

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591619

研究課題名(和文) 17型コラーゲンが制御する表皮基底細胞遊走メカニズムの解明

研究課題名(英文) Pathogenic roles of collagen XVII in migration of basal keratinocytes

研究代表者

伊藤 圭 (Ito, Kei)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：20421977

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：表皮基底細胞が遊走する際、接合タンパクである17型コラーゲン(COL17)と細胞外マトリクス間の接着は解除される必要があるが、表皮基底細胞の遊走におけるCOL17の生理機能や制御機構の詳細は未だ不明である。本研究では、表皮基底細胞におけるCOL17の発現は遊走を抑制的に働き、創傷治癒部など表皮基底細胞が積極的に遊走しなくてはならない状況ではCOL17の発現が抑制されることが明らかになった。またラミニン332が細胞外マトリクス中で発現亢進すると表皮基底細胞の遊走が低下する結果から、表皮細胞の遊走にはCOL17と相互作用する細胞外タンパクの機能も重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：When basal keratinocytes migrate, adhesion between adhesive proteins including type XVII collagen (COL17) and extracellular matrix (ECM) needs to be dissociated; however, regulation mechanism of this adhesive molecule is not fully understood. In this study, we showed that expression of COL17 in basal keratinocytes may change depending on context dependent manner, and reduced COL17 expression is associated with migrating phenotype. In addition, increased laminin332 expression in the ECM was related with reduced migration of basal keratinocytes, suggesting interactions between COL17 and the ECM proteins are also important for correct migration of basal keratinocytes.

研究分野：皮膚科学

キーワード：皮膚病態学

## 1. 研究開始当初の背景

本研究の目的は、表皮角化細胞の遊走における 17 型コラーゲン (COL17) の生理機能を解明することである。COL17 は、皮膚基底細胞のヘミデスモゾーム構成分子の一つであり、遺伝子異常により先天的に COL17 の発現が消失すると水疱を容易に形成する“表皮水疱症”を発症し、COL17 に対する自己抗体が生じると“水疱性類天疱瘡”が生じる。これらの疾患から、COL17 は表皮真皮間結合の維持に不可欠であることが解る。しかし表皮細胞が遊走する際は、COL17 と細胞外マトリクス間の接着は解除される必要があるが、表皮基底細胞の遊走における COL17 の生理機能や制御機構の詳細は未だ不明である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、表皮細胞の遊走における COL17 の生理機能と発現制御機構を解明することである。

## 3. 研究の方法

(1) COL17 発現の有無と表皮基底細胞の遊走についての解析

GFP 標識の有無によって COL17 発現の有無が確認可能な、表皮基底細胞を作成する。CMV プロモーター下でヒト COL17 cDNA と IRES 下で GFP を発現するベクターを作製し、COL17 発現の無い表皮水疱症患者由来基底細胞 (Nakamura H, et al. Int J Mol Med 18; 333-7, 2006) へレトロウイルスを用い導入する (図 1A)。COL17 の発現をウエスタンブロット法で確認後、タイムラプス観察 (5 分間隔、計 120 分) を行い GFP 発現の有無による表皮基底細胞の遊走について解析を行う。遺伝子導入後の細胞の継代が困難であった場合は、遺伝子導入を繰り返し行い、FACS にて同程度の GFP 発現細胞をソーティングし解析する。

(2) 創傷治癒部における COL17 の発現についての解析

腫瘍切除後などで生じた皮膚潰瘍の辺縁

皮膚を抗 COL17 ポリクローナル抗体 (Natsuga K, et al. J Immunol 188; 5792-9, 2012) で染色し、潰瘍部で遊走する表皮基底細胞での COL17 の発現様式を確認する。解析には 2 例の検体を用いる (症例 1: 26 歳男性、左上腕毛母腫切除 25 日後の皮膚潰瘍。症例 2: 68 歳男性、左鼠径リンパ節廓清後の皮膚潰瘍)。

