

平成 22 年 5 月 30 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790807

研究課題名 (和文) なぜエピプラキン欠損時に表皮細胞遊走能が亢進するのか？

研究課題名 (英文) What is the mechanism of the accelerated migration of epiplakin-deficient keratinocytes?

研究代表者

後藤 瑞生 (GOTO MIZUKI)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：70433050

研究成果の概要 (和文): エピプラキンは、プラキン・ファミリーに属する表皮細胞内結合分子である。BPAG1(水疱性類天疱瘡抗原 1)、プレクチンなど他のプラキン・ファミリー分子と同様に、そのプラキン繰り返しドメイン (plakin repeat domains) はリンカーとともに、ケラチン、ビメンチンなどの中間径フィラメントと相互作用することが明らかになった (J Dermatol 2006)。一方エピプラキン欠損マウスを作成後、マウス背部に皮膚欠損を作成し、その治癒過程を比較したところ、欠損マウスの方がやや早い上皮化を認めた (Goto et al, Mol Cell Biol, 2006)。エピプラキンは創傷辺縁の増殖表皮細胞に強く発現し、かつケラチンと結合すると考えられるため、ケラチンネットワーク構造が障害されていることが、エピプラキン欠損時の表皮細胞遊走促進と関係があるのではないかとこの仮説を立てた。エピプラキンとケラチンとの局在、野生型とエピプラキン欠損マウスでの、ケラチン分布、ケラチン線維の違いを検討した。その結果、野生型マウスと比較してエピプラキン欠損マウス創傷治癒過程において、光顕レベルでは、ケラチンの分布に差は見られなかったが、電子顕微鏡レベルでは、ケラチンの太さが減少していることが明らかになった (投稿中)。さらに創傷辺縁部でエピプラキンは、ケラチン 5, 10, 6 と近接して存在することが明らかになった。このことからエピプラキンは、創傷辺縁の増殖表皮細胞でケラチンを束ねるのを促進し、ストレス環境下でケラチンネットワーク構造を補強する役割を有すると考えられた。

研究成果の概要 (英文): Epiplakin (EPPK) belongs to the plakin family of cytolinker proteins, and like other plakin family proteins, BPAG1 (an autoantigen of bullous pemphigoid), and plectin, *in vitro* experiments have demonstrated that EPPK plakin repeat domains (PRD) and/or linker region binds to intermediate filaments. Elimination of EPPK by gene targeting in mice resulted in acceleration of keratinocytes migration during wound healing. EPPK expressed in proliferating keratinocytes at the wound edges, and from its putative function of keratin binding, it was supposed that the disturbance of keratin network of EPPK-null mice during wound stages. In order to confirm this hypothesis and to know the precise localization of EPPK related to keratin filaments, we compared the non-wound epidermis and the wound epidermis of wild-type and EPPK *-/-* mice. Non-wound epidermis and the wound epidermis of wild-type and EPPK *-/-* mice were examined by immunofluorescence and electron microscopy after double immunostaining. EPPK presented more with keratin 10(K10) in the non-wound epidermis. Although the expression of keratin 5(K5), K10 and keratin 6(K6) were not altered in EPPK deficient mice during wound stage, diameter of keratin filaments decreased in EPPK deficient keratinocytes. Immunoelectron microscopic study revealed that EPPK colocalized with K5, K10 and K6 at the wound stage. This data indicated that EPPK accelerates keratin bundling in proliferating keratinocytes during wound stage and EPPK may contribute to reinforce keratin network under stressful environment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

ヒト・エピプラキンは、他のプラキン分子のカルボキシル末端に見られる B ドメイン構造が、ポリペプチド全体にわたり 13 個存在する (Fujiwara et al., J Biol Chem, 2001)。エピプラキンの機能については、in vitro の相互作用の実験から B ドメイン及びリンカードメイン共にケラチン、ビメンチンなどの中間径フィラメントと結合することが明らかになった (Wang et al., J Dermatol, 2006)。この結果エピプラキンは数本のケラチン線維を束ねる役割を果たしていると考えられている。

さらに我々はエピプラキンの機能を in vivo で解析するために、エピプラキン欠損マウスを作成した。エピプラキン欠損マウスの各臓器の光学顕微鏡による観察および電子顕微鏡による表皮細胞の観察では、野性型と比べて明らかな変化を認めなかった。そこでマウス背部に皮膚欠損を作成し、その治癒過程を比較したところ、欠損マウスの方がやや早い上皮化を認めた。真皮の収縮と表皮細胞の増殖

による影響を除くために、マイトマイシン C 処理後に表皮器官培養を行い、表皮細胞の遊走能を比較したところ、エピプラキン欠損マウス由来の表皮細胞が、野性型に比べて有意に長い遊走能を示した。一方、ケラチン 6 のロックアウトマウスでも同様に表皮の伸長速度が速くなるという報告がある為 (Wong & Coulombe, J Cell Biol, 2003)。野性型マウスとエピプラキン欠損マウスで、再生表皮におけるケラチン 6 の発現パターンを検討した。野性型マウスでは一部の表皮細胞でケラチン 6 とエピプラキンの共局在が見られ、欠損マウスの表皮においてはケラチン 6 の発現の低下傾向が見られた (Goto et al., Mol Cell Biol, 2006)。

これらの結果から、エピプラキンはケラチン 6 又はその結合パートナーであるケラチン 16、17 の発現や存在形態に影響を及ぼし、デスモゾームやヘミデスモゾームなどの接着構造を変化させることにより、創傷治癒過程において表皮細胞の遊走を制御しているのではないかと考えられる。本研究ではこの仮説を検討しよ

うとした。

## 2. 研究の目的

エピブラキン欠損マウスと野生型マウスとを比較してマウス皮膚の創傷治癒過程において、(1) ケラチン分布の変化やケラチン線維構造の変化が生じるか、(2) 表皮細胞のサイズが減少するか、(3) エピブラキンのケラチンに対する局在が変化するか、(4) 接着構造の変化が見られるか、デスモゾームが減少するか、細胞間隙が増大するか、という点について研究した。

## 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、抗エピブラキン抗体作成

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。抗マウスエピブ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. 研究成果

### (1) ケラチン発現パターンの変化はない

正常マウス皮膚では、エピブラキンは有棘層を中心に主として、ケラチン 10 と共局在した (図 1)。

創傷治癒過程のマウス皮膚で、ケラチン 5、6、10 の光学顕微鏡レベルでの発現パターンは、エピブラキン欠損マウスと野生型マウスとの間で、変化が認められなかった (図 2, 3)。

(2) エピブラキン欠損マウスでの創傷辺縁での増殖表皮細胞では、ケラチンの太さが野生型に比べて細くなる

エピブラキン欠損マウスの創傷 4 日、6 日で、表皮細胞間隙が拡大し、不規則となり、その増殖表皮細胞では、野生型マウスのそれに比べて、ケラチンの太さが細くなっていた。4 日目のデスモゾームでも、それに連結するケラチンは、エピブラキン欠損マウスの方が細くなっていた。しかし、デスモゾームの数自体は、変化が認められなかった。

(3) エピブラキン欠損マウスでの創傷辺縁での増殖表皮細胞は、野生型に比べて小さくなる傾向にある。

エピブラキン欠損マウスでの創傷辺縁での増殖表皮細胞は、創傷 6 日のみ野生型に比べて有意に小さくなった。しかし 4 日、8 日では、差は見られなかった。

(4) 野生型マウスの創傷辺縁での表皮細胞で、エピブラキンはケラチン 5、10、6 と近接して存在することが明らかになった (図 4)。

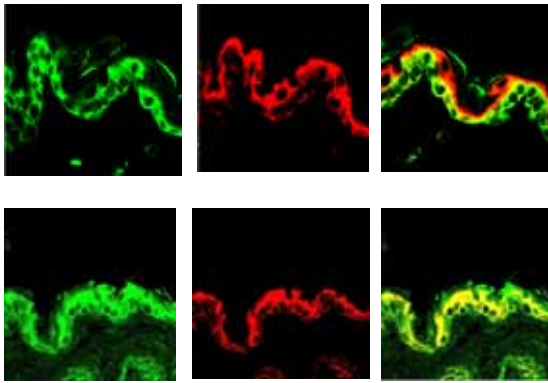


図1 野生型マウスの表皮のケラチン 5、10、エピプラキンの染色パターン（上段左がケラチン 5、下段左がケラチン 10、中央上下がエピプラキン、右上下がそれぞれの合成）

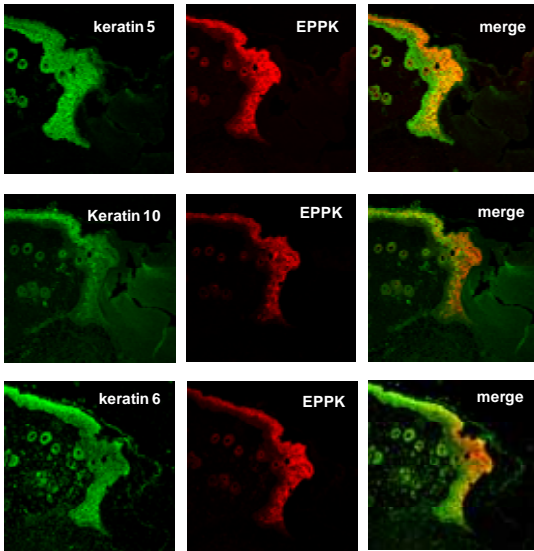


図2 野生型マウスの創傷 4 日のケラチン 5 , 10、6、エピプラキンの染色パターン

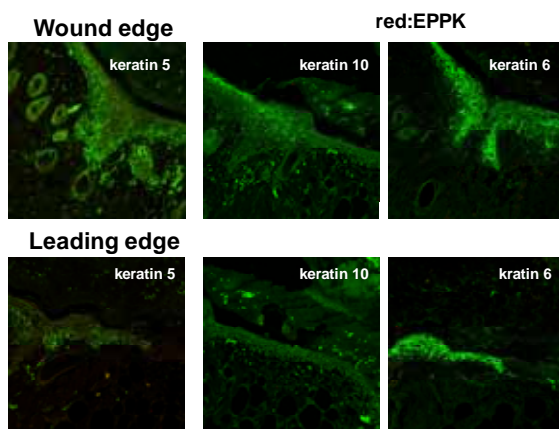


図3 エピプラキン欠損マウスの創傷 4 日のケラチン 5 , 10、6 の染色パターン

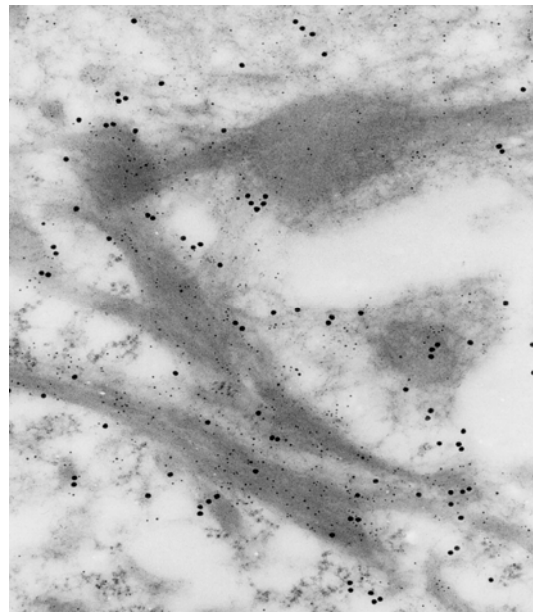


図4 創傷 4 日目の創辺縁表皮細胞の二重免疫電子顕微鏡像（15nm dot エピプラキン、10nm dot ケラチン 6）

#### 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 1 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

〔学会発表〕(計 3 件)

Ishikawa K, Sumiyoshi H, Takeo N, Goto M, Okamoto O, Tatsukawa S, Kitamura H, Yoshioka H, Fujiwara S: The expression and the distribution of epiplakin on wound healing. The 34<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, December 4-6 2009, Fukuoka

Ishikawa K, Sumiyoshi H, Goto M, Tatsukawa S, Kitamura H, Yoshioka H, Fujiwara S: The expression and the distribution of epiplakin on wound healing. *International Investigative Dermatology* 2008, May 14-17 2008,

Kyoto

Goto M:Elimination of epiplakin by gene targeting results in acceleration of keratinocyte migration in mice. (Galderma Award 2007), International Investigative Dermatology 2008, May 14-17 2008, Kyoto

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

後藤 瑞生 (GOTO MIZUKI)  
大分大学・医学部・助教  
研究者番号：70433050

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし