

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10207

研究課題名(和文)先天性表皮水疱症モデル細胞を用いたヘミデスモソームの形成と解体の分子機構の解明

研究課題名(英文) Analyses of hemidesmosomal assembly and disassembly using cultured model cells of inherited blistering skin diseases.

研究代表者

平子 善章 (Hirako, Yoshiaki)

名古屋大学・理学研究科・講師

研究者番号：50377909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム編集により、4種類の主要なヘミデスモソーム構成分子をそれぞれ欠失した表皮由来培養細胞株を樹立した。プレクチンもしくはインテグリン α 4鎖を欠失した細胞株では、ヘミデスモソームはほとんど形成されなかった。XVII型コラーゲン欠失細胞では、II型ヘミデスモソーム様の構造は観察されるが、I型ヘミデスモソームは形成されなくなった。一方、BP230欠失細胞では、I型ヘミデスモソーム様の接着構造の形成が観察された。また、I型ヘミデスモソーム構造への構成タンパク質の集合には、XVII型コラーゲンのホモ三量体形成能が重要である可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヘミデスモソーム研究には、これまで先天性表皮水疱症患者由来の細胞が用いられ、その発展に大きく寄与してきたが、利用には制限があり、かつ入手も簡単ではなかった。本研究では、細胞バンクから購入した培養株細胞からモデル細胞を作製した。そのため、利用には制限がなく、すでに数十年の研究実績がある株細胞であることから、既存の研究手法による操作も容易である。また、近い将来においては、必要とする研究者に細胞を頒布する予定であり、ヘミデスモソーム研究だけでなく、先天性表皮水疱症の病理解明のための研究にも大いに貢献するものと考えている。

研究成果の概要(英文)：By genome editing, we established epidermis-derived cultured cell lines lacking each of the four major hemidesmosome constituents. Hemidesmosomes were rarely formed in cells lacking plectin or integrin α 4 subunit. In type XVII collagen-deficient cells, type II hemidesmosome-like structures were observed, but type I hemidesmosomes were no longer formed. On the other hand, BP230-deficient cells formed type I hemidesmosome-like adhesions. It was suggested that the homotrimer-forming ability of type XVII collagen is important for the assembly of hemidesmosomal constituents into the type I structure.

研究分野：細胞生物学

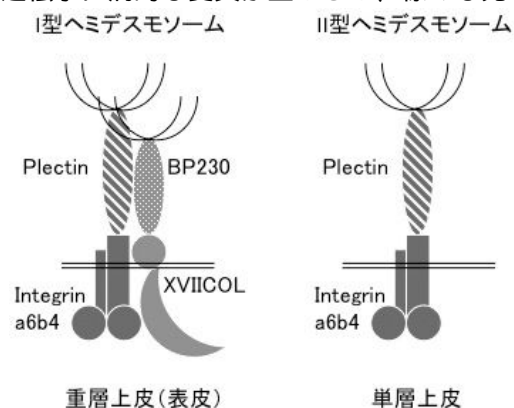
キーワード：表皮 ヘミデスモソーム コラーゲン ラミニン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

表皮と真皮の結合は主に表皮基底細胞のもつ細胞-基質間接着装置ヘミデスモソームによって担われている。表皮の I 型ヘミデスモソームは細胞質側のプレクチン構成タンパク質であるプレクチンと BP230 /BPAG1、膜タンパク質のインテグリン $\alpha 6 \beta 4$ と XVII 型コラーゲン/BP180 を主要構成分子としている(右図)。これらヘミデスモソームの構成分子とその細胞外マトリックスリガンド(ラミニン 332 と VII 型コラーゲン)の遺伝子に病的な変異が生じると、様々な先天性表皮水疱症を発症することが知られている。

これまで、分子細胞生物学的な手法による病理解析には培養した先天性表皮水疱症患者の細胞が用いられてきた(Koster et al, 2003 など)。しかし、このような解析の問題点として、患者由来の表皮細胞の入手が容易ではないことに加え、成熟したヘミデスモソームと基底膜を培養下で細胞に形成させることが非常に難しいということがある。私達は扁平上皮がん由来の培養細胞株である DJM-1 細胞を角化細胞用無血清培地で 10 日間培養すると、成熟したヘミデスモソームの形成が促進されることを発見した(Hirako et al, 2014)。さらに私達は、CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集によって XVII 型コラーゲンを欠失した DJM-1 細胞の作出にも成功した。私達が確立した長期培養法により XVII 型コラーゲン欠失 DJM-1 細胞にヘミデスモソームを形成させた所、XVII 型コラーゲンだけでなく BP230 もヘミデスモソームにほとんど局在しなくなっているのが観察された。同様の現象は XVII 型コラーゲンの欠失を原因とする表皮水疱症である GABEB 患者表皮細胞でも観察されており(Borradori et al, 1998)。患者細胞の表現型を DJM-1 の欠失細胞でも再現できることが確認された。さらに DJM-1 細胞をヌードマウス皮下に注入したところ、腫瘍が形成され、腫瘍周囲に基底膜成分であるラミニン 332 に加えて、プラスチック皿では観察されない VII 型コラーゲンの基底膜への集積も確認された。以上のことから、ゲノム編集によりヘミデスモソーム構成分子欠失 DJM-1 細胞の作製とその解析を目的とする本研究計画を立案するに至った。



2. 研究の目的

先天性表皮水疱症の多くは細胞-基質間接着装置ヘミデスモソームの関連分子の遺伝子変異が原因となって起こる。疾患の原因となる或る遺伝子型が特定の表現型を呈するのは、その背後に特有の病理の分子メカニズムが存在するからである。本研究計画の目的は、DJM-1 細胞を用いて、ゲノム編集技術により先天性表皮水疱症のモデル細胞株を作製し、病理に関わる細胞-基質間接着の異常を詳しく解明することにある。まずは、すでに作製済みの XVII 型コラーゲン欠失細胞に加えて、新たにプレクチン、インテグリン $\alpha 6 \beta 4$ 、BP230 をそれぞれ欠失した DJM-1 細胞を作成する。ついで作製した欠失細胞株について、ヘミデスモソーム構造の形成、細胞外マトリックスの集積、ケラチン線維ネットワークの 3 点に注目して解析をおこなう。同時に並行して、XVII 型コラーゲン欠失細胞に XVII 型コラーゲンの各種変異体を導入することで、表皮水疱症を引き起こす病理およびヘミデスモソームの形成と解体における XVII 型コラーゲンの機能とその制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

CRISPR/Cas9 システムを用いたゲノム編集により各ヘミデスモソーム構成分子を欠失した DJM-1 細胞を作製した。ゲノム編集は Cas9 と sgRNA を発現する px330 ベクターをトランスフェクション試薬を用いて細胞に導入することでおこなった。Web 上に公開されているプログラムを使用して設計した sgRNA 配列を含む px330 ベクターと同時に puromycin 耐性遺伝子を含むプラスミドもトランスフェクトし、一過的な抗生物質耐性により、ゲノム編集されている細胞を濃縮した。その後、限界希釈法と抗体染色により、欠失細胞をクローニングし、単離した細胞株のゲノムシーケンスをおこなって、標的遺伝子に変異が導入されていることを確認した。さらに、得られた細胞の生化学的解析と蛍光顕微鏡観察により、標的遺伝子産物が欠失していることを確認した。本研究計画以前に作製済みの XVII 型コラーゲン欠失細胞には、野生型の XVII 型コラーゲンを再導入することで、表現型が回復することを確認した。ついで、表皮水疱症を引き起こすとされているアミノ酸置換変異をもつ XVII 型コラーゲン変異体を欠失細胞に導入し、表現型が再現されるかどうかを検討した。また、XVII 型コラーゲンが三量体として存在していることが、ヘミデスモソーム構造の形成にどのような意味があるのかを明らかにするべく、複数の部分欠失変異体を作製/導入し、ヘミデスモソーム構造形成への影響を調べた。DJM-1 細胞の腫瘍形成実験は、名古屋大学大学院理学研究科の動物実験委員会に申請し、承認を受

けた動物実験計画書に従い、適切なエンドポイントを設定した上でおこなわれた。

4. 研究成果

(1)ゲノム編集により、ヘミデスモソーム構成タンパク質であるプレクチン、インテグリン 4 鎖、BP230 をそれぞれ欠失した DJM-1 細胞株を新たに作製した。研究開始当初は、限界希釈法によるクローニング時に、DJM-1 細胞のクローン出現率が著しく低く、欠失細胞株を得るのに一定の労力を必要としたが、その後、マイトマイシン処理した 3T3 細胞をフィーダー細胞として共培養すると単離されるクローン数が大きく増加することがわかり、順調な実験進行に大きく寄与した。プレクチンまたはインテグリン 6 4 を遺伝的に欠失すると、ほとんどヘミデスモソームが形成されなくなることが、ヒトの遺伝性表皮疾患患者やモデルマウスの解析から知られている。このことと一致して、私たちが作製したプレクチン欠失細胞とインテグリン 4 鎖欠失細胞では、ヘミデスモソーム構成タンパク質の集積は全く観察されなかった。しかしながら、プレクチン欠失細胞もインテグリン 4 鎖欠失細胞も、プラスチック皿底面への接着と伸展については、親細胞との間に顕著な差は認められなかった。一方、基底膜タンパク質であるラミニン 332 の沈着パターンには親細胞と、プレクチン欠失細胞およびインテグリン 4 鎖欠失細胞の間では違いが存在していた。

(2)BP230 欠失 DJM-1 細胞を得るために BP230 遺伝子の exon1 と exon2 をそれぞれターゲットとしてゲノム編集をおこなった。exon2 をターゲットとした細胞では BP230 タンパク質が検出されなくなったが、exon1 をターゲットとするゲノム編集では、親株とほぼ同じサイズの BP230 タンパク質が検出された。このことは、exon1 の標的配列の下流に存在するインフレームの開始コドンからほぼ全長に相当する BP230 タンパク質が翻訳されたためと考えられる。しかし、exon1 にフレームシフト変異をもつ細胞では無血清培地での BP230 の HD への組み込みが観察されなくなった。この結果は、BP230 の N 末端がインテグリン 4 鎖との相互作用に関わっているとする先行研究と一致する (Koster et al, 2003)。このように、BP230 欠失 DJM-1 細胞を作製することには成功したが、BP230 は、通常培養条件下の DJM-1 細胞ではほぼヘミデスモソームに局在しないため、欠失細胞のクローニング時において抗体染色による選抜が困難だっただけでなく、BP230 が欠失したことのヘミデスモソームへの機能的影響を解析するのが難しかった。このことが新たに FRSK 細胞で欠失細胞の作製を目指す動機の一つとなった。

(3) XVII 型コラーゲン欠失 DJM-1 細胞に、先天性表皮水疱症の原因となっていると考えられている S265C 変異 (Wu et al, 2002) または R1303Q 変異 (Yuen et al, 2011) を持つ XVII 型コラーゲンの変異体を導入し安定発現株を作製した。これら変異体を安定発現する細胞を角化細胞用無血清培地で長期培養すると、予想に反して、親細胞とほぼ同様の成熟したヘミデスモソームを形成することが明らかとなった。このことから、少なくとも培養した細胞の作るヘミデスモソーム形成にはこれらの XVII 型コラーゲンのアミノ酸置換変異はほとんど影響しないことが明らかとなった。また、ラミニン 332 の沈着量にも大きな影響は認められなかった。現在は、より生体に近い条件下での影響を観察するため、腫瘍形成実験を計画中である。

(4)通常の血清含有培地では DJM-1 細胞は、プレクチンとインテグリン 6 4 からなる II 型のヘミデスモソームを主に形成する。XVII 型コラーゲンはそれらの一部にのみ共局在し、BP230 はほぼ全くヘミデスモソームには局在しない。XVII 型コラーゲンと BP230 を含む成熟した I 型のヘミデスモソームは、DJM-1 細胞を無血清培地で長期培養した場合のみ形成される。このことは、意図的に I 型コラーゲン形成を誘導できるという点においては利点となるが、長期培養が必要なため、時間的な制約があり、迅速な研究の進展において障害となっていた。これまでの研究から、ラット表皮由来の株細胞 FRSK では、数日で成熟した I 型ヘミデスモソームが形成されることがわかっていた (Hieda et al, 1992)。しかし、FRSK 細胞への遺伝子導入が容易ではない点が、この細胞を用いた研究を困難にしていた。そこで、私たちは特に I 型ヘミデスモソーム特異的構成分子である XVII 型コラーゲンと BP230 についての解析を進展させるため、市販されている複数のトランスフェクション試薬について FRSK 細胞へのトランスフェクション効率を調べた。その結果、promega 社の viafect が FRSK 細胞に対して 1 割程度のトランスフェクション効率を示すことがわかった。私たちは、viafect を使用して、当初の計画にはなかった XVII 型コラーゲンもしくは BP230 を欠失した FRSK 細胞株をゲノム編集により作製した。

(5) FRSK 細胞の XVII 型コラーゲン遺伝子もしくは BP230 遺伝子を標的としたゲノム編集をおこない、限界希釈法により XVII 型コラーゲンもしくは BP230 を欠失した FRSK 細胞クローンを単離した。いずれのクローンでも細胞の伸展や接着には大きな異常は認められなかった。しかし、XVII 型コラーゲン欠失 FRSK 細胞では、I 型ヘミデスモソーム様の接着構造の形成が観察されなくなった。この I 型ヘミデスモソームの形成不全はヒト XVII 型コラーゲンの再導入により、回復した。さらに、細胞膜に最も近接したコラーゲンドメイン以外の細胞外部分を欠いた XVII 型コラーゲン変異体を欠失細胞に発現させた場合でも、I 型ヘミデスモソーム形成能は回復した。これらのことから、I 型ヘミデスモソーム形成には XVII 型コラーゲンの細胞質ドメインが細胞外のコラーゲンドメインにより 3 量体化していることが重要である可能性が考えられた。また、もう一つの I 型ヘミデスモソーム特異的タンパク質である BP230 を欠失させた FRSK 細胞では、親細胞とほぼ同様の I 型ヘミデスモソーム様の構造が形成されていた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hayakawa Taihei, Hirako Yoshiaki, et al	4. 巻 26
2. 論文標題 Unique mouse monoclonal antibodies reactive with maturation-related epitopes on type VII collagen	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 EXPERIMENTAL DERMATOLOGY	6. 最初と最後の頁 811-819
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/exd.13306	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Natsuga Ken, Nishie Wataru, Nishimura Machiko, Shinkuma Satoru, Watanabe Mika, Izumi Kentaro, Nakamura Hideki, Hirako Yoshiaki, Shimizu Hiroshi	4. 巻 38
2. 論文標題 Loss of interaction between plectin and type XVII collagen results in epidermolysis bullosa simplex	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 HUMAN MUTATION	6. 最初と最後の頁 1666-1670
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/humu.23344	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Toyonaga Ellen, Nishie Wataru, Izumi Kentaro, Natsuga Ken, Ujiie Hideyuki, Iwata Hiroaki, Yamagami Jun, Hirako Yoshiaki, Sawamura Daisuke, Fujimoto Wataru, Shimizu Hiroshi	4. 巻 137
2. 論文標題 C-Terminal Processing of Collagen XVII Induces Neoepitopes for Linear IgA Dermatitis Autoantibodies	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 2552 ~ 2559
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2017.07.831	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 浅倉亮佑、平子善章
2. 発表標題 基底膜タンパク質ラミニン332の沈着パターン形成におけるプレクチンの機能の検証
3. 学会等名 第52回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤岡光、平子善章
2. 発表標題 XVII型コラーゲン欠失培養ラット表皮角化細胞株の作製とヘミデスモソーム形成への影響の解析
3. 学会等名 第52回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshiaki Hirako, Ryotaro Kamo and Tatsuya Hiraki
2. 発表標題 Generation of cultured human cells deficient in dermal-epidermal adhesion apparatus by genome editing
3. 学会等名 Japan - Singapore International Skin Conference 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平木辰弥、平子善章
2. 発表標題 XVII型コラーゲンの三量体形成能はヘミデスモソームを介したラミニン沈着において重要な意味をもつ
3. 学会等名 第50回日本結合組織学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤擁, 加茂遼太郎, 平子善章
2. 発表標題 ヘミデスモソーム構造における2種類のプラーキンタンパク質の役割の解析
3. 学会等名 第49回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 近藤擁, 平子善章
2. 発表標題 Distinct roles of two plakin proteins in type I hemidesmosomes
3. 学会等名 日本研究皮膚科学会第42回年次学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学大学院生命理学専攻細胞生物学グループ
<http://www.bio.nagoya-u.ac.jp/laboratory/images/cb.jpg>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	西沢 祐治 (Nishizawa Yuji) (80252229)	中部大学・生命健康科学部・教授 (33910)	電子顕微鏡観察

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------