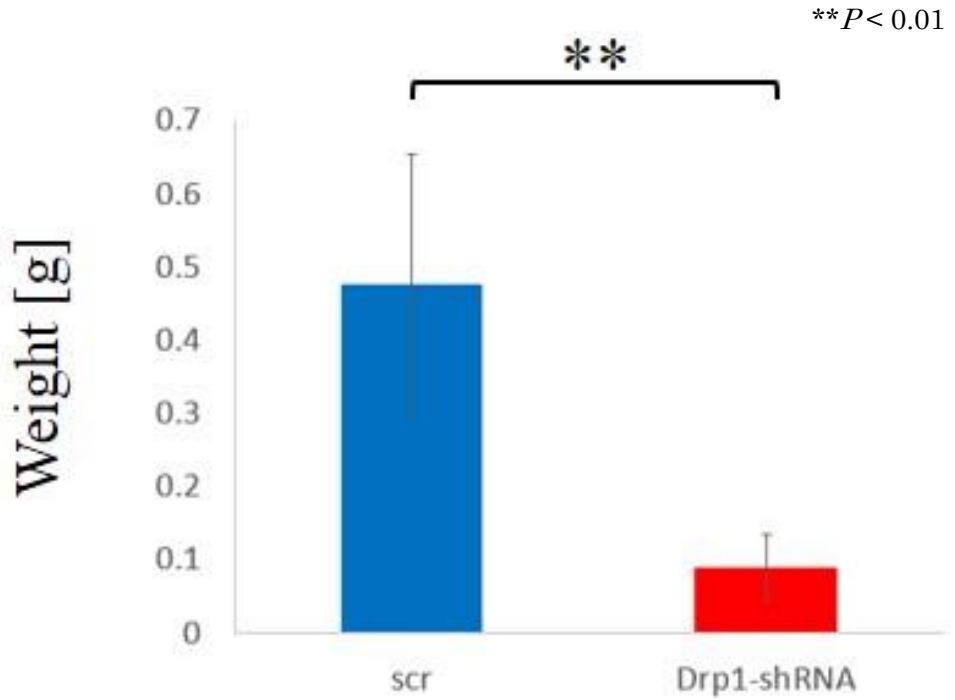


図 30：移植した xenograft の重量

Drp1-shRNA 群はコントロールに比べて，移植した腫瘍の重量でも有意に低かった．腫瘍は移植後 15 日目に摘出した（*t*-test，各群 N=5, scr = scrambled control）．

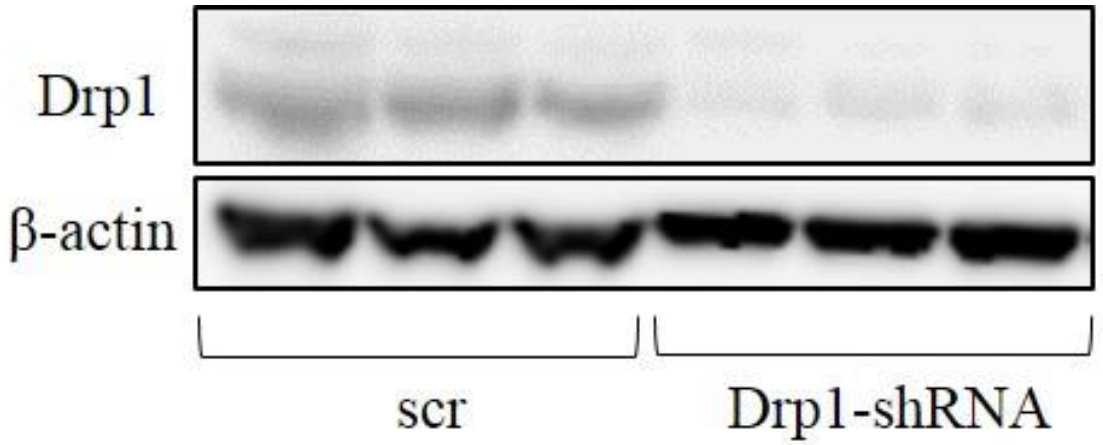


図 31：摘出した腫瘍の免疫ブロットによる Drp1 の発現解析

独立した 3 検体ずつの腫瘍組織から得た lysate をそれぞれ使って，ウエスタンブロットにより Drp1 のタンパクレベルでの発現量を解析した．Drp1-shRNA 群では Drp1 の発現が低下していることが確認された（scr = scrambled control）．

続いて，摘出した腫瘍細胞の病理組織学的観察をおこなった（図 32，図 33）．Ki-67 染色および TUNEL 染色を用いて腫瘍の細胞増殖能とアポトーシスについて検討したところ，Drp1 のノックダウン群で有意に Ki-67 index は低く，TUNEL 染色陽性細胞数が高かった（図 34，図 35）．

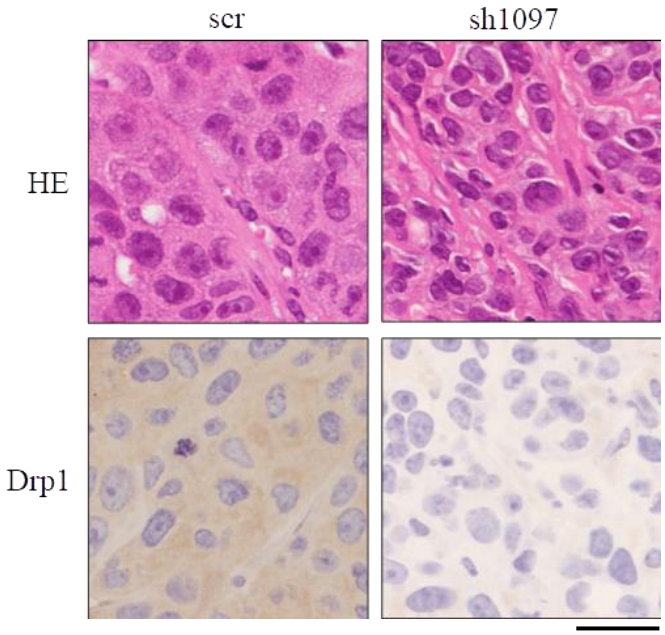


図 32：Xenograft の病理組織学的解析

HE 染色では大きな差は認めなかったが，Drp1 免疫染色では Drp1 ノックダウン細胞では Drp1 の発現低下を認めた（scr = scrambled control, scale bar = 50μm）．

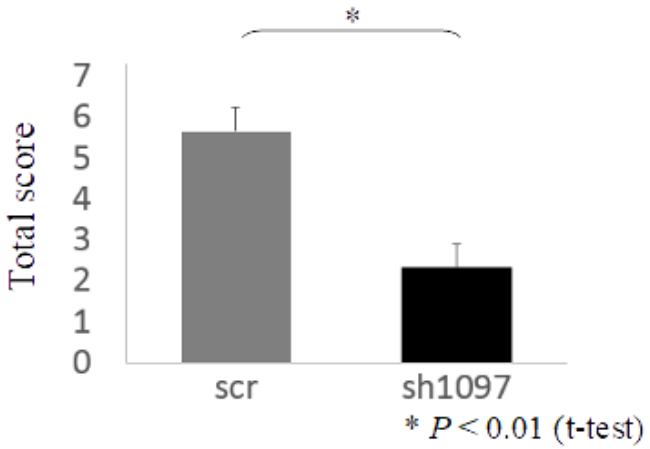


図 33：Xenograft の Drp1 免疫スコアの比較

Drp1 ノックダウン群で有意に Drp1 のスコアが低かった（*t*-test，各群 N=5，scr = scrambled control）．

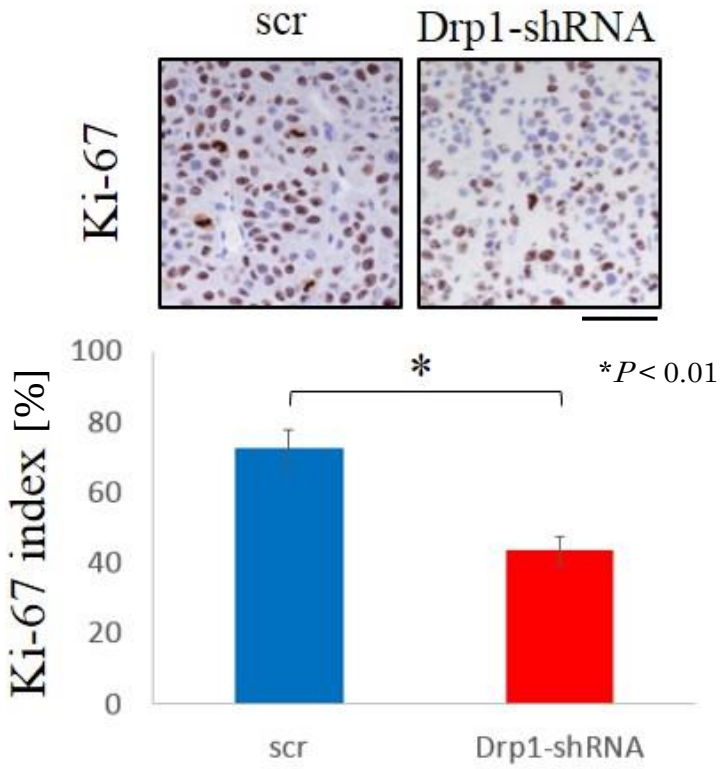


図 34：Xenograft の Ki-67 染色結果

Drp1 をノックダウンした群では，コントロールに比べて有意に Ki-67 陽性細胞率が低下していた（*t*-test，各群 N=5, scr = scrambled control, scale bar = 100μm）.

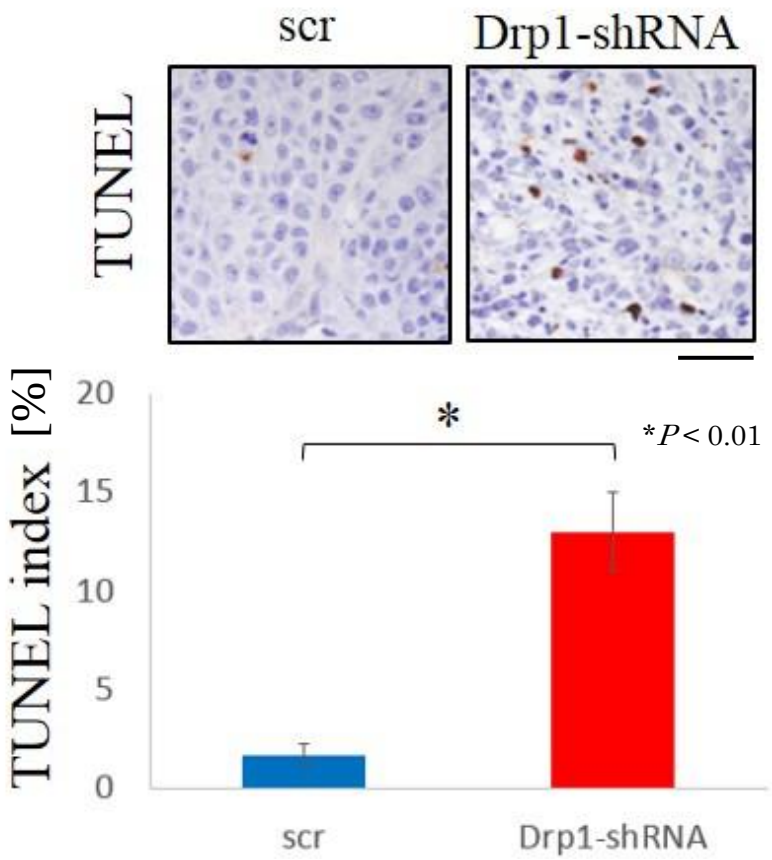


図 35：Xenograft の TUNEL 染色結果
shRNA 導入群では，コントロールに比べて有意に TUNEL 陽性細胞率が増加していた（*t*-test，各群 N=5, scr = scrambled control, scale bar = 100μm）.

次に，Drp1 阻害剤を用いた検討を行った．DJM1 細胞（MOCK）を 5.0×10^6 個ヌードマウスの側腹部にそれぞれ異種移植して xenograft を作製し，腫瘍径が 5-7mm になった時点で 1.75mg の Mdivi-1（25μL の DMSO に溶解して作製）を局所注射して，腫瘍の動態を観察した．その結果，Drp1 阻害剤添加群ではコントロールに比べて腫瘍のサイズ，重量ともに有意に低かった（図 36，図 37）.

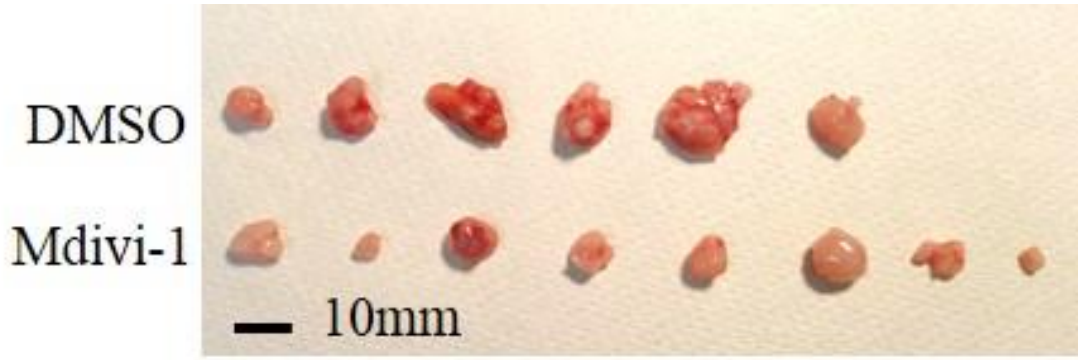


図 36：Drp1 阻害剤添加による xenograft の動態
1.75mg の Mdivi-1 の投与により，移植した xenograft はコントロール群に比べて縮小していた.

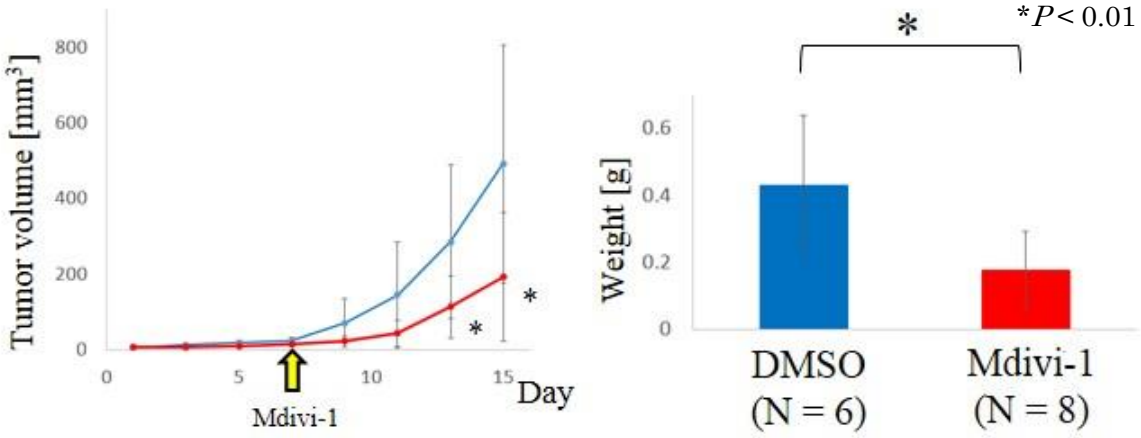


図 37：Drp1 阻害剤を加えたときの腫瘍動態
移植後，7 日目に 1.75mg の Mdivi-1 を腫瘍部に局所注射したところ，腫瘍の増大スピードが低下し，13 日目・15 日目では有意差があった（*t*-test）.

５．皮膚 SCC では Drp1 が高発現しており，病期と相関する

皮膚 SCC における Drp1 の発現量について，データベースの Oncomine（https://www.oncomine.org）を用いて検討したところ，BMC Med Genomics による解析では，皮膚 SCC（N=11）での mRNA レベルで Drp1 発現量は正常皮膚（N=4）に比べて有意に高かった（図 38）．また，臨床検体による免疫染色を行い，スコアリングにより発現量の検討を行ったところ，皮膚 SCC では正常表皮と比較して有意に Drp1 スコアが上昇していた．また，リンパ節転移巣ではさらに Drp1 の発現が亢進していた（図 39），さらに，遠隔転移の有無で 2 群に分け，Drp1 の免染スコアリングを比較したところ，転移あり群は転移のない群と比べて有意に Drp1 発現量が高かった（図 40）．

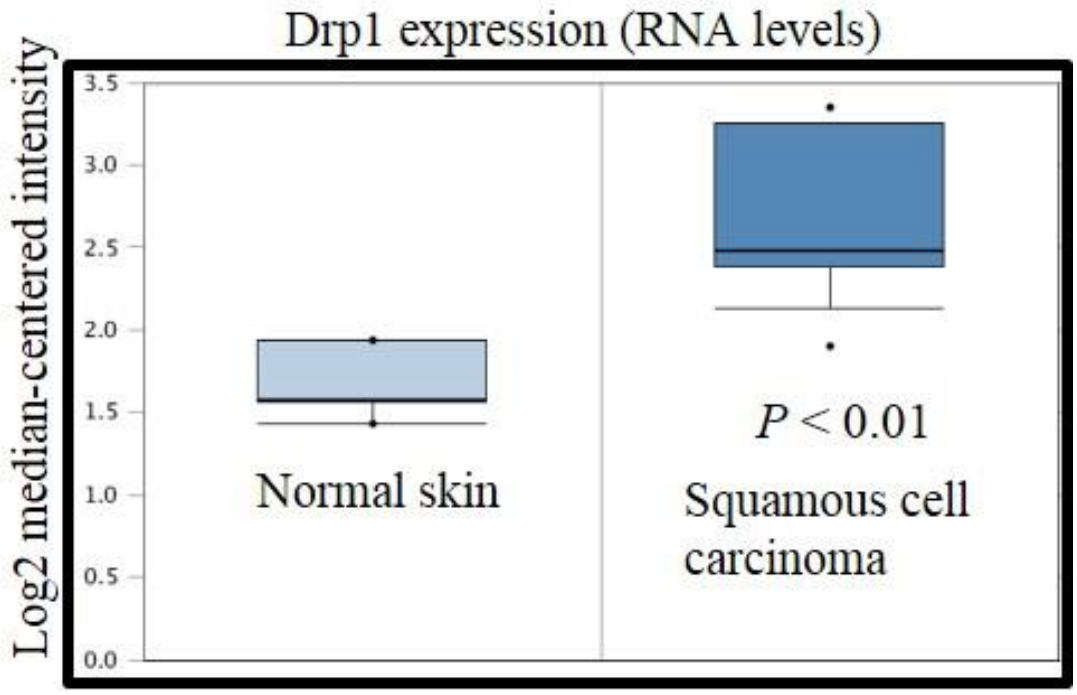
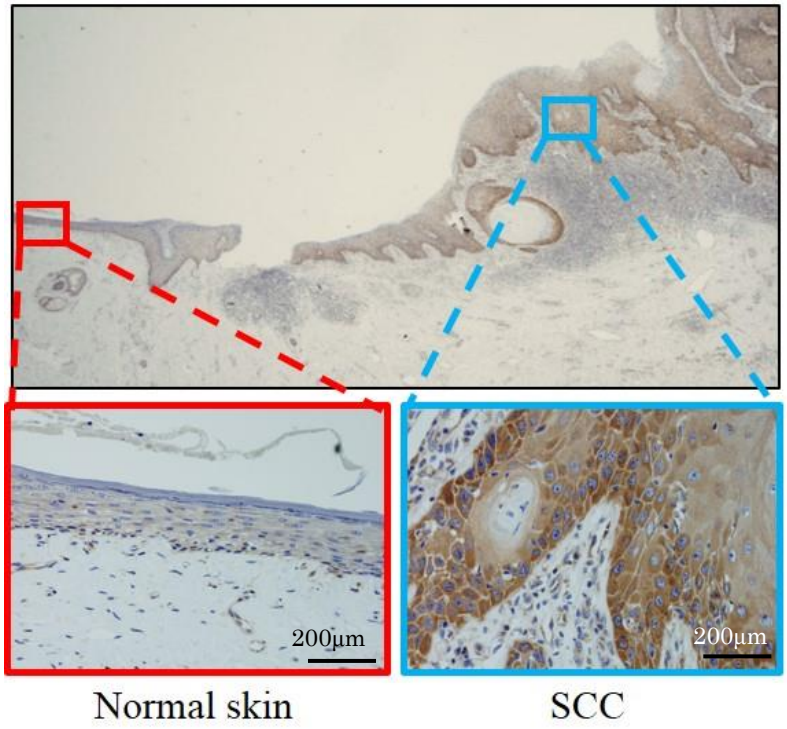


図 38：SCC と正常皮膚での mRNA レベルでの Drp1 発現量（Oncomine）
皮膚 SCC（N=11）は正常皮膚（N=4）に比べて有意に mRNA レベルで Drp1 の発現量が亢進していた．



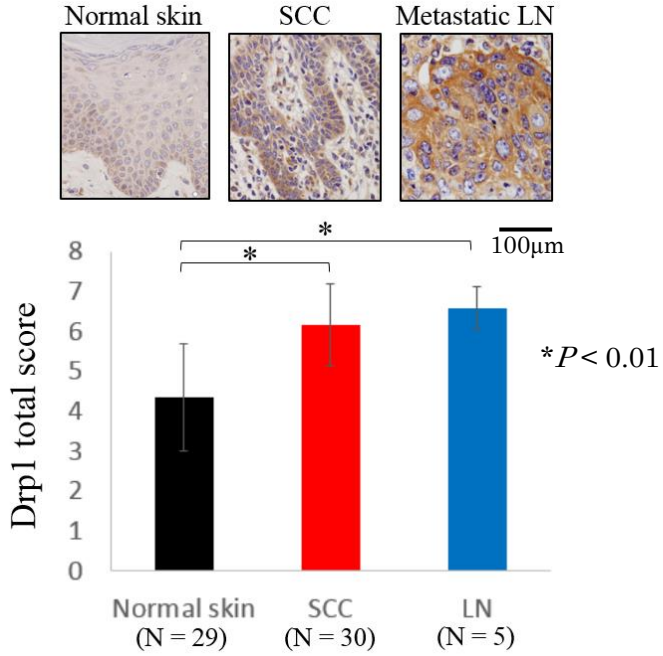


図 39：臨床検体の Drp1 免疫染色結果

SCC（N=30）は正常表皮（N=29）に比べて Drp1 が高発現していた．また，リンパ節転移巣はさらに発現量が高かった（LN = Lymph Node, *t*-test）.

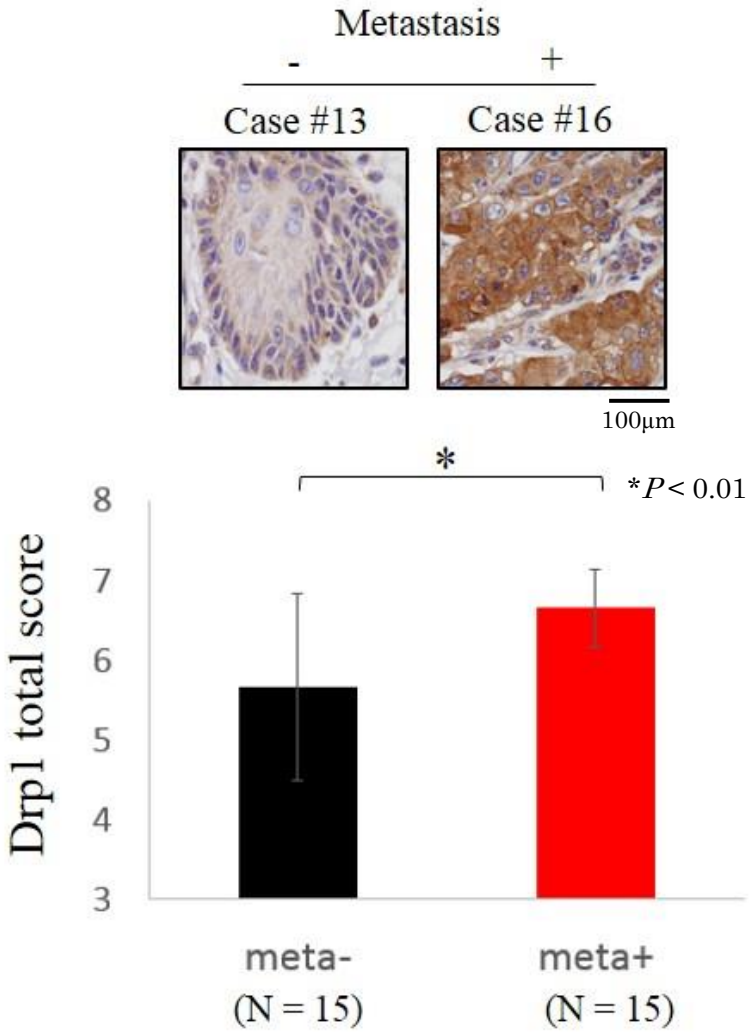


図 40：転移の有無による SCC の Drp1 発現量の比較

SCC において，転移のあり（N=15），なし（N=15）の 2 群に分けて Drp1 発現量を比較したところ，転移のある群の方が有意に Drp1 の発現量が高かった（*t*-test）．

次に，Drp1 発現量と臨床情報についての相関解析を行った．Drp1 スコアと臨床病期には正の相関を認めた（表 5）．また，有意差はでなかったが，分化度とは負の相関傾向を示した（表 6，図 41，P= 0.08）．年齢，腫瘍のサイズとは相関はみられなかった（表 7）．

表 5：Drp1 免疫染色スコアと臨床病期の相関解析

	Clinical stage				Total
Drp1 score	I	II	III	IV	
4	4	0	0	0	4
5	1	0	0	0	1
6	7	1	1	2	11
7	7	0	2	5	14
Total	19	1	3	7	30
$P < 0.05$			r = 0.42		

表 6：Drp1 免疫染色スコアと分化度の相関解析

	Differentiation score				Total
Drp1 score	1	2	3	4	
4	0	0	0	4	4
5	0	0	0	1	1
6	0	0	1	10	11
7	0	0	5	9	14
Total	0	0	6	24	30
$P = 0.08$			r = -0.31		

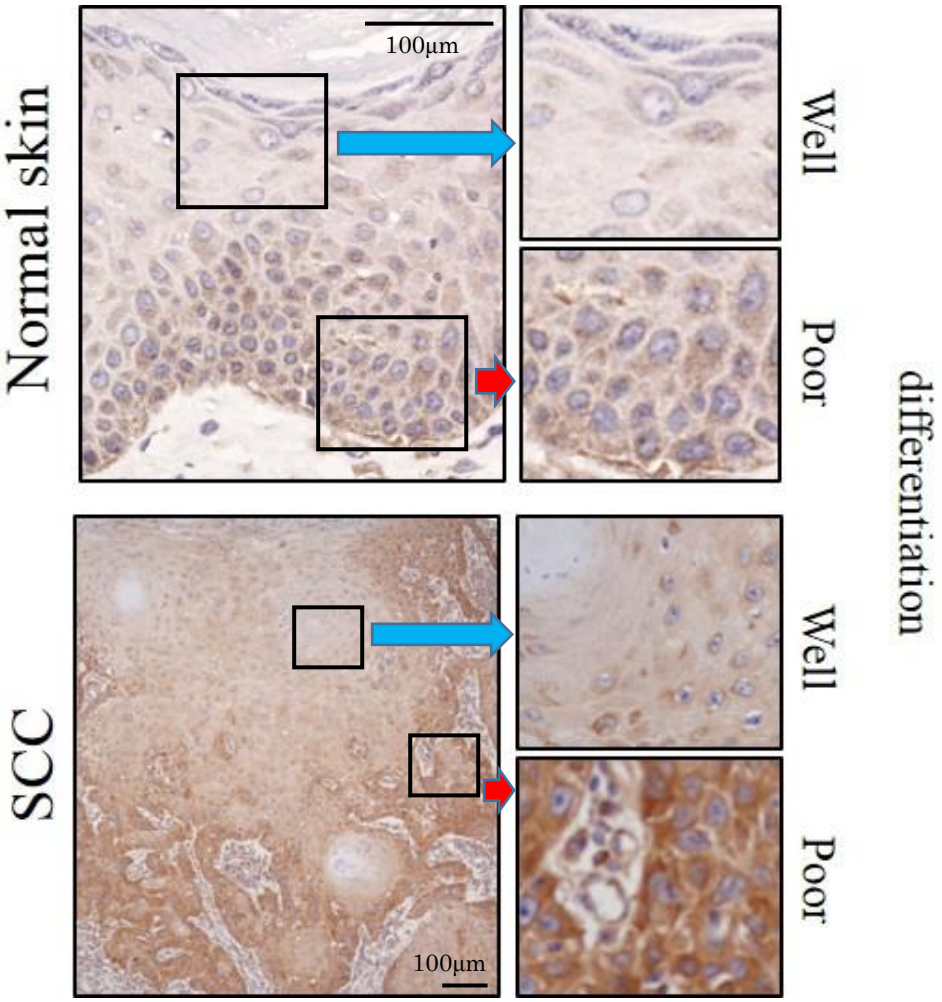


図 41：正常皮膚，SCC における分化度と Drp1 免疫染色の関連性

Drp1 は正常皮膚，SCC のいずれにおいても低分化ほど発現量が多く，高分化になるほど発現量が低下していた．

表 7：Drp1 染色スコアと年齢，腫瘍容積の相関解析

	Age					Total
Drp1 score	-60	61-70	71-80	81-90	91-	
4	1	0	2	1	0	4
5	0	1	0	0	0	1
6	1	1	1	5	3	11
7	0	5	6	3	0	14
Total	2	7	9	9	3	30
P= 0.96			r = 0.008			

	Tumor volume [mm^3]			Total
Drp1 score	-1000	1000-10000	10000-	
4	1	2	1	4
5	1	0	0	1
6	4	4	3	11
7	3	9	2	14
Total	9	15	6	30
P= 0.43		r = 0.14		

Drp1 免疫染色スコアの high / low（total score が平均の 6.3 より大きいかどうかで区切って解析）で 2 群に分けて，生存曲線を作成したところ，2 群間で有意な差は認めなかった（図 42）.

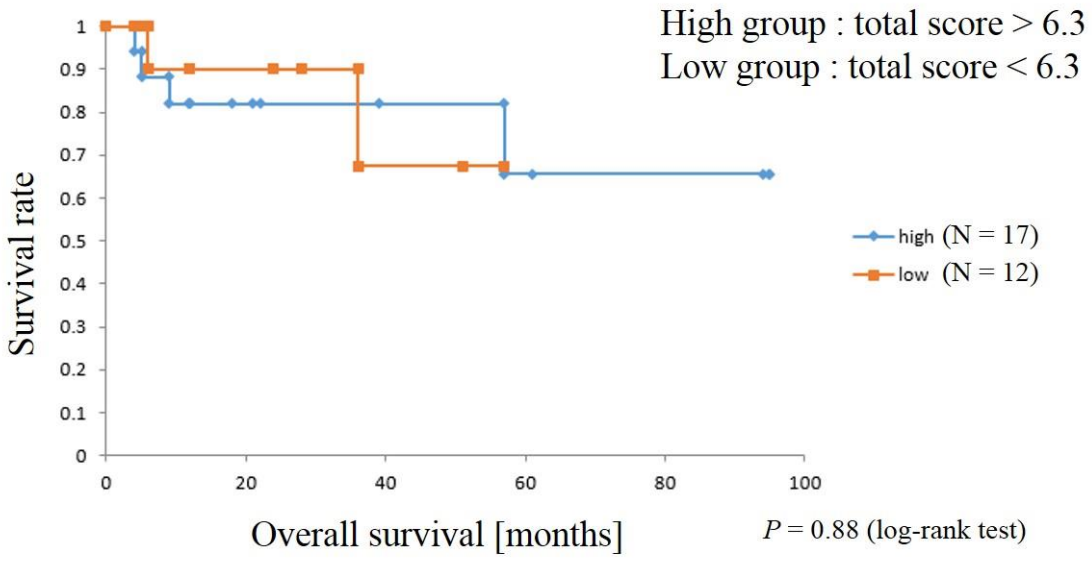


図 42：Drp1 の免疫染色スコアの high/low で分けて描写した生存曲線
Drp1 の免疫スコアの高低で生存期間に有意差は認めなかった.

6．Drp1 の欠失は皮膚の形態・分化異常を示さない

続いて，正常表皮細胞における Drp1 の機能について解析するため，表皮特異的 Drp1 ノックアウトマウスを作製し，皮膚の形態学的解析を行った．肉眼的には，マウスの皮膚は特に異常は認めず，病理組織学的にも表皮細胞の形態や分化は保たれていた（図 43，図 44）．さらに，蛍光染色および電子顕微鏡におけるミトコンドリアの形態観察を行ったが，表皮特異的 Drp1 ノックアウトマウスではミトコンドリアの形態異常はなかった（図 45，図 46）.

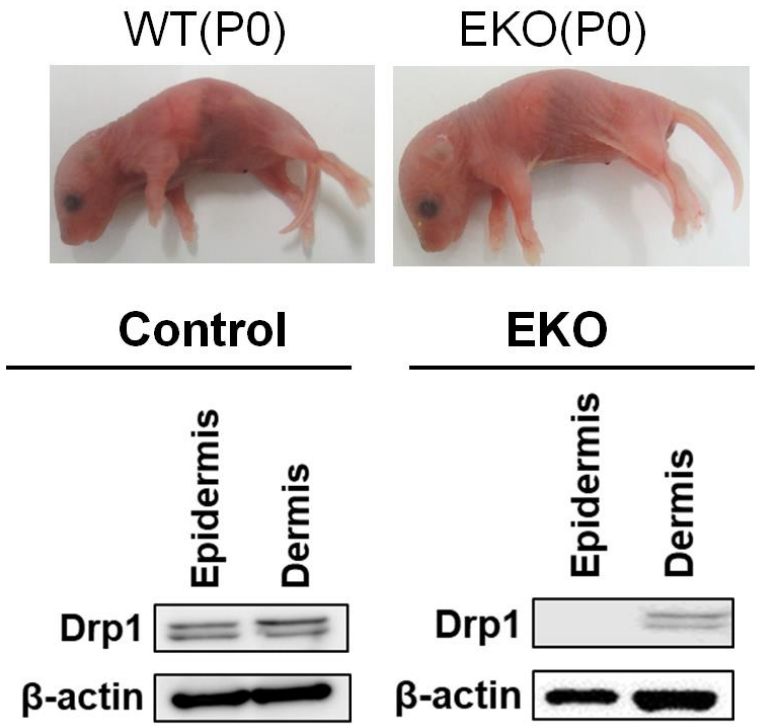


図 43：表皮特異的 Drp1 ノックアウトマウスの作製

表皮特異的 Drp1 ノックアウトマウスは，肉眼的に皮膚の形態異常は示さなかった．マウス皮膚を表皮・真皮に分けてそれぞれ免疫ブロット法を施行し，表皮のみで Drp1 がノックアウトされていることを確認した．

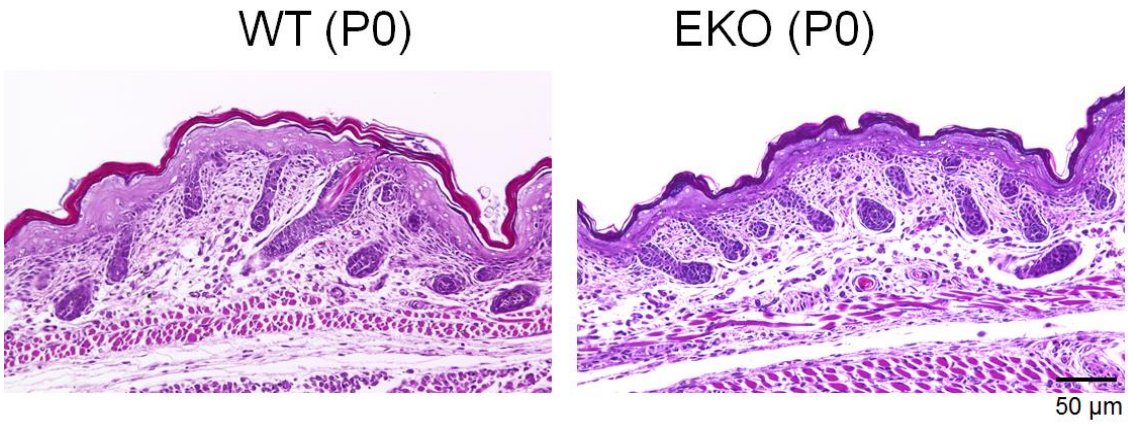


図 44：表皮特異的 Drp1 ノックアウトマウスの病理組織学的解析

病理組織学的に，表皮特異的 Drp1 ノックアウトマウスは皮膚の形態･分化異常は認められなかった．

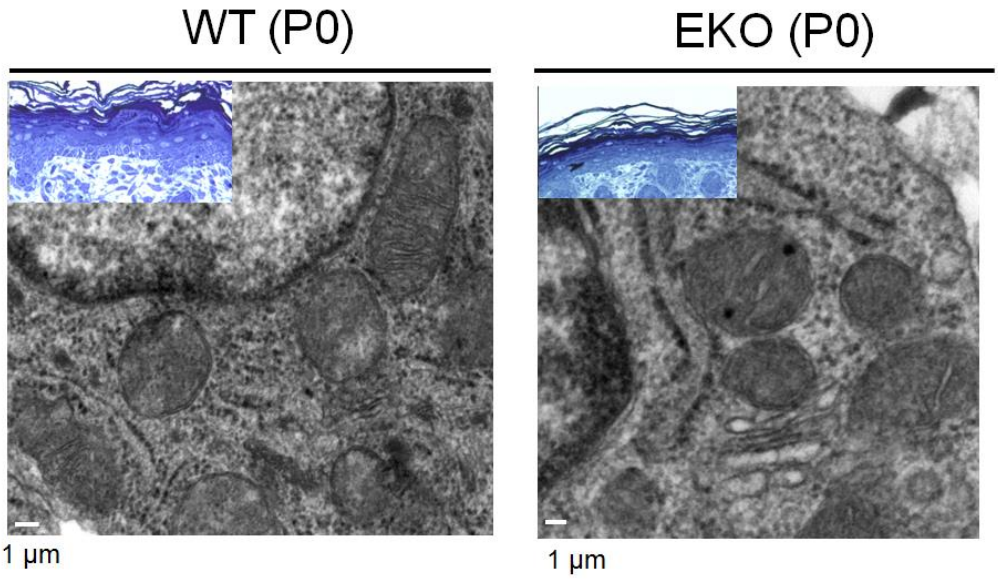


図 45：ミトコンドリアの電子顕微鏡写真

電子顕微鏡下でのミトコンドリアの形態学的観察では，ノックアウトマウスにおける表皮細胞のミトコンドリアの形態変化は認めなかった．

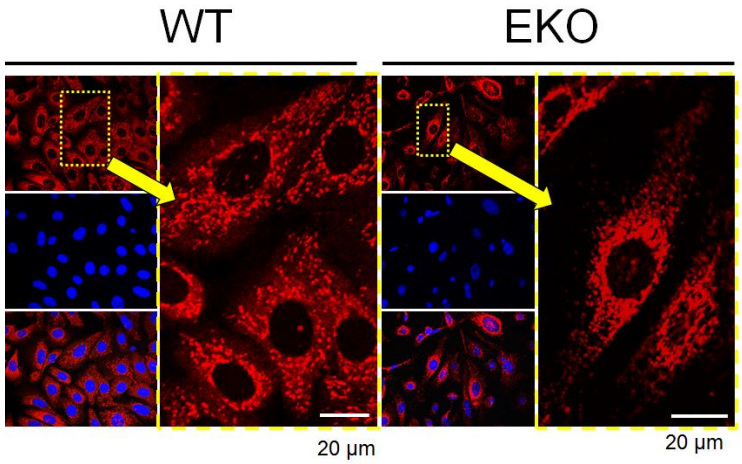


図 46：表皮特異的 Drp1 ノックアウトマウスのミトコンドリア蛍光染色

表皮特異的 Drp1 ノックアウトマウスのミトコンドリアの形態は，野生型とくらべて明らかな違いを示さなかった．

続いて，ヒト表皮細胞である NHDK 細胞に siRNA をトランスフェクションし，Drp1 のノックダウン細胞を作製した（図 47）．Cell viability ratio の観察を行ったが，Drp1 ノックダウン細胞ではコントロールに比べて明らかな低下はみられなかった（図 48）．

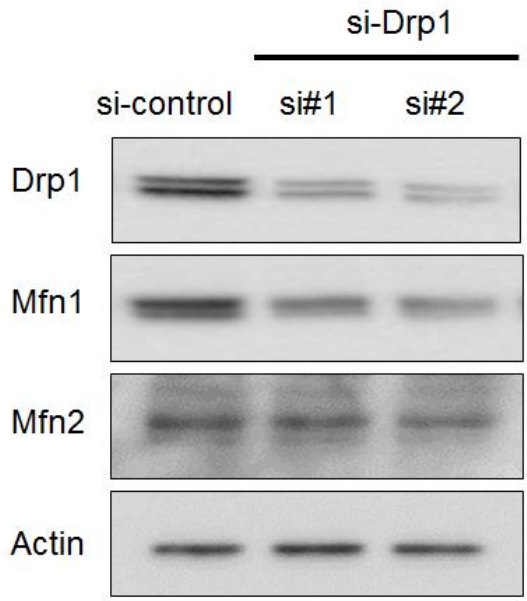


図 47：siRNA による NHDF の Drp1 ノックダウン細胞の作製
NHDF 細胞に siRNA をトランスフェクションし, Drp1 ノックダウン細胞を作製した. 免疫ブロット法で，Drp1 の発現低下を確認した.

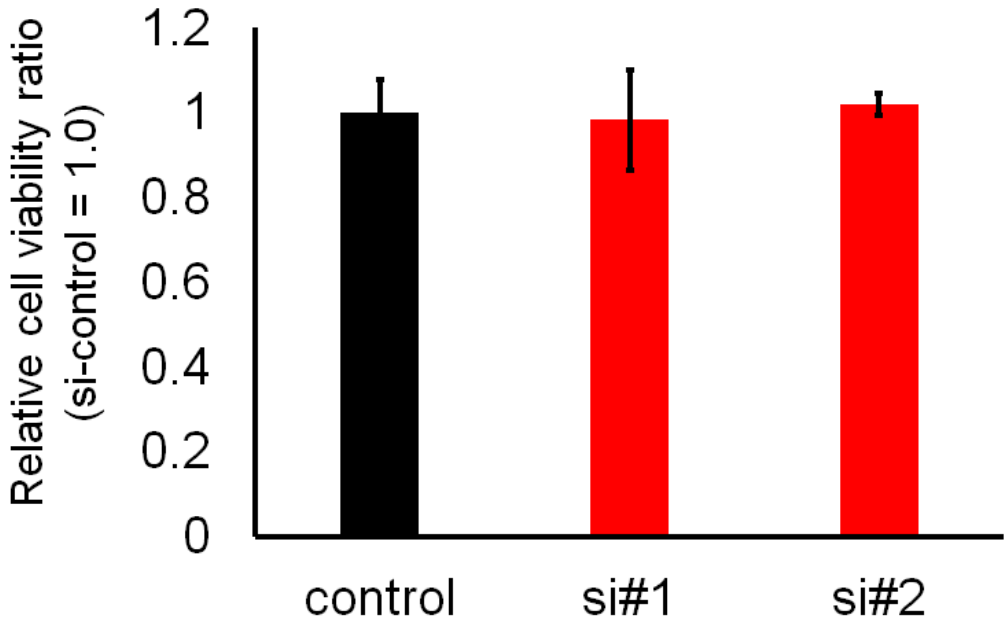


図 48：NHDF 細胞における Drp1 ノックダウン時の cell viability ratio
Drp1 ノックダウン細胞は，コントロールに比べて明らかな cell viability ratio の低下を認めなかった.

7．Drp1 の発現低下により，UVB の短期照射によるアポトーシスには違いがないが，長期照射により発癌が誘導される．

Drp1 のアポトーシスに与える影響としては，Drp1 は Bax の局在や cytochrome c の放出に関与するという報告がある一方で（Wang P et al., 2015），アポトーシスには重要な分子として機能しないとも報告されている（Sheridan C et al., 2008）．また，臨床的には，紫外線が発癌の主要因であることが知られており，UVB による DNA 損傷はアポトーシスによって発癌防止機構がはたらいている．表皮での UVB 依存性アポトーシスについて評価するため，マウス皮膚に紫外線照射を行い，アポトーシス関連蛋白である p53 および TUNEL の免疫染色をそれぞれ行った．その結果，表皮特異的 Drp1 ノックアウトマウスは，野生型と比べて p53 および TUNEL 陽性細胞数に有意な変化はみられなかった（図 49）．

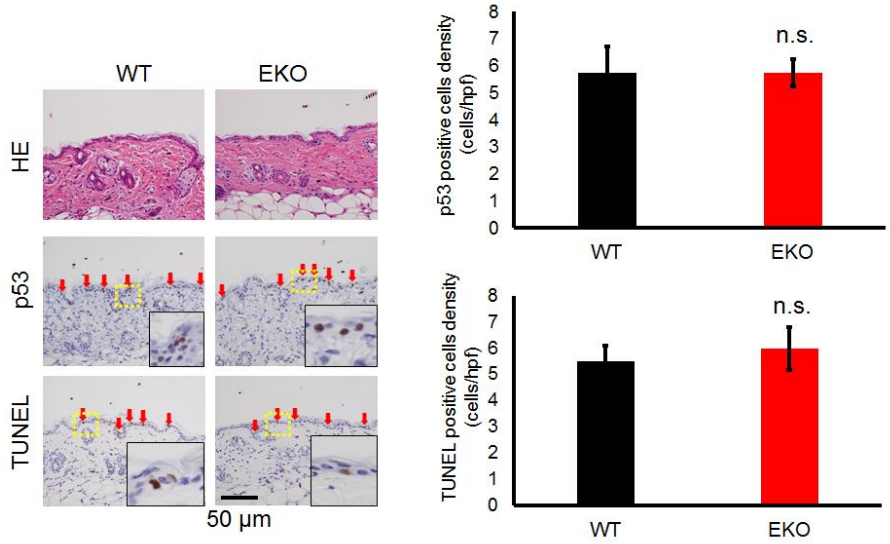


図 49：UVB 照射後のマウス皮膚の病理組織学的観察

240mJ/cm^2 の UVB をマウス皮膚に照射し，24 時間後の皮膚を回収して p53，TUNEL 染色を行ったが，野生型に比べて陽性細胞数に有意差は見られなかった．

次に，マウスの正常表皮細胞に UVB を照射し，アポトーシスが誘導されるか確認したところ，照射後 12 時間後にミトコンドリアの断片化が認められ，24 時間後には細胞の膨化が観察された（図 50）．また，UVB 照射後の Drp1 の局在について観察したところ，照射後 6 時間で断片化されたミトコンドリアと共局在していた．さらに，UVB の照射によって Drp1 の 2 量体，Drp1 発現レベルが増加していた（図 51，図 52）．

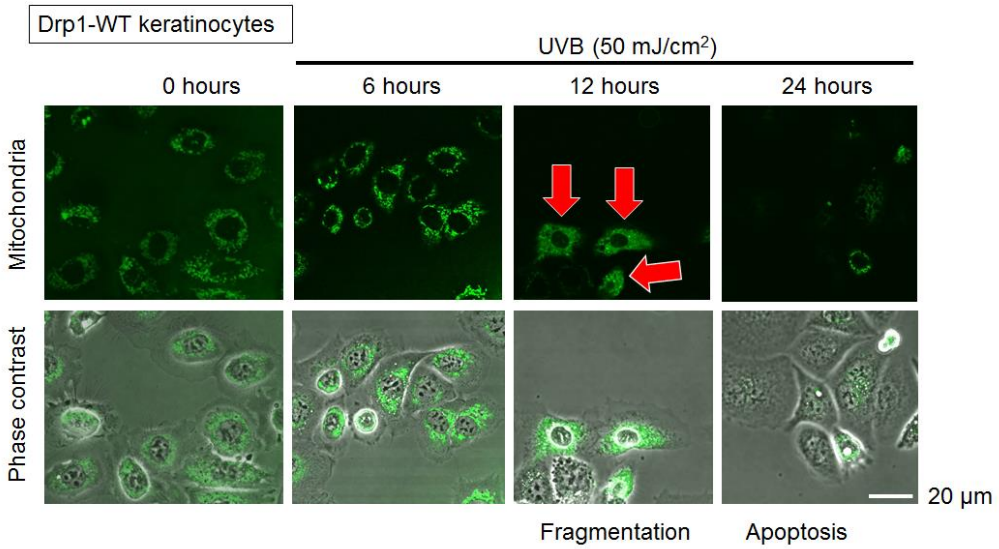


図 50：マウス表皮細胞への UVB 照射後のミトコンドリアの形態変化

野生型マウス皮膚から初代培養した表皮細胞に UVB を 50mJ/cm^2 照射し，細胞およびミトコンドリアの形態学的観察を行った（Mito Tracker Green FM，Thermo Fisher）．照射後 6-12 時間後にはミトコンドリアの断片化が見られ，24 時間後には細胞の膨化が観察され，アポトーシスが誘導されることが確認できた．

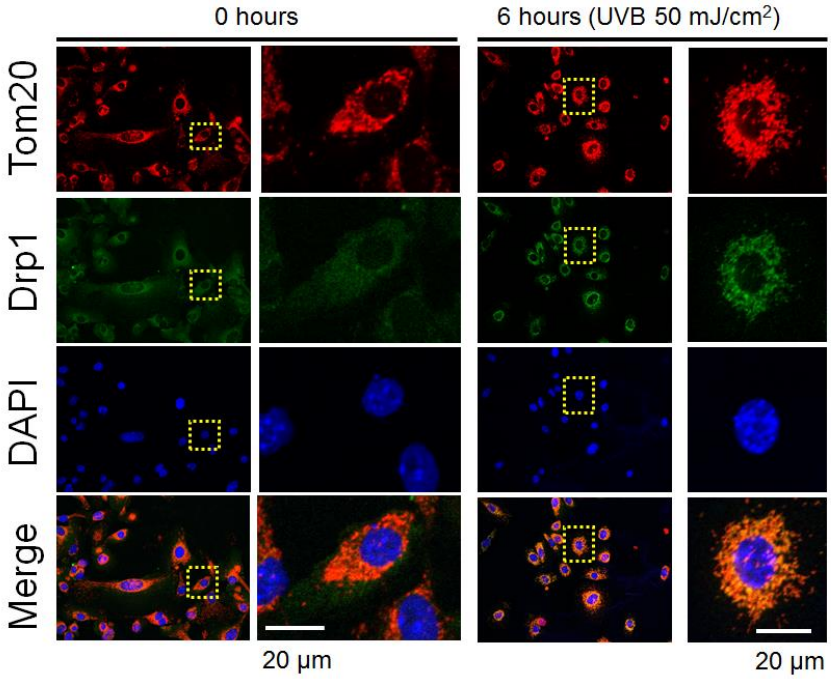


図 51：マウス表皮細胞における UVB 照射下での Drp1 の局在

野生型マウス表皮細胞に UVB を 50mJ/cm^2 照射した．照射 6 時間でミトコンドリアの断片化が観察され，Drp1 は共局在していた．

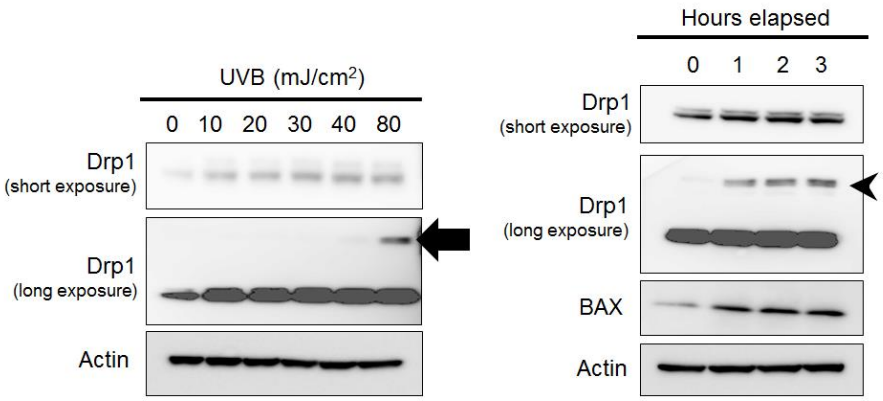


図 52：マウス皮膚への紫外線照射後の Drp1 および BAX の発現
UVB 照射により，Drp1 の 2 量体（黒矢印，黒矢頭），Drp1 の発現量は増加していた。また，BAX の発現量も同様の傾向が見られた.

以上の結果より，正常表皮細胞において，Drp1 が UVB 依存性ミトコンドリア関連アポトーシス機構に関与する分子であることが示唆された.

続いて，正常表皮における Drp1 の機能をより詳細に検討するため，表皮特異的 Drp1 ノックアウトマウス由来の表皮細胞を用いて，UVB 照射実験を行った. まず，cell viability ratio の観察を行ったが，表皮特異的 Drp1 ノックアウトマウス由来の表皮細胞は，野生型と比べて UVB 照射による有意差は認めなかった（図 53）. 続いて，アポトーシス関連蛋白である cleaved caspase 3，cytochrome c をそれぞれ免疫ブロット，蛍光染色で観察したが，これらの発現には明らかな違いは見られなかった（図 54，図 55）. 以上より，正常表皮において Drp1 は必ずしもアポトーシスには必要ではないことが示唆された.

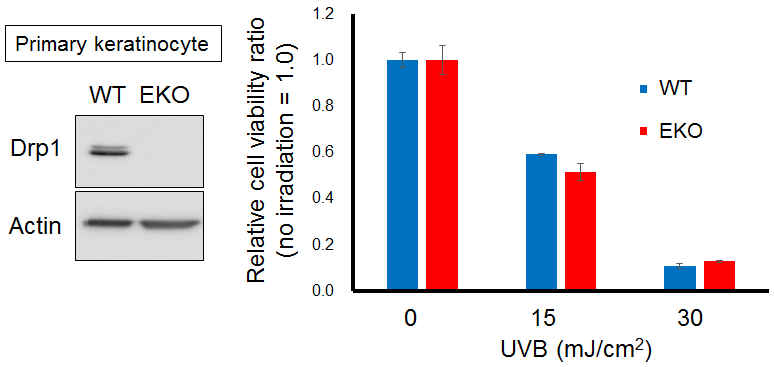


図 53：UVB 照射後の初代培養表皮細胞の cell viability ratio
表皮特異的 Drp1 ノックアウトマウス由来の表皮細胞は，UVB を照射しても cell viability ratio に野生型と比べて有意差は見られなかった.

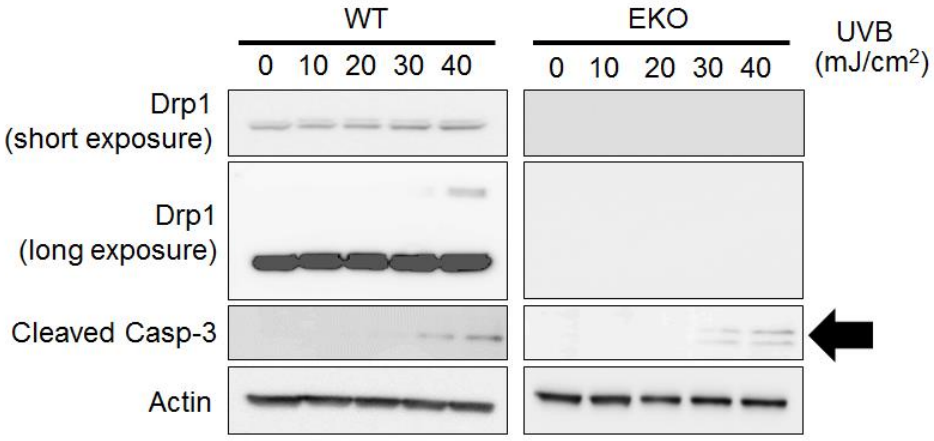


図 54：UVB 照射による cleaved caspase 3 の発現

初代培養表皮細胞に UVB を 0-40mJ/cm^2 照射し，24 時間後にライセートを回収した．表皮特異的 Drp1 ノックアウトマウス，野生型マウスのいずれにおいても，cleaved caspase 3（黒矢印）は UVB の用量依存性に観察された．

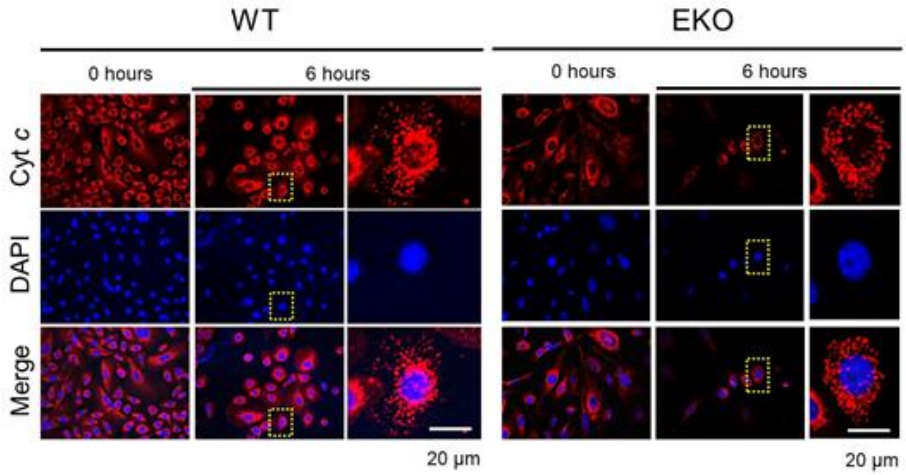


図 55：UVB 照射後の cytochrome c の観察

初代培養表皮細胞に UVB を 50mJ/cm^2 照射し，6 時間後に蛍光顕微鏡で cytochrome c を観察したが，表皮特異的 Drp1 ノックアウトマウスと野生型マウスでは特に違いは認められなかった．

次に，UVB の長期的な照射に対する影響を観察するため，表皮特異的 Drp1 ノックアウトマウス，野生型マウスの背部皮膚に UVB の長期照射実験を行った．その結果，表皮特異的 Drp1 ノックアウトマウスは，10 週の照射で表皮の紅斑・びらんがみられ，病理組織学的には表皮内癌が誘導されていた．また，さらに長期の照射を繰り返すと，結節性病変を生じ，組織学的に有棘細胞癌が高確率で形成された（図 56，図 57）．

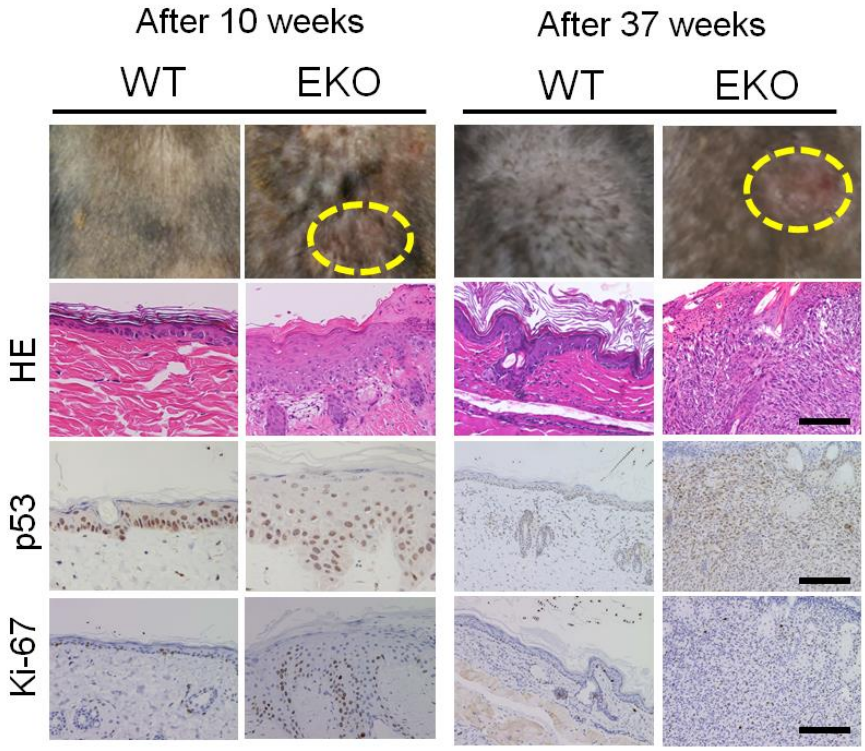


図 56：マウス皮膚への UVB 長期照射実験

表皮特異的 Drp1 ノックアウトマウス群では，10 週の UVB 照射で表皮内有棘細胞癌が誘導され，さらに長期照射を行うと，高確率に有棘細胞癌の新生があった．

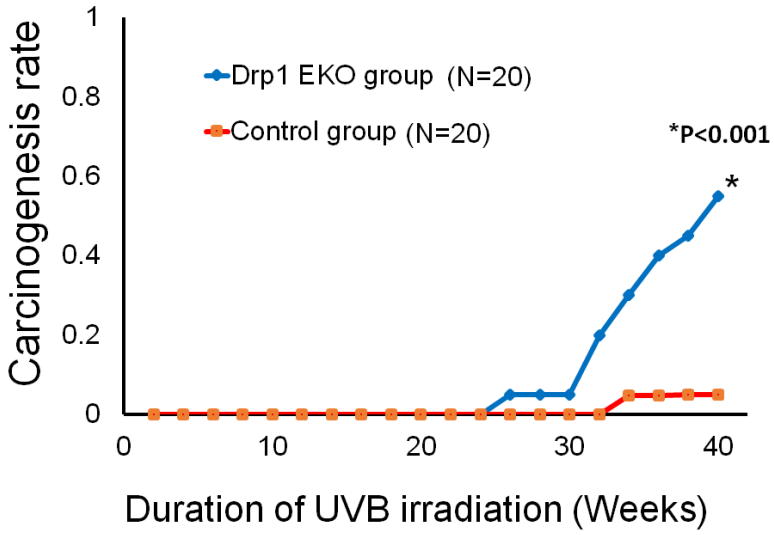


図 57：UVB 長期照射に伴う発癌率の時間的推移

UVB の長期照射はマウス皮膚の発癌を誘導した（青：表皮特異的 Drp1 ノックアウトマウス，橙：野生型マウス，それぞれ N=20，$*P < 0.01$）．

８．乳房外 Paget 病において Drp1 の発現レベルは病期と相関する

乳房外 Paget 病の臨床検体を用いて，Drp1 の免疫染色を行い，Drp1 発現レベルを観察した．その結果，Drp1 は正常表皮細胞に比べ，乳房外 Paget 病で発現レベルが高くなっており，さらに腫瘍部では表皮内癌（in situ）と比べて浸潤癌（invasive）の方が発現レベルは亢進していた（図 58）．また，乳房外 Paget 病は mTOR が腫瘍の悪性度と相関するという既報告があるため（Hata H et al., 2016），mTOR についても免疫染色にて発現レベルを確認したところ，表皮内癌よりも浸潤癌で mTOR の発現レベルは高くなっていた（図 59）．

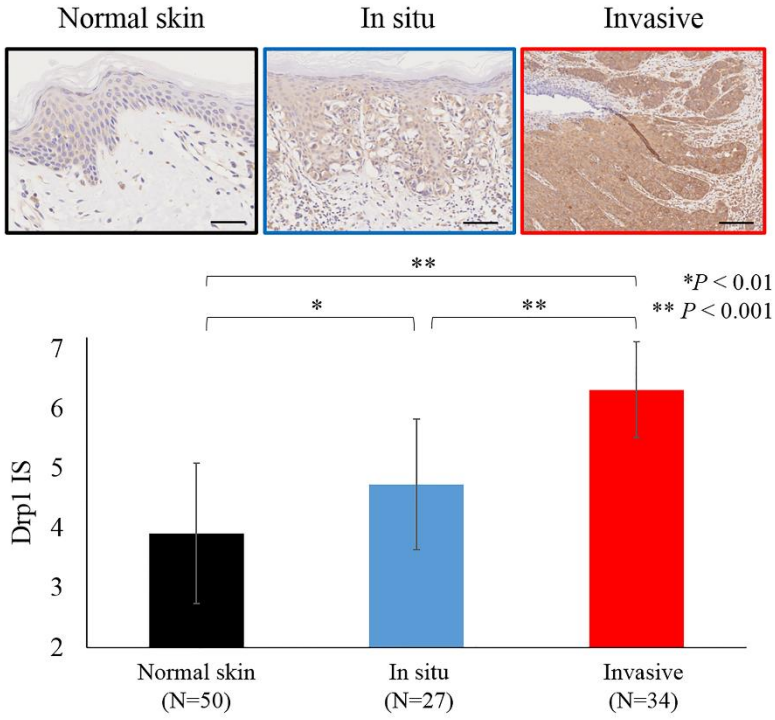


図 58：乳房外 Paget 病の Drp1 免疫染色

表皮内病変（in situ，N=27）は正常表皮（N=50）に比べて Drp1 が高発現していた．さらに，浸潤癌（invasive，N=34）はさらに発現レベルが高くなっていた．

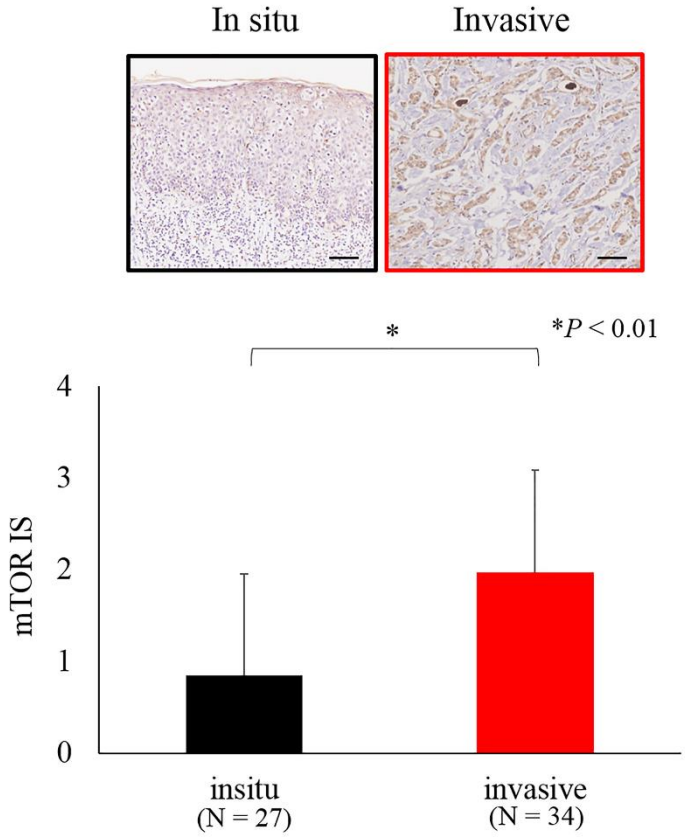


図 59：乳房外 Paget 病の mTOR 免疫染色

浸潤癌（invasive，N=34）では，表皮内癌（in situ，N=27）に比べて mTOR が高発現していた.

次に，臨床情報との相関解析を行ったところ，Drp1 と病期には正の相関が認められ，また mTOR と病期には正の相関傾向が認められた（表 8）. さらに Drp1 と mTOR の発現レベルにも正の相関が認められ（表 9），両者を組み合わせると Drp1/mTOR の高発現群は，低発現群と比較して全体に占める浸潤癌の頻度が高くなっていた（表 10）.

表 8：Drp1，mTOR 発現レベル，臨床病期の相関解析結果

Drp1 IS

	Clinical stage			
	Ia	Ib	II-IV	total
3	5	0	0	5
4	4	0	0	4
5	12	4	3	19
6	5	8	1	14
7	1	12	6	19
total	27	24	10	61
R = 0.426, $P < 0.01$				

mTOR IS

	Clinical stage			
	Ia	Ib	II-IV	total
0	15	3	2	20
1+	4	4	2	10
2+	5	7	1	13
3+	3	10	5	18
total	27	24	10	61
R = 0.248, $P = 0.05$				

表 9：Drp1 と mTOR の相関解析

mTOR IS

	Drp1 IS					
	3	4	5	6	7	total
0	3	4	4	6	3	20
1+	1	0	5	1	3	10
2+	1	0	6	4	2	13
3+	0	0	4	3	11	18
total	5	4	19	14	19	61
R = 0.396, $P < 0.01$						

表 10：Drp1/mTOR の low/low 群と high/high 群での比較

mTOR/Drp1	low/low	high/high
in situ	15 (88.2%)	2 (10.0%)
invasive	2 (11.8%)	18 (90.0%)
total	17	20
$P = 9.58 \times 10^{-5}$, Mann-Whitney's U test		

考察

本研究により，Drp1 が皮膚有棘細胞癌において，in vivo および in vitro いずれにおいても重要な分子であることが示された．すなわち，Drp1 は細胞の増殖，細胞周期およびミトコンドリアの分裂を調整しており，増殖シグナルの主要な経路である，MAPK 経路の下流に Drp1 は位置し，リン酸化されて機能している（図 60）．さらに，正常ケラチノサイトに比べて，有棘細胞癌では Drp1 の発現量が亢進していた．これらの結果は過去の報告例で悪性新生物における Drp1 の機能と一致していた．

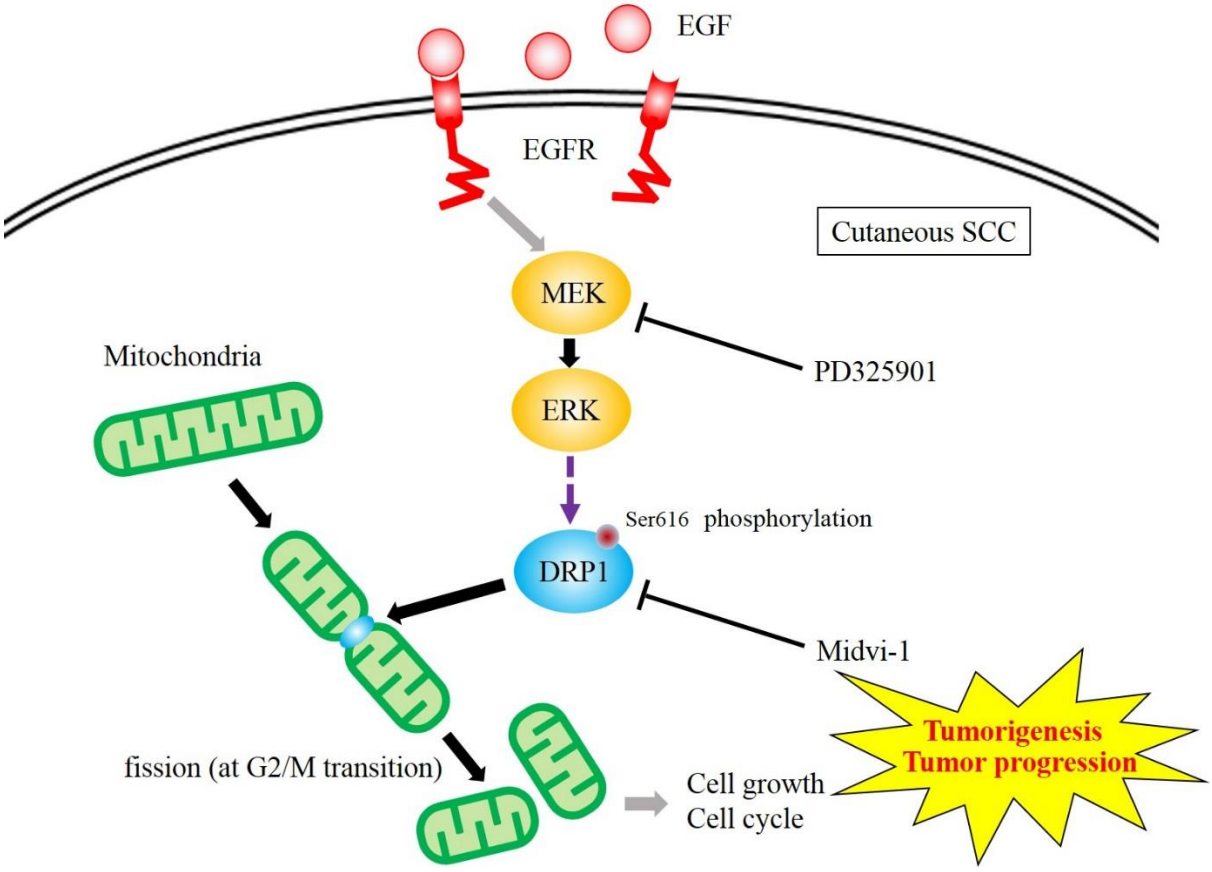


図 50：皮膚有棘細胞癌における Drp1 の機能モデル
Drp1 は皮膚有棘細胞癌において，MAPK 経路の下流に位置し，リン酸化によってミトコンドリアの分裂，細胞増殖，細胞分裂などを調節している．

Drp1 は肺癌，転移性乳癌，神経膠芽腫，大腸癌，膵癌，悪性黒色腫などの悪性新生物において高発現していると報告されている（Kashatus JA et al, 2015; Serasinghe MN et al., 2015; Rehman J et al., 2012; Zhao J et al., 2013;

Hagenbuchner J et al., 2013; Inoue-Yamauchi A et al., 2012)．たとえば，Rehmen らは，Drp1 の喪失によって，肺がんの細胞増殖とアポトーシスの増加が観察されることを報告した（Rehman J et al., 2012)．また，Inoue-Yamaguchi らは Drp1 の欠損によって，大腸がんのアポトーシスが増加することを発表した（Inoue-Yamauchi A et al., 2012)．皮膚科領域においては，悪性黒色腫において，$Drp1^{S616}$ のリン酸化と $BRAF^{V600E}$ 変異が相関関係にあり，Drp1 の阻害によって $BRAF^{V600E}$ 変異を有する悪性黒色腫の細胞増殖が干渉されることが報告されている（Wieder SY et al., 2015)．また，RAS-MAPK 経路が Drp1 を制御するという報告もある（Serasinghe MN et al., 2015)．皮膚有棘細胞癌においては，EGFR が過剰発現しており，予後と負の相関関係にあることが示唆されている（Canueto J et al., 2017)．EGFR はまた RAS-MAPK 経路の主要な activator として知られており，これらの結果は EGFR-Ras-MAPK 経路が皮膚有棘細胞癌においても重要な Drp1 の活性化経路であることが示唆される．

断片化されたミトコンドリアネットワークは細胞周期を止め，アポトーシスを誘導することがしられている．細胞周期において，$Drp1^{Ser616}$ は早期 S 期でリン酸化され，ミトコンドリアを分裂し，G2/M 期へ誘導することが報告されている（Zhao J et al., 2013)．Qian らは，Drp1 の欠損により，ミトコンドリアが過剰に融合した形態を呈し，それによって ATP 依存性に G2/M 期への誘導，およびアポトーシスを起こすことを報告している（Qian W et al., 2012)．本研究結果は，これらの既報告結果に一致するものであった．

Drp1 は予後規定因子としても有用であることが報告されている．Chiang らは核内の Drp1 発現量が肺腺癌の予後と相関することを示した（Chiang YY et al., 2009)．また，Xie らは Drp1 の活性化が神経膠芽腫の予後と相関関係にあることを報告している（Xie W et al., 2015)．本研究では，Drp1 の発現量が皮膚有棘細胞癌において，臨床病期と正の相関関係にあり，この結果は既報告と合致する結果であった．また，Drp1 の免疫スコアと分化度に統計学的な有意差は得られなかったが，負の相関傾向を認めた（$P = 0.08$)．一般的に，悪性新生物においては，悪性化がすすむほど分化度は低くなり，転移，浸潤能が高くなる．扁平上皮癌においても，分化度と予後は負の相関にあることが知られており（Liu YF et al., 2013)，本研究結果でも同様の傾向を呈したといえる．

また，ノックアウトマウスを使った正常表皮細胞における Drp1 の機能解析においては，Drp1 が必ずしも表皮の発生・分化に必要ないことが判明した．また，

UVB 照射に伴うアポトーシスにおいても必ずしも Drp1 は必要ないことが示された．しかしながら，長期的な UVB 照射においては，Drp1 ノックアウトマウスは高頻度に発癌が誘導され，この機序についてさらなる分子メカニズムの解析が必要である．

乳房外 Paget 病における Drp1 の発現レベルの解析においては，SCC と同様に，正常皮膚に比べて，病変部で Drp1 の発現レベルは高くなっていた．また，病変部内の比較においても，表皮内癌に比べて浸潤癌で発現レベルは亢進していた．また，Drp1 発現レベルが病期と正の相関を示し，総じて SCC と同様の傾向を示すことが分かり，SCC 以外の皮膚悪性腫瘍においても Drp1 は重要な分子として機能している可能性が示唆された．

本研究で Drp1 が SCC においても細胞分裂，アポトーシス，細胞周期などを調整する重要な機能を有することが示された．また，Drp1 阻害剤を用いた実験でも Drp1 ノックダウン時と同様に腫瘍の増殖を抑制することが判明した. 正常表皮細胞にも Drp1 阻害剤は効いてしまうため, 治療薬としては腫瘍特異的な投与経路が必要になるが，新たな SCC の治療ターゲット分子としての可能性が示唆された．

結論

本研究では以下の新知見を得た.

・Drp1 は皮膚 SCC の増殖能を調整しており，Drp1 の発現を低下させると腫瘍細胞の増殖は抑制する.
・Drp1 のノックダウンにより，皮膚 SCC の細胞周期は G2/M arrest に誘導される.
・皮膚 SCC において，Drp1 はミトコンドリアの分裂に関連しており，Drp1 の阻害によって長い融合したネットワーク構造のミトコンドリアが増加する.
・MAPK 経路により Drp1 はリン酸化されることで活性化し，MAPK の下流に位置して機能する.
・in vivo においても腫瘍の増殖において Drp1 が重要な分子である.
・皮膚 SCC では正常皮膚に比べて Drp1 が高発現しており，Drp1 発現量と分化度は負の相関傾向を示し，病期とは正の相関関係がある.

結論として，皮膚 SCC においてミトコンドリア分裂関連分子 Drp1 が細胞の増殖や細胞周期などの調節をおこなっており，他の癌種で報告されているのと同様に，皮膚 SCC においても Drp1 が重要な機能を担う分子であることが明らかになった．この結果からは，Drp1 が新規治療ターゲット分子としても期待されうる．また，Drp1 阻害剤の添加によって，SCC だけでなく正常表皮細胞の増殖も抑制されたため，直接投与する場合は腫瘍特異的な投与方法が必要である点など課題も残る. 今後, MAPK-Drp1 経路のシグナル前後の関連分子探索などさらなる解析がなされ，ゆくゆくは臨床応用される日がくることを期待したい.

謝辞

稿を終えるにあたり，本研究の機会を与えてくださり，多くのご指導とご助言を賜りました，北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室　清水宏教授に深甚なる謝意を表します．また，直接ご指導いただきました北海道大学病院皮膚科柳輝希特任助教に心より深謝いたします．そして，本研究にご協力くださりましたすべての患者様に深く御礼申し上げます．また，最後になりましたが，北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室の教室員，技術員，秘書各位に心より御礼申し上げます．

利益相反

本研究に関して，開示すべき利益相反状態はない.

引用文献

Ando, S., Abe, R., Sasaki, M., Murata, J., Inokuma, D., Shimizu, H. (2009). Am J Pathol. *174*, 595-601.

Bain, J., Plater, L., Elliott, M., Shpiro, N., Hastie, C. J., McLauchlan, H., Klevernic, I., Arthur, J. S., Alessi, D. R., Cohen, P. (2007). The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update. Biochem. J. *408*, 297-315.

Blume-Peytavi, U., Kottner, J., Sterry, W., Hodin, M. W., Griffiths, T. W., Watson, R. E., Hay, R. J., Griffiths, C. E. (2016). Age-Associated Skin Conditions and Diseases: Current Perspectives and Future Options. Gerontologist. *56*, S230-S242.

Borradori, L., Sutton, B., Shayesteh, P., Daniels, G. A. (2016). Rescue therapy with anti-programmed cell death protein 1 inhibitors (PD-1) of advanced cutaneous squamous cell carcinoma and basosquamous carcinoma: preliminary experience in 5 cases. Br. J. Dermatol. *175*, 1382-1386.

Breuninger, H., Brantsch, K., Eigentler, T., Hafner, H. M. (2012). Comparison and evaluation of the current staging of cutaneous carcinomas. J. Dtsch. Dermatol. Ges. *10*, 579-586.

Burton, K. A., Ashack, K. A., Khachemoune, A. (2016). Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Review of High-Risk and Metastatic Disease. Am. J. Clin. Dermatol. *17*, 491-508.

Canueto, J., Cardenoso, E., Garcia, J. L., Santos-Briz, A., Castellanous-Martin, A., Fernandez-Lopez, E., Blanco Gomez, A., Perez-Losada, J., Roman-Curt, C. (2017). Epidermal growth factor receptor expression is associated with poor outcome in cutaneous squamous cell carcinoma. Br. J. Dermatol. *176*, 1279-1287.

Chan, D. C. (2012). Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. Annu. Rev. Genet. *46*, 265-287.

Chiang, Y. Y., Chen, S. L., Hsiao, Y. T., Huang, C. H., Lin, T. Y., Chiang, I. P., Hsu, W. H., Chow, K. C. (2009). Nuclear expression of dynamin-related protein 1 in lung adenocarcinomas. Mod. Pathol. *22*, 1139-1150.

Ferreira-da-Silva, A., Valacca, C., Rios, E., Populo, H., Soares, P., Sobrinho-Simoes, M., Scorrano, L., Maximo, V., Campello, S. (2015). Mitochondrial dynamics protein Drp1 is overexpressed in oncolytic thyroid tumors and regulates cancer cell migration. PloS. One. *10*, e0122308.

Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E. S., Leitner, W. W., Robert, E. G., Catez, F., Smith, C. L., Youle, R. J. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. Dev. Cell. *1*, 515-525.

Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., Parks, W. P. (1973). In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived From a Series of Solid Tumors. J Natl Cancer Inst. *51*, 1417-1423.

Hagenbuchner, J., Kuznetsov, A. V., Obexer, P., Ausserlechner, M. J. (2013). BIRC5/Survivn enhances aerobic glycolysis and drug resistance by altered regulation of the mitochondrial fusion/fission machinery. Oncogene. *32*, 4748-4757.

Hata, H., Kitamura, S., Inamura, Y., Imafuku, K., Homma, E., Muramatsu, K., Natsuga, K., Abe, R., Shimizu, H. (2016). J Eur Acad Dermatol Venereol. *20*, 1238-1239.

Heidari M., Najafi F. (2013). Trends of skin cancer incidence in 6 geographical regions of the Islamic Republic of Iran, 2000-2005. East Mediterr Health J. *19*, 59-65.

Horbay, R., Bilyy, R. (2016). Mitochondrial dynamics during cell cycling. Apoptosis. *21*, 1327-1335.

Inoue, T., Toda, S., Narisawa, Y., Sugihara, H. Subcutaneous Adipocytes

Promote the Differentiation of Squamous Cell Carcinoma Cell Line (DJM-1) in Collagen Gel Matrix Culture. (2001). J Invest Dermatol. *117*, 244-250.

Inoue-Yamauchi, A., Oda, H. (2012). Depletion of mitochondrial fission factor DRP1 causes increased apoptosis in human colon cancer cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. *421*, 81-85.

Kashatus, J. A., Nascimento, A., Myers, L. J., Sher, A., Byrne, F. L., Hoehn, K. L., Counter, C. M., Kashatus, D. F. (2015). Erk2 phosphorylation of Drp1 promotes mitochondrial fission and MAPK-driven tumor growth. Mol. Cell. *57*, 537-551.

Koshiba, T., Detmer, S. A., Kaiser, J. T., Chen, H., McGaffery, J., Chan, D. C. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. Science. *305*, 858-862.

Lee, J. E., Westrate, L. M., Wu, H., Page, C., Voeltz, G. K. (2016). Multiple dynamin family members collaborate to drive mitochondrial division. Nature. *540*, 139-143.

Lewis, C. M., Glisson, B. S., Feng, L., Wan, F., Tang, X., Wistuba, I. I., El-Naggar, A. K., Rosenthal, D. I., Chambers, M. S., Lustig, R. A., et al. (2012). A phase II study of gefitinib for aggressive cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. Clin. Cancer. Res. *18*, 1435-1446.

Liu, Y. F., Zhang, J. G., Ni, H. S., Liu, H., Zhang, S., Huang, H., Shi, G. S. (2013). Expression and significance of angiopoietin-2 and cyclin D1 in laryngeal squamous cell carcinoma and the correlation with prognosis. Exp. Ther. Med. *6*, 1137-1144.

Maubec, E., Petrow, P., Scheer-Senyarich, I., Duvillard, P., Lacroix, L., Gelly, J., Certain, A., Duval, X., Crickx, B., Burrard, V., et al. (2011). Phase II study of cetuximab as first-line single-drug therapy in patients with unresectable squamous cell carcinoma of the skin. J. Clin. Oncol. *29*, 3419-3426.

Prieto, J., Leon, M., Ponsoda, X., Sendra, R., Bort, R., Ferrer-Lorente, R.,

Raya, A., Lopez-Garcia, C., Torres, J. (2016). Early ERK1/2 activation promotes DRP1-dependent mitochondrial fission necessary for cell reprogramming. Nat. Commun. *31*, 11124.

Qian, W., Choi, S., Gibson, G. A., Watkins, S. C., Bakkenist, C. J., Van Houten, B. (2012). Mitochondrial hyperfusion induced by loss of the fission protein Drp1 causes ATM-dependent G2/M arrest and aneuploidy through DNA replication stress. J. Cell. Sci. *125*, 5747-5757.

Rehman, J., Zhang, H. J., Toth, P. T., Zhang, Y., Marsboom, G., Hong, Z., Salgia, R., Husain, A. N., Wietholt, C., Archer, S. L. (2012). Inhibition of mitochondrial fission prevents cell cycle progression in lung cancer. FASEB. J. *26*, 2175-2186.

Serasinghe, M. N., Wieder, S. Y., Renault, T. T., Elkholi, R., Asciolla, J. J., Yao, J. L., Jabado, O., Hoehn, K., Kageyama, Y., Sesaki, H., et al. (2015). Mitochondrial division is requisite to RAS-induced transformation and targeted by oncogenic MAPK pathway inhibitors. Mol. Cell. *57*, 521-536.

Sheridan, C., Delivani, P., Cullen, S. P., Martin, S. J., Sheridan, C., et al. (2008). Bax- or Bak-induced mitochondrial fission can be uncoupled from cytochrome C release. Mol Cell. *31*, 570-585.

Tanaka, A., Youle, R. J. (2008). A chemical inhibitor of DRP1 uncouples mitochondrial fission and apoptosis. Mol. Cell. *29*, 409-410.

Lee, J. E., Westrate, L. M., Wu, H., Page, C., Voeltz, G. K. (2016). Multiple dynamin family members collaborate to drive mitochondrial division. Nature. *540*, 139-143.

Wang, P., Wang, P., Liu, B., Zhao, J., Pang, Q., Agrawal, S. G., Jia, L., Liu, F. T. (2015). Dynamin-related protein Drp1 is required for Bax translocation to mitochondria in response to irradiation-induced apoptosis. Oncotarget. *6*, 22598-22612.

Westermann, B. (2008). Molecular machinery of mitochondrial fusion and

fission. J. Biol. Chem. *283*, 13501-13505.

Wieder, S. Y., Serasinghe, M. N., Sung, J. C., Choi, D. C., Birge, M. B., Yao, J. L., Bernstein, E., Celebi, J. T., Chipuk, J. E. (2015). Activation of the Mitochondrial Fragmentation Protein DRP1 Correlates with BRAF(V600E) Melanoma. J. Invest. Dermatol. *135*, 2544-2547.

Xie, Q., Wu, Q., Horbinski, C. M., Flavahan, W. A., Yang, K., Zhou, W., Dombrowski, S. M., Huang, Z., Fang, X., Shi, Y., et al. (2015). Mitochondrial control by DRP1 in brain tumor initiating cells. Nat. Neurosci. *18*, 501-510.

Yanagi, T., Hata, H., Mizuno, E., Kitamura, S., Imafuku, K., Nakazato, S., Wang, L., Nishihara, H., Tanaka, S., Shimizu, H. (2017). PCTAIRE1/CDK16/PCTK1 is overexpressed in cutaneous squamous cell carcinoma and regulates p27 stability and cell cycle. J. Dermatol. Sci. *86*, 149-157.

You, T. K., Kim, K. M., Noh, S. J., Bae, J. S., Jang, K. Y., Chung, M. J., Moon, W. S., Kang, M. J., Lee, D. G., Park, H. S. (2012). Expressions of E-cadherin, Cortactin and MMP-9 in Pseudoepitheliomatous Hyperplasia and Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: Their Relationships with Clinicopathologic Factors and Prognostic Implication. Korean. J. Pathol. *46*, 331-340.

Zhao, J., Zhang, J., Yu, M., Xie, Y., Huang, Y., Wolff, D. W., Abel, P. W., Tu, Y. (2013). Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. Oncogene. *32*, 4814-4824.

清水宏．（2011）．あたらしい皮膚科学第 2 版　中山書店，49-50.

石原和之．（2005）．統計調査よりみた紫外線と皮膚がん，紫外線の皮膚障害とその対策，Biotherapy．*19*, 411-416.