

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791914

研究課題名(和文) 表皮角化細胞における  $\alpha 4$  インテグリンのエンドサイトーシスの解明

研究課題名(英文) Investigation of endocytosis of  $\beta 4$  integrin by epidermal keratinocytes

研究代表者

小澤 俊幸 (Ozawa, Toshiyuki)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50570602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円、(間接経費) 960,000 円

研究成果の概要(和文)：ヘミデスモゾームの主な分子構築は  $\alpha 6 \beta 4$  integrin及びBP180であり、シグナルトランスダクションの中心的な分子である。我々は、ヘミデスモゾーム構成蛋白の1つである  $\beta 4$  インテグリンのエンドサイトーシスの解明を4D live cell imaging法を用いて検討を行った。しかし、GFPの輝度の問題で  $\beta 4$  integrinのエンドサイトーシスは、今回の手法では観察できなかった。そこで、もう一つのヘミデスモゾームの主な構成蛋白であるBP180のエンドサイトーシスを同手法で観察した。結果、BP180のエンドサイトーシスは、macropinocytosis経路によることが判明した。

研究成果の概要(英文)：The  $\alpha 6 \beta 4$  integrin and BP180 are major components of hemidesmosomes, and are molecules with a central role in signal transduction. We investigated  $\beta 4$  integrin, a component of hemidesmosomes, to elucidate its endocytosis by the 4D live cell imaging technique. However, we could not observe endocytosis of  $\beta 4$  integrin by this technique due to problems with the brightness of GFP. Therefore, we investigated endocytosis of BP180, which is another important component of hemidesmosomes, by the same technique. As a result, macropinocytosis was found to be the method of BP180 endocytosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：形成外科学・創傷治癒学

キーワード：Hemidesmosome  $\alpha 4$  integrin リクルート リサイクル

## 1. 研究開始当初の背景

ヘミデスモゾーム構成タンパクのダイナミクス

皮膚における細胞-細胞外マトリクス相互作用は、表皮ケラチノサイトと基底膜の間で行われ、この結合はヘミデスモゾームといわれる接着機構によって行われている。ヘミデスモゾームの主な分子構築は  $\beta 4$  integrin であり、シグナルトランスダクションの中心的な分子である。ヘミデスモゾームはこれまで基底膜と表皮の強固な結合をつかさどる静的な構造であると考えられ、ダイナミックな構造とは考えられていなかった。しかし、近年我々は live cell imaging methods を用いて、少なくとも構成タンパクである  $\beta 4$  integrin は、比較的短い時間内にターンオーバーを繰り返し、ダイナミックな構造であることを証明した(Ozawa T, et al. J Invest Dermatol.2010)。

### 4D Live cell imaging

Live cell imaging とは、GFP タンパクを目的とするタンパクと融合させて発現させることにより、細胞内での局在、運動を可視化する方法である。可視化されたタンパクを分子レベルで観察することにより個々の生きた細胞において生命現象が“いつ”“どこで”“どのようなタイミング”で起こるのか解明することができる。この手法は、我々も含め近年広く用いられるが、一般に XY 平面 + timelapse で行われることが多い。しかし、今回の研究目的は XY 平面上 (仮想基底膜上) の  $\beta 4$  integrin が Z 軸方向にエンドサイトーシスされることを観察する必要があるため 4D live cell imaging (XYZ 軸 + timelapse) を行う必要がある。

画像を5分ごとに撮影後、画像ソフトで編集し 4D Live cell imaging とする。

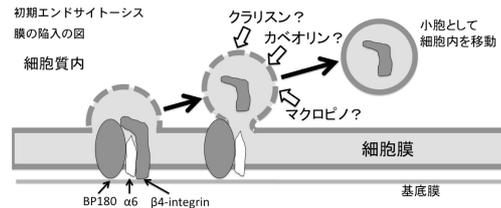
### エンドサイトーシス

エンドサイトーシスは、ほとんどの真核細胞が有するプロセスである。細胞膜がある種のタンパクと共に陥入し(クラスリン、カベオリン、マクロピノ etc) 小胞として細胞内にとりこまれた後、Rab 蛋白などと結合することにより、初期エンドソームからリサイクリングエンドソームおよび後期エンドソームに輸送され、その局在するべき細胞内小器官に正しく選別輸送される。

### $\beta 4$ integrin のダイナミクス、リクルートおよびリサイクル

我々は前述の通り、ヘミデスモゾームのダイナミクスを中心に研究を行ってきた。(平成 23 年科研費課題番号 23792050)。申請者は平成 22 年度の当助成金(課題番号 22791728)にて、紫外線による変色機能を持った  $\beta 4$  integrin plasmid (Kikume Green-Red) を作成し Live cell imaging を

行うことにより、 $\beta 4$  integrin が膜内移動を行わないでエンドサイトーシスされていることを解明し、日本形成外科基礎学術総会にて発表した。しかし、そのエンドサイトーシスの機序は未だ不明である。(下図は細胞膜に局在する  $\beta 4$ -integrin の細胞質内への陥入時の模式図を示す。)



## 2. 研究の目的

ヘミデスモゾーム構成タンパクである  $\beta 4$ -integrin のエンドサイトーシスの経路を解明することを目的とする。具体的には、GFP-  $\beta 4$ -integrin を表皮角化細胞に遺伝子導入後、運動条件および VEGF 投与下で 4D live cell imaging methods を用い細胞質内の挙動を観察する。次にエンドサイトーシスがクラスリン、カベオリン、マクロピノのいずれに依存するのかを阻害剤投与および siRNA を行い同定する。最後に、受け渡しタンパクである Rab の種類も阻害剤と siRNA を行い解明する研究計画を立案した。

NHEK 細胞に GFP-  $\beta 4$ -integrin を遺伝子導入し、基底膜から細胞質内に移動する  $\beta 4$ -integrin を 4D Live cell imaging で検討する。

その後、運動条件および VEGF 投与条件で同様に観察する。

上記の条件で、クラスリン阻害薬 (hypertonic sucrose、PAO、クロルプロマジン)、カベオリン阻害剤 (メチル- $\beta$ -シクロデキストリン、genistein、nystatin、indomethacin)、マクロピノサイトーシス阻害剤 (cytochalasin D、EIPA) を使用し、ノーマル条件と比較することにより初期のエンドサイトーシスが何に依存するのかを解明する。

次に、エンドサイトーシスされた  $\beta 4$ -integrin は Rab 蛋白と結合することが予想されるので、初期エンドソームからリサイクリングエンドソームおよび後期エンドソームに関わる Rab タンパクを同定する。現在 Rab 蛋白は 60 種類程度存在していることが報告されている。

## 3. 研究の方法

### (細胞)

正常ヒト表皮角化細胞は (Normal Human Epidermal Keratinocytes : NHEK) epidermal growth factor (50 ng/ml) および penicillin (100 U/mL) 入り keratinocyte serum-free medium で継代培養を行う。

(GFP- 4-integrin vector)

GFP- 4 integrin (Tsuruta et al.2003) は作成済みである。

(Transfectionの方法)

NHEK を Live cell imaging の際に使用する 60mm ガラススライドの上に播種し 60-70%confluent の状態にする。Transfection を行う 24 時間前に培養液を penicillin が含有されていないものに変更しておく。Lipofectamin 10 $\mu$ l と plasmid 6 $\mu$ g を GlutaMAX 培地 1ml に溶解し、NHEK の培地と交換を行う。Transfection の 6 時間後に通常培地に変換する。遺伝子導入の 48 時間後に観察を開始する。

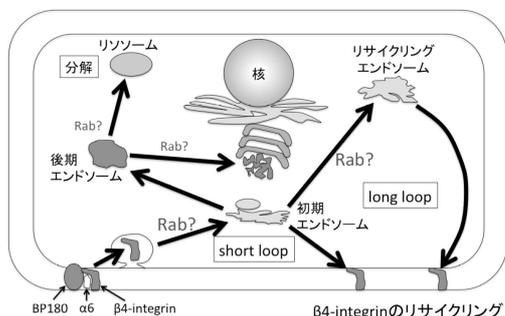
(Live cell imaging)

顕微鏡は共焦点レーザー顕微鏡 TCS SP5 を使用する。顕微鏡のステージにフィットする thermostatic chamber type FCS2 Closed Chamber System を使用して dish を 37 度にキープし、細胞を生きたまま観察する。5 分ごとに細胞のタンパク発現を撮影する。あらかじめ仮想基底膜から細胞上縁までを 0.5 $\mu$ m で連続撮影し(20-30 スライス)、SP5 に内蔵されたソフトを使用し 3D 写真を構築する。撮影された写真を Quick Time を使用し動画に加工し、エンドサイトーシスの詳細を解析・検討する。

(Invitro scrape wound assays および VEGF 投与)

NHEK は Transfection 48 時間で、ほぼ confluent 状態となっている。その dish 中央をピペット先端で scratch し、8 時間後に観察を行う。観察する細胞は、wound に接している細胞で (wound 方向の最前列の細胞) transfection の成功したものを選択する。また、NHEK がランダムに運動し、運動活性が高い状態で観察を行うために 40-50%confluent の状態で VEGF を投与し状態の観察も行う。(薬剤投与と実験)

Live cell imaging 時に通常培養液から薬剤混合培養液に交換し、様々な条件下でダイナミクスの変化を観察することによりエンドサイトーシスを解明する。



4-integrin エンドサイトーシスの shortloop. longloop に関与する Rab 蛋白の同定を目的とする。

現在 Rab 蛋白は 60 種類程度存在していることが報告されている。まず、膜タンパクのエンドサイトーシスで文献上最も有力である Rab4,5,11 との関連を、阻害剤の投与、免疫染色および Dual transfection 後の 4D live cell imaging を行い検討する。

上記以外の Rab 蛋白であれば、同様の手技を使用し Rab 蛋白の種類を同定する。

Rab 蛋白の種類が同定できれば siRNA で knockdown を行い、エンドサイトーシスが阻害されるのかを確認する。

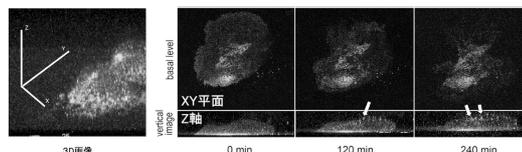
#### 4. 研究成果

我々は、前述の条件で Z 軸方向の 4 integrin の細胞質内での挙動を観察したが、GFP の輝度の問題のためと考えるが、条件を様々変更しても蛋白移動を観察することが困難であった。

そこで、ヘミデスモゾーム構成蛋白の一つである BP180 に観察する蛋白を変更した。

我々は補体の存在しない条件でケラチノサイトに GFP-BP180 を発現させ、BP-IgG を投与した際、BP180 が BP-IgG と共に細胞質内に内包化されることを Live cell imaging で細胞質内移動を観察できた。(Hiroyasu, Am J Pathol 2013. 下図 :白矢印の白いドットが内包化された GFP-BP180)。

そしてこの内包化現象は、macropinocytosis 経路によるエンドサイトーシス機構で起こることを示した。(Iwata, J Invest Dermatol 2009)と同様に細胞そのものの基底膜との接着性が低下することが解明されたことにより、BP 患者での水疱形成機構としては、BP-IgG-BP180 結合にともなう macropinocytosis による細胞接着低下と、その接着低下して離解しやすくなった部分へのタンパク分解酵素による水疱形成という機序が推測された。



今後、4 integrin のエンドサイトーシスに関しては、Live cell imaging ではなく免疫染色を軸に検討することが必要であると考える。

#### 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1件)

Hiroyasu S, Ozawa T, Kobayashi H, Ishii M, Aoyama Y, Kitajima Y, Hashimoto T, Jones

JC, Tsuruta D. Bullous pemphigoid IgG induces BP180 internalization via a macropinocytic pathway. Am J Pathol. 2012;182(3):828-40

〔学会発表〕(計1件)

Hiroyasu S, Ozawa T, Kobayashi H, Ishii M, Harada T, Aoyama Y, Kitajima Y, Hashimoto T, J Jones, Tsuruta D. Bullous pemphigoid IgG induces BP180 internalization through clathrin- and caveolin-independent endocytic pathway. 68th Annual Meeting: The Society for Investigative Dermatology. 2012.5 Raleigh

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤 俊幸 (OZAWA TOSHIYUKI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：50570602

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者