表皮細胞の増殖分化を制御するp21やNotchの働き

奥山隆平^{*1,2)}, Paolo Dotto^{*2)}, 田上八朗^{*1)}

mini review

INFLAMMATION AND REGENERATION

Roles of p21 and Notch in control of keratinocytes

Self renewing epidermis are characterized by a fine balance between growth and differentiation of immature keratinocytes including stem cells. Recent progress showed various molecules that played important roles for this control. Here we focus on two molecules, cyclin-dependent kinase inhibitor p 21 and Notch receptor. First, p 21 has been shown to the contribution to proliferation and differentiation of keratinocytes. Recently we know that loss of p 21 function increases the pluripotent keratinocyte population with multi-potential(stem cells). Second, Notch was identified as one of key molecules for cell fate decision in *Drosophila*. Even in mammalian Notch homologues have important functions for the control of cell fate decision and growth/differentiation due to cell-cell communication. In keratinocytes Notch 1 signaling leads to growth arrest via p 21 activation and differentiation. These works will advance our knowledge on controlling mechanism for homeostasis and tumor formation in not only epidermis but also other epithelia tissue.

Rec. 11/8/2001, Acc. 4/12/2002, pp195~200

Ryuhei Okuyama^{*1,2)}, Paolo Dotto^{*2)}, Hachiro Tagami^{*1)}

key words : stem cells, notch, p21, epithelial cells

表皮組織は恒常性を維持するためにさまざまなシグナルが働いているが、その働きは広く上皮組織で共有されているのではないと思われる。ここでは表皮細胞の調節における p 21 と Notch の働きを中心に説明をしたい。

表皮細胞の特徴とは？ なぜ表皮細胞を解析するのか？

上皮組織は体の外表面や内腔を覆う組織であり、表皮、胃粘膜、肝臓など多くの組織が含まれる。上皮組織では個々の構成細胞がたがいに強固に結合し、一つの組織を構成している。そのなか

に、幹細胞をはじめとする未分化な細胞から最終分化に達して死滅していこうとしている細胞までさまざまな分化段階の細胞が含まれている。細胞はその分化段階に応じて特定の部位に位置し、特に表皮では、細胞の分化段階とその存在する位置の関連が明らかになっている(図 1 A)。表皮は分化段階の異なる細胞が層状に積み重なって構成されており、最も深い 1 層は基底層とよばれ、活発に増殖する未分化な表皮細胞、基底細胞からなっている。基底細胞は、インテグリンを介して基底膜に結合する一方、構造蛋白であるケラチンのうちケラチン 5/14 を発現している。

一方で、基底細胞のすべてが同様に未分化というわけではなく、10 数個に一つ程度の割合で存在すると考えられている表皮幹細胞から、だいたい分化が進行し増殖を停止しそうな細胞まで存在している。基底細胞のなかでも分化が進行した細胞はやがてインテグリンの発現が消失して、基底膜か

^{*1)} Department of Dermatology, Graduate School of Medicine, Tohoku University 東北大学大学院医学系研究科内科病態学講座皮膚科学分野

^{*2)} Cutaneous Biology Research Center, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School ハーバード大学医学部マサチューセッツ総合病院

図 1 表皮の構造と細胞培養

A: 表皮は分化段階の異なる細胞が層状に重なっている。

B: 低カルシウム状態で培養している表皮細胞は基底細胞に類似した性質を示す。一方、カルシウム濃度を上げると細胞は分化しはじめる。

ら離れ上層へと移動していくことになる。基底層の上の数層は有棘層とよばれ、ここに存在する有棘細胞は、増殖は停止し未分化な細胞のマーカーであるケラチン 5/14 が消失し、かわりにケラチン 1/10 が発現してくる。さらに分化が進むと上層へと移動し顆粒層とよばれる層に移り、ロリクリン、フィラグリンといった蛋白質を発現する。そして最終的には角層となりやがて体表面から剥がれていく。

以上のように表皮細胞は表皮組織のなかでその分化段階に応じて、特異的な位置に存在するとともに、特異的な蛋白質を発現している。このことから表皮組織は *in vivo* レベルの解析に大変適した組織である。さらに表皮細胞を培養する方法が確立しているため *in vitro* での解析も可能である。特に培養表皮細胞は培地中のカルシウム濃度

を調節することで細胞を増殖している状態から、人為的に分化をスタートさせることが可能である(図 1 B)。低カルシウム濃度で培養されている表皮細胞は活発に増殖し、インテグリンやケラチン 5/14 を発現し、その性質は基底細胞にきわめて類似している。

一方、カルシウム濃度を上昇させると、細胞は増殖を停止しケラチン 1/10、さらにロリクリン、フィラグリンが誘導される。これは *in vivo* での現象に大変近似している。一般に表皮以外の上皮細胞は分離培養が難しく、癌化していない正常状態の細胞を解析するのはいまだ困難である。その意味では上皮細胞の代表として表皮を *in vivo* と *in vitro* の両面から解析することは有意義であると思われる。

どのようなシグナルが表皮細胞の増殖分化の制御に働いているのか？

培養表皮細胞は、培地中のカルシウム濃度を変化させることによって増殖と分化を制御することができる。ということは必ずしも人工的な刺激ではない。生体内においても表皮組織には基底層から表皮表面にむけてカルシウムの濃度勾配があり、基底細胞ではカルシウム濃度は低く、分化が進んだ細胞にいくに伴い濃度は上昇している¹⁾。

では、カルシウムによって細胞内では一体なにが起きているのであろうか？

まずは、PLC が活性化して inositol 3 phosphate (IP 3) と diacyl glycerol (DAG) が産生されることが報告されている^{2,3)}。IP 3 は細胞内カルシウム濃度を上昇させ、カルシウム感受性のシグナル伝達系を活性化すると考えられている。そのカスケードの一つにカルシウム依存性 phosphatase である calcinurin が存在することが最近報告されている⁴⁾。cyclosporin を用いて calcinurin を抑制すると表皮細胞の分化が抑制されることは、calcinurin が表皮細胞の分化で重要な働きを有していることを物語っている。

また、PLC によって誘導された DAG は pro-

tein kinase C(PKC)を活性化する. PKCの isoformsのうち PKC- η , δ が活性化され, 細胞の分化を誘導している⁵⁾. さらに, 最近 PKCの下流に src familyに属する tyrosine kinaseである fynが存在することも報告されている⁶⁾.

また, 一部の転写因子が表皮細胞の分化の制御に重要な役割を果たすことも報告されている. その一つが NF- κ Bである. NF- κ Bはリンパ球において増殖を促進する働きがあることなどが知られている. しかし表皮では逆に細胞増殖を抑制して分化を促進していた⁷⁾. また, 通常の細胞において NF- κ Bの上流に存在する IKK complexのうち IKK α を欠失したマウスでは表皮に大きな異常が生ずる^{8~10)}. IKK α が表皮細胞においても NF- κ Bの上流に位置するか否かはいまだ議論のわかれるところであるが, IKKや NF- κ Bが表皮細胞の制御に関わっていることは明らかであろう.

このほかにもさまざまな因子が表皮細胞の制御に働いている. ここでは表皮細胞の制御をつかさどる分子として p 21 と Notch の働きについて追加して解説を加えたい.

p 21 は表皮幹細胞の制御に深く関与している

p 21 は cyclin dependent kinase(CDK)の働きを抑制することで, 細胞周期を負に制御している分子の一つである. Missero らは, 培養表皮細胞が分化をスタートする際に p 21 の発現が上昇して表皮細胞の増殖を停止させることを見いだした¹¹⁾. さらに, p 21 ノックアウトマウスの表皮細胞では分化を誘導させても分化特異的な蛋白質が発現しないことから, p 21 が表皮細胞の増殖にとどまらず分化の調節にも深く関わっていることがわかった¹²⁾.

さらに, p 21 は表皮幹細胞の制御にも関連しているのではないかと想像されたが, 表皮細胞では幹細胞をアッセイする一般的なシステムが確立されていない.

筆者らは, 表皮細胞を移植してヌードマウス上で毛包を再構成することで p 21 と幹細胞の関連

図 2 毛包の再構成を利用した表皮幹細胞のアッセイ

A: 毛包の再構成の原理

B: 通常の表皮細胞から再構成された毛包では, 一部分しかアルカリフォスファターゼのシグナルは認められないが, p 21 を欠失した細胞では全体が陽性を示す毛包がみられる.

について解析を試みた(図 2 A).

毛包は特異的に分化した表皮細胞が同心円状に 3 層の構造を構成しており, 外方から外毛根鞘, 内毛根鞘, マトリックスとよれているが, 幹細胞はこのすべてを形成しうる. そこで毛包の基部にある毛乳頭細胞と一緒に表皮細胞をヌードマウスの

皮下に移植し、細胞集団に含まれる幹細胞から毛包を再構成させた¹³⁾。この際に、レトロウイルスを利用して表皮細胞をアルカリフォスファターゼでマークして移植した。表皮細胞中に幹細胞が多数存在すれば、アルカリフォスファターゼ遺伝子は幹細胞にも導入されるので、再構成された毛包は全体がアルカリフォスファターゼ遺伝子を有することとなるはずである。通常のマウス表皮細胞から再構成された毛包は、毛包の一部分にしかアルカリフォスファターゼ遺伝子は検出されないことから、幹細胞はわずかしかな存在しないと考えられた(図2B)。

しかし、p21を欠失した表皮細胞では、約20%の毛包で毛包全体がアルカリフォスファターゼの活性を示した。このことは、P21を欠失した表皮細胞中には幹細胞が多数存在することを意味している(図2B)⁴⁾。

このような移植を用いた実験では厳密に定量性を論じることはできない。しかし、この実験結果は表皮細胞ではp21が幹細胞の制御に重要な役割を果たしていることを示している。造血組織においても同様にp21が幹細胞の制御に関与することが示されている¹⁵⁾。p21と幹細胞の関連は表皮に限ったものではないと思われる。

Notch は表皮細胞の初期の分化を誘導する

Notch は drosophila の発生過程において、細胞の運命決定を制御する分子として解析が当初進められた¹⁶⁾。人間やマウスにおいても4種類 Notch が存在し、哺乳類においても細胞の運命の決定や制御において重要な役割を果たすものと思われた。この予想に違わず、その後の解析は Notch のシグナルが T lymphocyte の $\alpha\beta$ や $\gamma\delta$ 、もしくは CD4 や CD8 といった細胞の系列を決めるうえで重要であることが明らかとなった^{17,18)}。また運命決定の面だけでなく、増殖分化の制御の面においても、血液細胞や神経細胞といった細胞の分化を抑制し細胞を未分化な状態に維持する作用があることが明らかとなってきた^{19,20)}。

表皮においても Notch やそのリガンドの発現

図3 Notch 1 の表皮での働き
A : Notch 1 を欠失したマウス表皮
B : Notch 1 の表皮での働きのまとめ

が認められることから、その発生や恒常性の維持に重要な役割を果たしていると思われた²¹⁾。筆者らはこの予想を検証するため、表皮特異的に Notch 1 を欠失させたマウスを作製し解析を行った。Notch 1 を欠失させたマウスの表皮は厚く、有棘層の細胞も基底細胞様の形態を呈していた(図3A)。

通常、表皮では最も深い位置に存在する一層の基底細胞のみが未分化な性質を有し、そのうえに位置する有棘細胞とはきわめて異なっている。

Notch 1 を欠失した表皮では有棘層の細胞が基底細胞に類似した性質を示し、細胞の分化が阻害されていた。この結果は、血液細胞などと異なり表皮細胞では Notch 1 が細胞分化を誘導することを示唆している。

一方、*in vitro* の解析は、Notch 1 が p 21 の発現を誘導して表皮細胞の増殖をストップさせ、ケラチン 1 やインボルクリンの発現を誘導し分化の初期段階を促進するというものであった(図 3 B)。しかしロリクリン、フィラグリンといった分化の最終段階で発現される蛋白の発現は、逆に抑制されることから、Notch 1 は分化を初期段階までは誘導するが、その先への進行は抑制するということが明らかになった²²⁾。

以上の *in vivo* と *in vitro* の結果は Notch 1 が表皮細胞の分化を促進するという方向性で、表皮の組織としての恒常性を維持するために働いていることを指し示している。また Watts らは、Notch のリガンドの一つである Delta が表皮幹細胞に発現して Notch のシグナルを抑制することで幹細胞の分化が抑えていると報告している²³⁾。

今後の展望

今日、さまざまな因子が細胞の増殖や分化の制御に関わっていることが明らかになってきている。しかし、血液や筋といった間葉系細胞で明らかとなった知見が上皮細胞には必ずしもあてはまらないことが多いのも事実である。また、ある種の遺伝子を欠失させたマウスにおいて、上皮組織を中心に顕著な表現型がみられるということは多々ある。悪性腫瘍の 80%以上が上皮組織に由来するという点からも、上皮細胞の性質を解析していくことは重要と思われる。表皮細胞で得られた結果は、たんに皮膚組織に限定したものではなく、上皮組織の制御機構を明らかにしていくうえで有意義であると私たちは考えている。

文 献

1) Forslind B et al.: Aspects on the physiology of

- human skin: studies using particle probe analysis. *Microsc Res Tech* 38: 373-386, 1997.
- 2) Li L et al.: Chelation of intracellular Ca_2^+ inhibits murine keratinocyte differentiation *in vitro*. *J Cell Physiol* 163: 105-114, 1996.
- 3) Xie Z et al.: Phospholipase C-gamma is required for calcium-induced keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* 274: 20421-20424, 1999.
- 4) Santini MP et al.: Cross talk among calcineurin, Sp1/Sp3, and NFAT in control of p21^{WAF1/CIP1} expression in keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9575-9580, 2001.
- 5) Ohba M et al.: Induction of differentiation in normal human keratinocytes by adenovirus-mediated introduction of eta and delta isoforms of protein kinase C. *Mol Cell Biol* 18: 5199-5207, 1998.
- 6) Cabodi S et al.: A PKC- η /Fyn-dependent pathway leading to keratinocyte growth arrest and differentiation. *Mol Cell* 6: 1121-1129, 2000.
- 7) Seitz CS et al.: Alteration in NF-kappaB function in transgenic epithelial tissue demonstrate a growth inhibitory role for NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2307-2312, 1998.
- 8) Takeda K et al.: Limb and skin abnormalities in mice lacking IKK α . *Science* 284: 313-316, 1999.
- 9) Hu Y et al.: Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKK α subunit of IkappaB kinase. *Science* 284: 316-320, 1999.
- 10) Li Q et al.: IKK 1-deficient mice exhibit abnormal development of skin and skeleton. *Genes Dev* 13: 1322-1328, 1999.
- 11) Missero C et al.: Involvement of the cell-cycle inhibitor Cip1/WAF1 and the E1A-associated p300 protein in terminal differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5451-5455, 1995.
- 12) Missero C et al.: The absence of p21 Cip1/WAF1 alters keratinocyte growth and differentiation and promotes ras-tumor progression. *Genes Dev* 10: 3065-3075, 1996.
- 13) Kamimura J et al.: Primary mouse keratinocyte cultures contain hair follicle progenitor cells with multiple differentiation potential. *J Invest Dermatol* 109: 534-540, 1997.
- 14) Topley G et al.: p21(WAF1/Cip1) functions as a suppressor of malignant skin tumor formation and a determinant of keratinocyte stem-cell potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9089-9094, 1999.
- 15) Cheng T et al.: Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21. *Science* 287: 1804-1808, 2000.
- 16) Artavanis-Tsakonas S et al.: Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284: 770-776, 1999.
- 17) Pui JC et al.: Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity* 11: 299-308, 1999.
- 18) Deftos ML et al.: Notch 1 signaling promotes the maturation of CD4 and CD8 T thymocytes. *Immunity* 13: 73-84, 2000.

- 19) Lindsell CE et al. : Jagged : a mammalian ligand that activates Notch 1. *Cell* 24 : 909-917, 1995.
- 20) Han W et al. : A soluble form of human Delta-like-1 inhibits differentiation of hematopoietic progenitor cells. *Blood* 95 : 1616-1625, 2000.
- 21) Luo B et al. : Isolation and functional analysis of cDNA for human jagged 2, a gene encoding a ligand for the Notch 1 receptor. *Mol Cell Biol* 17 : 6057-6067, 1997.
- 22) Okuyama R et al. : Notch signaling is a direct determinant of keratinocyte growth arrest and entry into differentiation. *EMBO J* 20 : 3427-3436, 2001.
- 23) Lowell S et al. : Stimulation of human epidermal differentiation by Notch-Delta signalling at the boundaries of stem-cell clusters. *Curr Biol* 10 : 491-500, 2000.