

平成 21 年 4 月 27 日現在

研究種目：基盤研究（c）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591317

研究課題名（和文）

エピプラキンの in vivo 複合体の同定とその機能

研究課題名（英文）

The Identification of in vivo Complex of Epiplakin and its Function

研究代表者 藤原 作平(FUJIWARA SAKUHEI)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：90181411

研究成果の概要：エピプラキンは、自己免疫性表皮下水疱症の自己抗原として同定された表皮細胞内分子である。創傷治癒 2 日目において、エピプラキン存在下で、核周囲にケラチンが凝集し、2 日目以降に核と細胞膜の間に線維として再構築され、同時に表皮細胞が肥大化した。エピプラキンノックアウト表皮細胞では、細いケラチン線維が、細胞膜と平行に走行して観察され、表皮細胞の肥大化が生じなかった。このことからエピプラキンは、ケラチン線維を束ねて細胞強度を与える役割を果たしていることが推定された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、皮膚科学

キーワード：エピプラキン、自己抗原、自己免疫性水疱症、表皮細胞、ケラチン、創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

エピプラキンは他のプラキン分子のカルボキシ末端に見られる B ドメイン構造が、ポリペプチド全体にわたり存在する (J Biol Chem, 2001)。一方他のプラキン分子はカルボキシ末端で、ケラチンをはじめとする中間径フィラメントと相互作用をすると考えられている。これらの事実から、B

ドメインのみから構成されるエピプラキンはケラチンを束ねる役割を果たすのではないかと推定した。事実スロットプロット・アッセイでは、ケラチンとの相互作用に B ドメインとリンカー部分の両者が必要であるという知見が得られ、この説が支持された (J Dermatol 2006)。しかしこれはあ

くまで invitro の実験結果であり、実際表皮細胞内で、ケラチンと相互作用しているのか、しているとすればどのような接触態度をとっているのかは、まだ不明である。

一方エピプラキン・ノックアウトマウスを作成したところ、通常状態では野性型との間に明らかな表現型の差異は見られず、ケラチンの配行異常も認められなかったが、皮膚の創傷治癒実験で、軽度創傷治癒が促進し、皮膚の explant を用いた実験でも、表皮細胞遊走能が亢進した (Mol Cell Biol, 2006)。これはケラチン 6 ノックアウトマウスと類似した現象 (Wong & Coulombe, J Cell Biol, 2003) で、少なくとも創傷辺縁部に出現する大型の表皮細胞には、エピプラキンとケラチン 6 の共発現が見られた。しかし、エピプラキンはケラチン 6 と結合するのか、それともケラチン 6/ケラチン 16 あるいはケラチン 6/ケラチン 17 と結合するのかについては、未解明である。

2. 研究の目的

本研究では野性型とエピプラキン・ノックアウトマウスでの創傷治癒過程で、免疫電子顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡による観察で、実際どのようなケラチンとエピプラキンの相互作用をしているか、またエピプラキンが欠損するとケラチン線維がどのように変化するかを観察し、その機能を明らかにしたい。

3. 研究の方法

(1) マウス皮膚での創傷作成

過去の報告 (Goto, et al Mol Cell Biol, 2006) 通り、腹腔麻酔下にマウス背部皮膚に 6mm のパンチ生検具で創を作成し、その治癒過程の皮膚を採取し、共焦点レーザー顕微鏡および免疫電子顕微鏡による観察をおこなった。

(2) 抗ケラチン抗体、抗エピプラキン抗体作成

ケラチン 5, 10 の特異配列部分の cDNA を RT-PCR で合成し、それを GST ベクターに組み込み、融合蛋白質を作成後、ラットに免疫しその血清を採取

し抗体を得た。抗マウスエピプラキン抗体については、過去の報告 (Goto, et al) 通り、家兎に免疫して抗血清を得、その抗原で吸収溶出し、特異抗体を得た。

(3) 共焦点レーザー顕微鏡、免疫電子顕微鏡による観察

これも既報告通り、FITC 標識抗マウス、ラット IgG、Rhodamine 標識抗ウサギ IgG を用いて 2 重染色を行ない、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。免疫電子顕微鏡については、15nm 金コロイド粒子標識抗ウサギ IgG、10nm 金コロイド粒子標識抗マウス IgG を用いて 2 重染色を行ない、電子顕微鏡で観察した。

(4) 表皮細胞培養

生後 3 - 4 日目の皮膚を剥離し、トリプシンを用いた後、コレラトキシン、EGF、コルチゾール入り DMEM+F12 培養液で培養した。

4. 研究成果

創傷治癒過程では、4 - 6 日目に創端の増殖表皮細胞の基底細胞層から上方にエピプラキンの強い発現が見られたが、8 日目に減弱し、10 日では正常に復した。創は 6 - 8 日で治癒したが、創面を伸長する表皮先端には発現が見られなかった。免疫電子顕微鏡観察では、創傷部の増殖表皮細胞において、4 - 6 日目にケラチン 6、10 の混合した太い線維の周囲にエピプラキンが見られた。このケラチン線維は 2 日目では、核周囲に凝集し、2 日以降にエピプラキン存在下で核と細胞膜の間に、線維として再構築され、それとともに表皮細胞が肥大化した。しかしエピプラキンノックアウト表皮細胞では、細いケラチン線維が、細胞膜と平行に走行する線維として観察され、表皮細胞の肥大化が生じなかった。これらのことからエピプラキンの機能は、ケラチン線維を束ねて強度を与える役割を果たしていることが支持された。

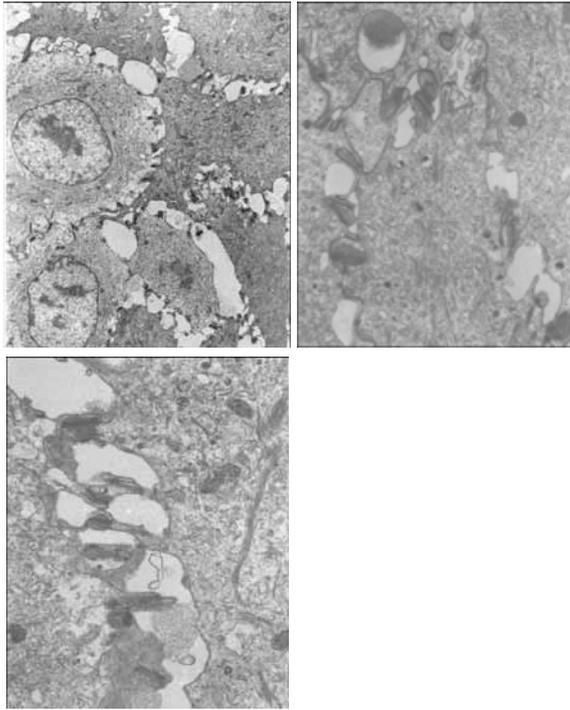


図1 エピプラキンノックアウトマウスの有棘細胞の電子顕微鏡像
野生型(図3)に比較して、ケラチン線維が細く、細胞膜に垂直に走行せず、むしろ並行に走行する。細胞間隙も広い。

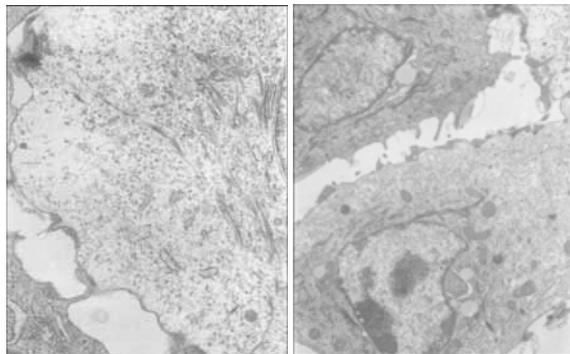


図2 エピプラキンノックアウトマウスの基底細胞の電子顕微鏡像
図1と同様にケラチン線維が細く、細胞膜に並行に走行する。

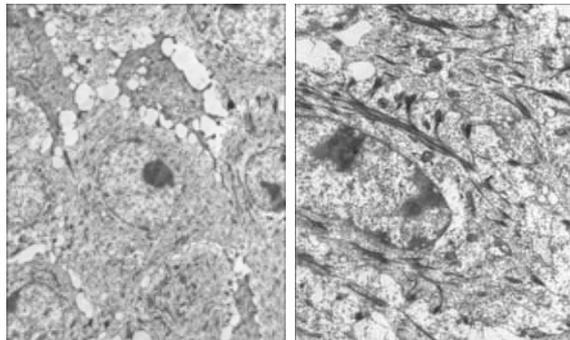


図3 野生型マウスの有棘細胞の電子顕微鏡像

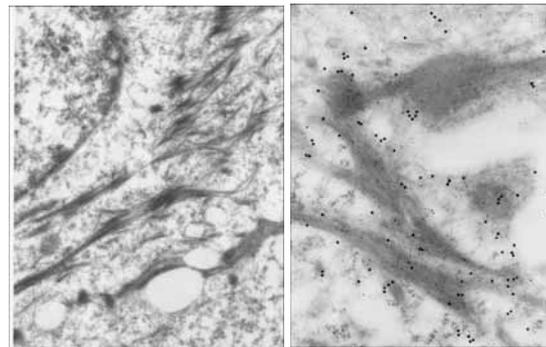


図3(つづき) 野生型マウスの有棘細胞の透過電子顕微鏡像と免疫電顕像
15nm dots: EPPK, 10nm dots:keratin
エピプラキンノックアウトマウス(図1)に比較して、ケラチン線維が太く、細胞膜に垂直に走行する。またエピプラキンはケラチン線維に近接して存在する。

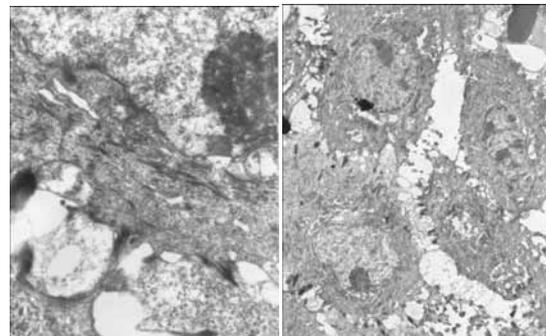


図4 野生型マウスの基底細胞の電子顕微鏡像
エピプラキンノックアウトマウス(図2)に比較して、ケラチン線維が細胞間の細胞突起の中に、入りこんでいる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

Yoshida T, Shiraki N, Baba H, Goto M, Fujiwara S, Kume K, Kume S: Expression patterns of epiplakin 1 in pancreas, pancreatic cancer and regenerating pancreas. *Genes Cells*, 13(7), 667-678, 2008. 査読有

Okamoto O, Ando T, Watanabe A, Sato F, Mimata H, Shimada T, Fujiwara S: A novel point mutation in type collagen gene resulting in exon 24 skipping in a case of vascular type Ehlers-Danlos syndrome. *Arch Dermatol Res*, 300, 525-529, 2008. 査読有

(3)連携研究者

なし

Suzuki N, Suzuki T, Inagaki K, Ito S, Kono M, Horikawa T, Fujiwara S, Ishiko A, Matsunaga K, Aoyama Y, Tosaki-Ichikawa H, Tomita Y: Ten novel mutations of the ADAR1 gene in Japanese patients with dyschromatosis Symmetrica hereditaria. J Invest Dermatol, 127, 309-311, 2007. 査読有

〔学会発表〕(計1件)

Ishikawa K: The expression and the distribution of epiplakin on wound healing. International Investigative Dermatology, Kyoto, May 14-17,

〔図書〕(計1件)

藤原作平: 真皮・皮膚の疾患. 標準皮膚科学第8版 (瀧川雅浩, 富田靖, 橋本隆編), 15-18, 275-297, 医学書院, 東京, 2007.

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 作平(FUJIRAWA SAKUHEI)
大分大学・医学部・教授
研究者番号: 9 0 1 8 1 4 1 1

(2) 研究分担者

岡本 修(OKAMOTO OSAMU)
大分大学・医学部・講師
研究者番号: 4 0 2 8 4 7 9 9

後藤 瑞生(GOTO MIZUKI)
大分大学・医学部・助教
研究者番号: 7 0 4 3 3 0 5 0

住吉 秀明(SUMIYOSHI HIDEAKI)
大分大学・医学部・助教
研究者番号: 6 0 3 4 3 3 5 7