

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：17501  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2013～2014  
 課題番号：25860959  
 研究課題名(和文) エピプラキンはタイト・ジャンクションと連結するか  
  
 研究課題名(英文) Do Epiplakin connect with tight junctions?  
  
 研究代表者  
 石川 一志 (Ishikawa, Kazushi)  
  
 大分大学・医学部・助教  
  
 研究者番号：80600452  
  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：エピプラキン(EPPK)発現低下させたHeLa細胞(EPPK<sup>low</sup>HeLa)では、細胞の遊走能、増殖能を調べた。その結果、EPPK<sup>low</sup>HeLaでは、アクチンの細胞内局在が変化し、細胞接着斑の低下が見られた。ヒメンチンも、核周囲に局在する傾向が見られた。細胞運動能については運動能の亢進が認められた。増殖能については明らかな細胞増殖能の増加は認められなかった。  
 個々の細胞ではEPPKは、中間径フィラメントと相互作用をしているが、HeLa細胞塊はその細胞塊の外側に、タイト・ジャンクションの一成分であるzonula occludens(ZO)-1と共局在することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To study the function of EPPK, we developed EPPK knock-down (KD) and EPPK-overexpressing HeLa cells and analyzed cellular phenotypes and motility. Cellular motility of EPPK-KD cells was significantly elevated, but that of EPPK-overexpressing cells was obviously depressed. Many spike-like projections were observed on EPPK-KD cells, with fewer such structures on overexpressing cells. By contrast, in EPPK-KD cells, expression of E-cadherin was unchanged but vimentin fibers were thinner and sparser than in controls, and they were more concentrated at the peri-nucleus, as observed in migrating keratinocytes at wound edges in EPPK<sup>-/-</sup> mice. In Matrigel 3-D cultures, EPPK co-localized on the outer surface of cell clusters with zonula occludens-1 (ZO-1), a marker of tight junctions. Our results suggest that EPPK is associated with the machinery for cellular motility and contributes to tissue architecture via the rearrangement of intermediate filaments.

研究分野：皮膚

キーワード：エピプラキン 自己免疫性水疱症 自己抗原 プラキンファミリー分子 表皮下水疱症 タイトジャンクション 中間径フィラメント

### 1. 研究開始当初の背景

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ブラキンファミリー分子の一つであるが、その動的機能を探るべく、エピプラキン欠損マウス (EPPK<sup>-/-</sup>) を作成した。その皮膚の創傷治癒過程を電子顕微鏡で観察した結果、ケラチンの発現様式は野生型マウスと変わらなかったが、EPPK<sup>-/-</sup>では、ケラチン線維が細くなり、細胞全体にびまん性に分布する傾向を認めた。この結果、表皮細胞に機械的ストレスが加わる際、この分子はちょうど傘の骨格のようにケラチン線維を束ねて補強すると考えられた (Ishikawa, et al, J Dermatol Sci, 2010、図 1)。

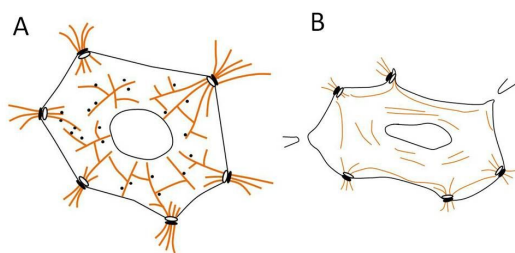


図 1 野生型マウス (A) EPPK<sup>-/-</sup> (B) のケラチン (線) と エピプラキン (点) との関係の模式図: 野生型マウスでは、エピプラキン存在下で傘の骨格のようにケラチンが束ねられ、張りめぐられるが、EPPK<sup>-/-</sup>では、それが認められない。

また EPPK<sup>-/-</sup>の創傷辺縁部の表皮細胞では、細胞の遊走が早くなることが判明していた (Goto, et al Mol Cell Biol, 2006)。

### 2. 研究の目的

エピプラキンの欠損マウスと同様に、エピプラキンの発現抑制された HeLa 細胞でも遊走促進が生じるか? 皮膚以外の他の組織でも同様に、エピプラキンの発現抑制された細胞では遊走促進が生じるか? を確認する。

EPPK 欠損時に創傷辺縁部の表皮細胞の遊走が早くなる現象は、ブラコフィリン、ブラコグロビン、プレクチンなど、デスモゾーム、ヘミデスモゾーム裏打ち蛋白質に共通の現象である。一方、エピプラキンの細胞内局在については、免疫電顕を用いても、その特徴的局在を明らかにできなかった。今回、エピプラキンは、タイト・ジャンクションとともに局在するか否かを検討する。

### 3. 研究の方法

エピプラキン発現低下させた HeLa 細胞 (EPPK<sup>low</sup>HeLa) では、細胞の遊走能、増殖能がどう変化するかを調べる。エピプラキン断片を発現させた HeLa 細胞 (EPPK<sup>trans</sup>HeLa) では、細胞の遊走能がどう変化するかを調べる。

EPPK<sup>-/-</sup>の角膜の創傷治癒過程で生じる変化を観察する。

HeLa 細胞を 3 次元培養し、その細胞塊にタイト・ジャンクションの発現の有無を観察する。

### 4. 研究成果

EPPK<sup>low</sup>HeLa では、E カドヘリンの発現量、分布などには変化が見られなかったが、アクチンの細胞内局在が変化し、細胞接着斑の低下が見られた。

細胞運動能について、微速度顕微鏡撮影装置で観察した結果、運動能の亢進が認められた。増殖能については、対照と比較して EPPK<sup>low</sup>HeLa では、明らかな細胞増殖能の増加は認められなかった (図 2)。エピプラキン断片を発現させた HeLa 細胞 (EPPK<sup>trans</sup>HeLa) では、細胞の遊走能が低下した (図 3)。

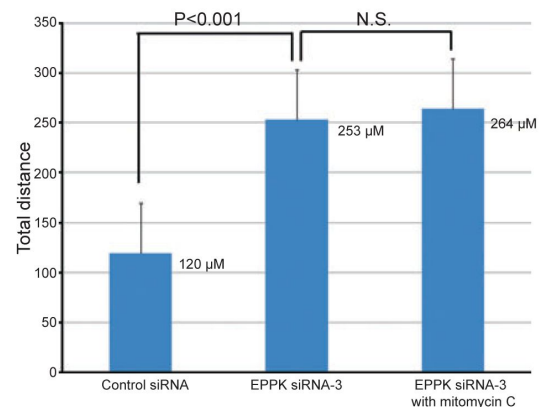


図 2 EPPK<sup>low</sup>HeLa (中央) は対照 (左) に比べて細胞運動能が亢進し、EPPK<sup>low</sup>HeLa にマイトマイシンを投与して増殖能を止めても (右) 運動能は変化しなかった。