(3) 表皮基底細胞の遊走における COL17 とラミニン 332 の相互作用について

COL17A1 遺伝子にホモで p.R1303Q 変異を有する患者では、ラミニン 332 等により構成される基底膜の一部である基板が重層化する (Has C, et al. J Invest Dermatol 134; 845-9, 2014)。実際に p.R1303Q 変異を有する表皮水疱症患者培養基底細胞では、細胞外基質 (ECM) 中のラミニン 332 沈着量は増加している (Nishimura M & Nishie W, et al. unpublished data)。p.R1303Q を有する培養表皮基底細胞を用い、ECM でラミニン 332 が増加した際の表皮基底細胞の遊走についてタイムラプス観察を行い検討する。

## 4. 研究成果

(1) COL17 発現の有無による表皮基底細胞の遊走

COL17 発現の無い表皮水疱症患者由来表皮基底細胞へ CMV プロモーター下でヒト COL17 cDNA と IRES 下で GFP を発現するベクターを遺伝子導入したところ、予想通り遺伝子導入細胞は GFP 蛍光を発し、正常表皮基底細胞 (NHEK) と同様、180kD の COL17 タンパクを発現することを確認した (図 1B)。しかし用いた患者由来細胞は初代培養由来の細胞であり、遺伝子導入後の継代が困難であった。そのため GFP 蛍光を指標とした FACS 細胞ソーティングも試みたが、ソーティング後の細胞培養も困難であった。COL17 発現細胞は遊走能が低下する印象はあったものの、有意なデータとして結論を得

ることは出来なかった。

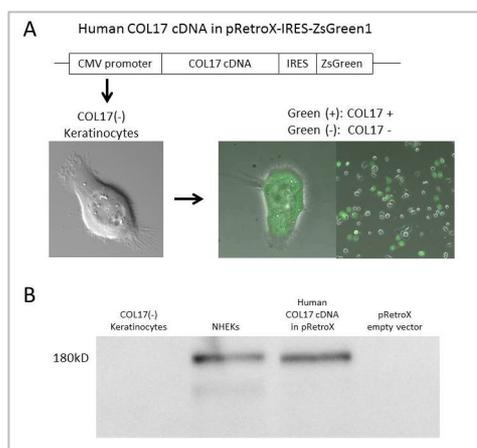


図1 COL17 発現細胞の GFP 標識

(2) 創傷治癒部の表皮基底細胞では COL17 の発現は低下する

2 検体の皮膚潰瘍辺縁部皮膚を抗 COL17 ポリクローナル抗体で染色したところ、上皮化しつつある部位での表皮基底細胞の基底膜部での COL17 発現は正常部と比較し著減していた(図2、矢印)。表皮基底細胞が遊走し上皮化する創傷治癒部では、COL17 の発現が抑制されることが確認された。

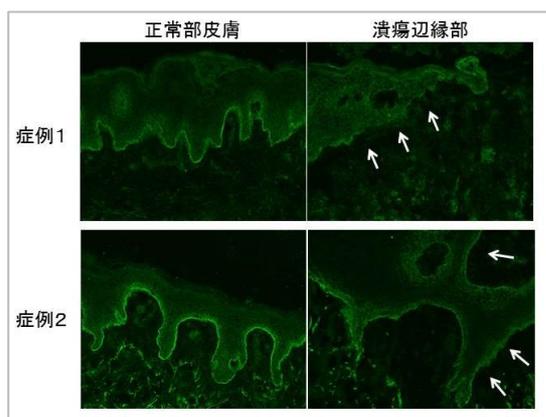


図2 健常部と潰瘍辺縁部の表皮における COL17。潰瘍辺縁の表皮では基底膜部での COL17 発現は低下している(矢印)。

(3) ラミニン 332 は表皮基底細胞の遊走を抑制する

p.R1303Q 変異をホモで有する表皮水疱症患者から培養した表皮基底細胞の ECM 分画中のラミニン 332 量が NHEK に比べ増加し

ていることを確認した後、1時間のタイムラプス観察を行った。その結果、変異を有さない NHEK に比べ、患者由来表皮基底細胞の累積遊走距離は有意に低下していた(p=0.0001)。

上記の結果から、表皮基底細胞の遊走と COL17 の発現は関連しており、創傷治癒部など表皮基底細胞が積極的に遊走しなくてはいけない状況では COL17 の発現が抑制されることが明らかになった。過去の *in vitro* の研究では、表皮基底細胞が遊走する際、COL17 の細胞外領域が切断を受けることが報告されているが(Nishie W, et al. Am J Pathol 179; 829-37, 2011)、本研究では実際の *in vivo* 皮膚創傷部において遊走している表皮基底細胞における COL17 の発現低下を確認することができた。しかし実際の創傷治癒部では ECM 部に多くの炎症性細胞が浸潤し肉芽組織上を表皮基底細胞が上皮化するため、多くのサイトカインや MMP をはじめとしたプロテアーゼが活性されていることが予想される。従って、実際に COL17 の発現自体が抑制されているのか、あるいは発現した COL17 自身の分解が促進されているかについては、今後解決すべき研究課題であると思われる。また、ラミニン 332 が ECM 中で発現亢進すると表皮基底細胞の遊走が低下した結果は、COL17 と ECM 中で相互作用する細胞外タンパクの重要性についても示唆するものである。今後の研究で、COL17 と各種 ECM タンパクとの相互作用がどのような機序で表皮基底細胞の遊走と関わっているかについても、解析されることが望まれる。

#### 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 5 件)

#### 1. 伊藤 圭 :

生物学的製剤登場以降にみられる乾癬患者の動向変化・意識変化について。

日本皮膚科学会雑誌 124: 2764-2767,  
2014.

査読有 .

2. 伊藤 圭, 飯谷麻里, 本多佐保, 西野雅彦, 佐々木真由美:

乾癬に対するインフリキシマブ投与後の結核発症例 .

Visual Dermatology 13: 270-272, 2014.

査読無 .

3. 伊藤 圭:

バイオスイッチ 11 症例を含むインフリキシマブ投与 45 例およびウステキヌマブ投与 45 例の乾癬に対する使用経験 .

皮膚病診療 36: 357-363, 2014.

査読無 .

4. Kiyohara T, Ito K.

Epidermotropic secondary extramammary Paget's disease of the glans penis from retrograde lymphatic dissemination by transitional cell carcinoma of the bladder.

J Dermatol 40; 214-5, 2013

査読有 . DOI:10.1111/1346-8138.12039.

5. 伊藤 圭, 飯谷麻里, 本多佐保, 西野雅彦, 四十坊典晴, 佐々木真由美, 小池祐史,

小林 仁:

本邦初となる乾癬に対するインフリキシマブ投与後の結核発症例 .

日本皮膚科学会雑誌 123: 3109-3116,  
2013.

査読有 . DOI:10.14924/dermatol.123.

3109

[学会発表](計 4 件)

1. 柴 景子, 伊藤 圭, 菊地一博, 堀江啓太, 村上理絵子, 三波三千男:

リウマトイド血管炎による皮膚潰瘍に対

してインフリキシマブが奏功した 1 例.

第 78 回日本皮膚科学会東部支部学術大会 .  
2014 年 10 月 4 日 - 2014 年 10 月 5 日、ホテル青森 (青森県・青森市)

2. 伊藤 圭, 伊藤 幹, 平田 悠, 堀江啓太:

膿疱性乾癬・紅皮症にウステキマブは効力を示すのか? ~ やむを得ぬ選択、適応外使用の経験を通じて ~ .

第 28 回日本乾癬学会学術大会 . 2013 年 9 月 6 日 - 2013 年 9 月 7 日、東京ドームホテル (東京都・文京区)

3. 伊藤 圭:

ウステキマブの広く高い有用性 ~ 認可 1 年半の当科使用経験を通じて ~ .

第 27 回日本乾癬学会学術大会 . 2012 年 9 月 7 日 - 2012 年 9 月 8 日、朱鷺メッセ (新潟県・新潟市)

4. 伊藤 圭:

どの生物学的製剤を選択すべきか ~ 「正解なき薬剤選択」を含めた乾癬治療戦略 ~ .

第 76 回日本皮膚科学会東部支部学術大会 .  
2012 年 9 月 29 日 - 2012 年 9 月 30 日、ロイトン札幌 (北海道・札幌市)

[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:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 圭 (ITO KEI)  
北海道大学・大学院医学研究科・客員研究  
員  
研究者番号：20421977

(2) 研究分担者

西江 渉 (NISHIE WATARU)  
北海道大学・北海道大学病院・講師  
研究者番号：20443955

(3) 研究分担者

新熊 悟 (SHINKUMA SATORU)  
北海道大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：00613788  
(H25：削除)

(3) 連携研究者

なし