



|                     |                                                                                                         |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | Wnt/ $\beta$ -cateninシグナルが表皮角化細胞のヘミデスモソームを安定化する [論文内容及び審査の要旨]                                           |
| Author(s)           | 小住, 英之                                                                                                  |
| Description         | 配架番号 : 2689                                                                                             |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                                   |
| Degree Name         | 博士(医学)                                                                                                  |
| Dissertation Number | 甲第14947号                                                                                                |
| Issue Date          | 2022-03-24                                                                                              |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/85757">https://hdl.handle.net/2115/85757</a>                       |
| Rights(URL)         | <a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a> |
| Type                | doctoral thesis                                                                                         |
| File Information    | KOSUMI_Hideyuki_abstract.pdf, 論文内容の要旨                                                                   |



## 【背景と目的】

皮膚は、下層から脂肪層・真皮・基底膜・重層扁平上皮(表皮)からなる多重構造の組織であり、人体最大の臓器である。表皮最下層に位置する表皮基底細胞の中間径フィラメントであるケラチン線維はヘミデスモソーム (Hemidesmosome: HD) を介して基底細胞の細胞膜さらにはその直下の基底膜と結合している。HD はインテグリン  $\alpha 6$  (integrin  $\alpha 6$ : ITGA6)、インテグリン  $\beta 4$  (integrin  $\beta 4$ : ITGB4)、17 型コラーゲン (type XVII collagen, COL17)、プレクチン、BP230 で構成される接着装置である。HD 構成タンパクをコードする遺伝子変異により表皮水疱症 (epidermolysis bullosa, EB) を発症する。EB は先天的に皮膚が脆弱であり、わずかな外力により全身、特に機械的刺激を受けやすい部位に水疱、びらん、潰瘍を形成する。大きく単純型 (EB simplex: EBS)、接合部型 (junctional EB, JEB)、栄養障害型 (dystrophic EB, DEB)、混合型であるキンドラー症候群 (Kindler EB, KEB) に分類されている。これらの多くは HD タンパク質の欠損もしくは機能不全で生じるが、これらのタンパク質の発現が保たれるにも関わらず EB を発症することがある。例えば COL17 をコードする *COL17A1* のインフレーム変異により、COL17 が他の HD 構成タンパクであるプレクチン、ITGB4、BP230 と結合できなくなると単純型表皮水疱症 (EB simplex, EBS) を発症する。また、プレクチンをコードする遺伝子 *PLEC* における、COL17 結合ドメインのインフレーム変異でも EBS を発症する。これらのことから HD の構成タンパク質の量のみならず、構成タンパク質間の相互作用が真皮-表皮間の接着に重要であることが示唆される。しかしながら、HD の形成および分解がどのように制御されているのかの多くは未解明である。Wnt タンパク質は、分泌性タンパク質のファミリーで、個体発生における多種多様な生物学的プロセスに重要な役割を果たしている。Wnt タンパク質が受容体に結合すると、最終的に細胞運命、増殖および遊走などの細胞プロセスに影響を与える非常に複雑なシグナル伝達イベントを開始する。Wnt シグナル経路には古典的経路と非古典的経路が存在し、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルは古典的経路に該当する。Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルは表皮細胞においても恒常性の維持や発がんに関与することが知られており、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルタンパクに種々の遺伝子変異が生じるとマウス皮膚角化細胞において分化や増殖に異常をきたす。我々はこれまでに HD 構成タンパク質である COL17 が Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを安定化させることにより、角化細胞増殖を調節することを報告している。しかしながら、COL17 と Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの相互作用についてや、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが HD にどのように関与するのかについては未解明である。本研究は、HD を制御するシグナル経路の探索および、それを制御する因子を明らかにすることを目的としている。

## 【材料と方法】

*in vitro* の解析には表皮角化細胞の培養セルラインである正常皮膚角化細胞: Normal human epidermal keratinocyte (NHEK) と HaCaT 細胞を用いた。*in vivo* の解析には表皮特異的に Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが非活性なモデルマウスである K14- $\Delta$ NLef1 を用いた。培養細胞および K14- $\Delta$ NLef1 を用いて、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが阻害、非活性化された際の HD および HD 構成タンパク質の変化を、電子顕微鏡、タンパク質の免疫ブロット法、免疫蛍光抗体法および qRT-PCR 法を用いて検討した。培養細胞からは HD 構成タンパク質に含まれる HD 分画を抽出し、免疫ブロット法で HD 構成分子の多寡を検討した。プレクチンに着目し、CRISPR/Cas9 システムを用いてプレクチン欠失 HaCaT 細胞を樹立し、免疫蛍光抗体法を用いて HD タンパク質の分布を検討した。また、プレクチン-COL17 間結合に着目し、同結合が阻害されるような遺伝子変異を有する EBS 患者から培養角化細胞を樹立

し、蛍光抗体法を用いて HD タンパク質の分布を検討した。さらに、HD の制御に関わるシグナル分子の探索のために、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル、protein kinase C (PKC)、atypical PKC (aPKC)、classic PKC (cPKC) および novel PKC (nPKC) の阻害薬を用いて HD タンパク質の分布を、蛍光抗体法を用いて検討した。

#### 【結果】

以下の結果を得た。

- ・ HaCaT 細胞では Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが恒常的に活性化している。
- ・ HaCaT 細胞の Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルは Wnt 阻害薬である ICG-001 および Wnt C59 投与により調整可能である。
- ・ Wnt 阻害 HaCaT 細胞では HD の構成タンパク質が HD 分画において減少する。
- ・ Wnt 阻害 HaCaT 細胞では電子顕微鏡学的に HD 様構造物が減少する。
- ・ Wnt 阻害 HaCaT 細胞底面では HD 構成分子が減少する。
- ・ K14- $\Delta$ NLef1 マウス皮膚では基底膜の HD 構成分子が減少する。
- ・ PLEC-KO HaCaT 細胞底面では HD 構成分子である COL17 が減少する。
- ・ PLEC-COL17 結合が欠失した培養角化細胞底面では HD 構成分子である COL17 が減少する。
- ・ PKC 阻害薬である Go6983 を投与すると、Wnt 阻害薬投与で見られる細胞底面の HD 構成分子の減少が緩和される。
- ・ aPKC 阻害薬である CRT0066854 は Wnt 阻害薬投与で見られる細胞底面の HD 構成分子の減少を緩和したが、cPKC/nPKC 阻害薬である GF109203X では変化がなかった。
- ・ NHEK の HD 分画では、Wnt 阻害 HaCaT 細胞で見られるような HD 構成分子の減少が見られた。

#### 【考察】

Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが皮膚の発達や恒常性に重要な役割を有することはこれまで報告されているが、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの HD 構成タンパク質に対する作用はこれまで知られていなかった。本研究で我々は Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが HD 構成分子の局在制御することを明らかにした。プレクチンや COL17 といった HD 構成分子は Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの上流に位置する調整分子となることが報告でされてきた。我々は本研究により、COL17 やプレクチンといった HD 構成タンパク質が Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの上流の調整分子であることのみならず、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの標的分子でもあることを示した。本研究では Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルによる HD 構成分子の制御が aPKC を介すること示した。COL17 は aPKC-PAR 複合体と相互作用し、表皮細胞の極性を維持・調整することが知られており、薬剤的 aPKC 阻害が Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル阻害 HaCaT 細胞の HD 構成タンパク質を増加させるという、今回我々が得た知見に概ね合致する。本研究で我々が見出した Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが HD を制御するという知見は、EB に対する新たな治療戦略に応用できる可能性がある。本研究によって Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが表皮角化細胞の HD を制御することが見いだされた。Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルおよび aPKC シグナルに関与する分子群は EB の新たな治療ターゲットとなる可能性がある。

#### 【結論】

表皮角化細胞において、aPKC を介する Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル経路が、HD を制御することを示した。今回の研究から Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化が HD 構成分子を増強する可能性が示唆され、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルや aPKC が、EB 患者などの脆弱化皮膚に対する治療ターゲットとなる可能性を見出した。今後の課題として aPKC が Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルのどの分子に作用するのかの解析や、実際に Wnt/ $\beta$ -catenin を調節できるような薬剤の創出が挙げられる。また、Wnt/ $\beta$ -catenin が実際にプレクチンや COL17 をどのように減少させるのかについても、さらなる解析が必要である。