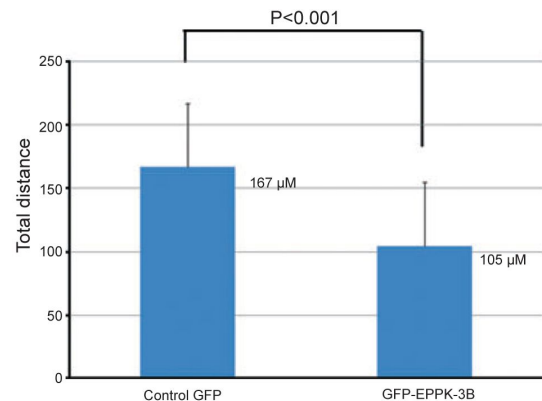


図 3 EPPK<sup>trans</sup>HeLa (右) は対照 (左) に比べて細胞運動能が低下した。

EPPKtransHeLa では、蛍光標識したエピプラキン断片が細胞突起に集積した(図4)。

ビメンチンについても、エピプラキン欠損マウスの創部表皮細胞と同様に、細胞骨格が放射状に配向せず、核周囲に局在する傾向が見られた(図5)。

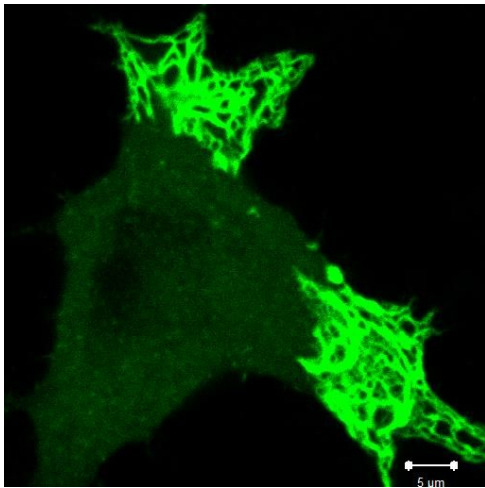


図4 EPPKtransHeLa では蛍光標識したエピプラキン断片が細胞突起に集積した。

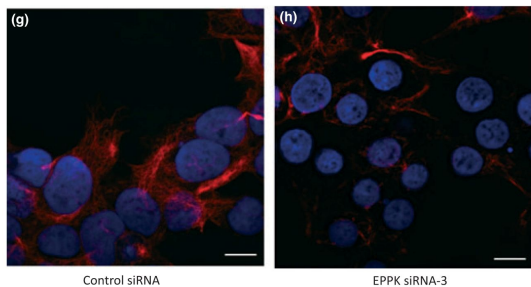


図5 EPPKlowHeLa (右) では対照(左)に比べてビメンチンが核周囲に細く配列した。

角膜との比較では、角膜では基底層に主としてエピプラキンが発現するのに対して(図6) 皮膚ではほぼ全層に発現した。またエピプラキン欠損マウスの角膜を擦過すると、野生型に比べて、角膜上皮が剥離しやすかった。このことは、エピプラキンが細胞接着にも関与することを示している。

EPPK<sup>-/-</sup>の角膜に創を作成しその治癒過程を調べると、皮膚創やEPPKlowHeLaと同様に、その遊走能は亢進した。

個々の細胞ではエピプラキンは、中間径フィラメントと相互作用をしているが、三次元培養下での内腔形成のないHeLa細胞塊では、その細胞塊の外側に、タイト・ジャンクションの成分であるzonula occludens(ZO)-1と共局在することが明らかになった(図7)。

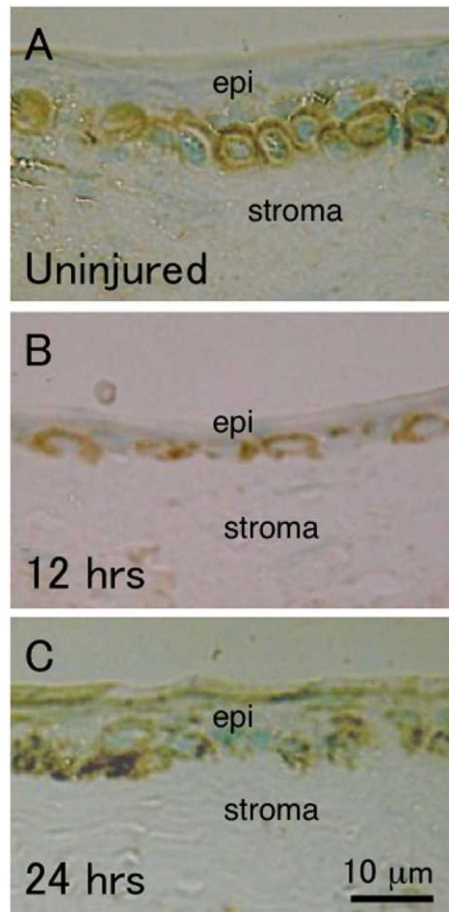


図6 EPPKは、正常の角膜では基底層およびわずかに有棘細胞に染色されたが、創部の角膜では基底層に局限して存在した。

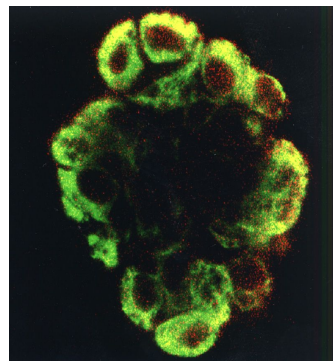


図7 三次元HeLa細胞塊でのエピプラキン(緑)とZO-1(赤)の共局在、ともに細胞塊外側に存在した。

#### 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 7 件)

Shimada H, Nambu-Niibori A, Wilson-Morifuji M, Mizuguchi S, Araki

N, Sumiyoshi H, Sato M, Mezaki Y, Senoo H, Ishikawa K, Hatano Y, Okamoto O, Fujiwara S: Epiplakin modifies the motility of the HeLa cells and accumulates at the outer surfaces of 3-D cell clusters. J Dermatol, 40(4), 249-258, 2013.

Kokado M, Okada Y, Goto M, Ishikawa K, Miyamoto T, Yamanaka O, Fujiwara S, Saika S : Increased fragility, impaired differentiation, and acceleration of migration of corneal epithelium of epiplakin-null mice. Invest Ophthalmol Vis Sci , 54(5) , 3780-3789 , 2013 .

Matsuda-Hirose H, Ishikawa K, Goto M, Hatano Y, Fujiwara S : Selective elevation of antibodies to desmoglein 1 during the transition from mucocutaneous to cutaneous type pemphigus vulgaris. Ann Dermatol, 25(2), 263-265, 2013.

石川一志, 川村碧, 甲斐宜貴, 波多野豊, 仲村郁心, 高橋健造, 上里博, 藤原作平 : 10 ヲ月の乳児の頭部に発生した隆起性皮膚線維肉腫 . 皮膚病診療 , 査読有 36(6) , 555-558 , 2014 .

橋本崇史, 宮脇美千代, 齊藤華奈実, 石川一志, 甲斐宜貴, 杉尾 賢二 : 頭皮原発血管肉腫の肺転移により続発性気胸を生じた 1 例 . 日本呼吸器外科学会雑誌 , 査読有 28(6) , 741-747 , 2014 .

Hatano Y, Ishikawa K, Koga H, Ishii N, Hashimoto T, Takeo N, Shimada H, Sakai T, Okamoto O, Fujiwara S : A case of concurrent pemphigoid vegetans and pemphigus vegetans remitted without oral corticosteroid. Br J Dermatol, 170(5), 1192-1194, 2014 .

Ito A, Shimada H, Ishikawa K, Takeo N, Hatano Y, Katagiri K, Kohno K, Araki Y, Terao T, Kojima H, Terao C, Eshima N, Fujiwara S.: Association between HLA-DRB1\*0405, -DQB1\*0401 and -DQA1\*0303 alleles and lamotrigine-induced cutaneous adverse drug reactions. A pilot case-control study from Japan. J Affect Disord. 2015;179:47-50.

〔学会発表〕(計 2 件)

伊藤亜希子, 石川一志, 島田浩光, 波多野豊, 岡本修, 藤原作平, 上原幸, 加島健司, 横山繁生, 高橋健造 :

Fibrosarcomatous transformati を伴った dermatofibrosarcoma protuberans の 1 例 . 第 113 回日本皮膚科学会総会 , 2014 年 5 月 30 日-6 月 1 日 , 国立京都国際会館 京都府京都市

伊藤亜希子, 石川一志, 甲斐宜貴, 島田浩光, 波多野豊, 岡本修, 藤原作平 : 肺転移から診断された舌原発悪性黒色腫の一例 . 第 137 回日本皮膚科学会宮崎地方会 , 2014 年 3 月 8-9 日 , シェラトングラデオーシャンリゾート 宮崎県宮崎市

〔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

6 . 研究組織

(1) 研究代表者  
石川一志 (Ishikawa Kazushi)  
大分大学・医学部・助教  
研究者番号 : 80600452

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし