

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月24日現在

機関番号：13701
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21791070
 研究課題名（和文） 天疱瘡水疱形成におけるデスモグレイン3と p120 カテニンの結合性調節分子の同定
 研究課題名（英文） Regulatory factor on binding of Desmoglein3 and p120ctn during blister formation in pemphigus
 研究代表者
 周 円（Shu En）
 岐阜大学・医学系研究科・非常勤講師
 研究者番号：60444288

研究成果の概要（和文）：

我々は天疱瘡水疱形成機序における開始シグナル伝達分子を解明することを目的とし、天疱瘡抗体刺激時の p120ctn のリン酸化を検討した。(1) DJM-1 細胞を天疱瘡抗体で刺激し、蛍光染色法を行ったが p120ctn のリン酸化は検出されなかった。(2) 正常人ケラチノサイトを天疱瘡抗体で刺激し、免疫沈降法を用いてリン酸化を検討したが、未刺激および正常人 IgG で刺激したサンプルと比較し、有意な p120ctn のリン酸化は検出されなかった。

研究成果の概要（英文）：

In order to elucidate the signal pathway of blister formation in pemphigus, we examined the phosphorylation of p120ctn in keratinocytes treated with pemphigus-IgG. (1) We performed immunofluorescence staining with DJM-1 cells treated with pemphigus-IgG, however, phospho-p120ctn were not observed. (2) We stimulated normal human keratinocytes and subjected those cells to immunoprecipitation. There are no significant differences in phosphorylation of p120ctn between untreated cells, cells treated with pemphigus and normal human IgG.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：皮膚病理学

1. 研究開始当初の背景

表皮は強靱なシート状の組織で、表皮細胞

が互いに接着構造(デスモソーム、アドヘレ

ンス・ジャンクション、タイトジャンクション)により結合し、バリア機能を保持している。天疱瘡はデスモゾームの構成成分であるデスモグレイン(Dsg)に対する自己抗体が全身の皮膚や粘膜に水疱を生じる自己免疫性水疱症である。天疱瘡の水疱形成機序に関して、これまでに様々な研究が行われてきた。我々のグループは天疱瘡 IgG が Dsg3 に結合することによって、Dsg3 のリン酸化を引き金としてシグナル伝達を誘導し(Eur J Immunol. 1999)、Dsg3 が細胞内に取り込まれて分解される結果、Dsg3 欠損デスモゾームが形成され(J Invest Dermatol. 1999)、細胞間接着力の低下により水疱を生じることを報告した(J Biol Chem. 2007; J Dermatol Sci. 2005; Arch Dermatol Res. 2007)。しかし、天疱瘡 IgG が Dsg に結合してから、Dsg 分子が細胞内に取り込まれる分子機構はまだ完全には解明されていない。

そこで、我々はアドヘレンスジャンクションの構成成分である p120—カテニン(p120ctn)という接着分子に注目した。p120ctn はアドヘレンスジャンクションに存在し、E-カドヘリンの細胞内ドメインに結合し、E-カドヘリンの機能や細胞膜表面にとどまる安定性を制御していることが明らかになってきた。最近、我々のグループで E-カドヘリンのみならず、p120ctn は Dsg3 とも複合体を形成しており、p120ctn が欠損すると膜表面に存在している遊離 Dsg3 が不安定になり、細胞内に取り込まれることを明らかにし、p120ctn が Dsg3 を細胞膜に安定発現させることに寄与していることを報告した(Exp Cell Res. 2008)。さらに、我々は天疱瘡 IgG 刺激により Dsg3 と p120ctn の結合性が低下し、Dsg3 が細胞膜から消失することを見いだしている(投稿準備中)。

アドヘレンスジャンクションにおいて、Src や Fyn などのチロシンキナーゼによって細胞内 p120ctn の異なるチロシン残基がリン酸化されると、p120ctn と RhoA (small G タンパク質ファミリーの一員)の結合がそれぞれ安定化しあるいは両者が解離することによって、RhoA の活性が調節されることが報告されている(Mol Cell Biol. 2007)。G タンパク質が細胞の接着・運動などを制御することは以前より知られており、近年、RhoA の活性が抑制されると、ケラチノサイト内のアクチン繊維が収縮し、その結果デスモグレインが細胞表面から減少することが報告されている(J Cell Biol. 2006)。

2. 研究の目的

我々は上記の知見をもとに下記の仮説を立てた。天疱瘡 IgG が Dsg に結合すると、Dsg と複合体を形成している p120ctn が Fyn, Src, PKC などのキナーゼによってリン酸化され、RhoA と解離した結果、RhoA の活性が阻害されケラチノサイト内アクチンの収縮を介して、何らかの制御系の反応によって Dsg 分子が細胞内に取り込まれる。今回の研究は、この p120ctn がリン酸化されるという水疱形成の開始シグナル伝達分子を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

<皮膚角化細胞における天疱瘡抗体刺激後の p120ctn のチロシンリン酸化部位の決定>

- 1) ヒト皮膚由来扁平上皮癌細胞株である DJM-1 細胞を天疱瘡患者あるいは正常人血清から精製した IgG で刺激し、p120ctn のチロシン残基のリン酸化特異抗体(PY96、PY228、PY280)

で標識し蛍光染色を行った。

- 2) サブコンフルエントの培養正常ヒトケラチノサイトを高カルシウムにシフトした後、天疱瘡 IgG あるいは正常人 IgG で刺激した。細胞を回収し、タンパク質を抽出した後、p120ctn の異なるチロシン残基のリン酸化を認識する抗体、またはチロシンリン酸化部位を認識する抗体 (PY20) を用いて免疫沈降法を行い、ウェスタンブロット法で p120ctn および p120ctn のチロシンリン酸化抗体で検出した。
- 3) (2)と同様の実験を低カルシウム条件でも行った。

4. 研究成果

1、サブコンフルエント状態の DJM-1 細胞を天疱瘡あるいは正常人 IgG で刺激した後に p120ctn のチロシン残基リン酸化抗体で蛍光染色を行ったところ、p120ctn は細胞間に線状の染色像を呈したが、p120ctn のリン酸化については、96、228、280 番のチロシン共に検出されなかった。

2、サブコンフルエントの正常表皮ケラチノサイトに天疱瘡(PV)あるいは正常人(H)IgG で刺激した細胞抽出物を、それぞれ①PY20 抗体を用いて免疫沈降を行い、PY96, PY228, PY280 抗体で検出した。その結果、Tyr228 に関しては、未刺激(Cont)、天疱瘡(PV)IgG 刺激、正常ヒト(H)IgG 刺激のいずれにおいても p120ctn のリン酸化抗体でバンドが検出されており、未刺激の状態でも p120ctn はリン酸化されていた。リン酸化の程度は Cont が軽度で、H および PV 刺激が同程度で、PV がより強く検出された。②一方、細胞抽出物を PY96, PY228, PY280 抗体を用いて免疫沈降を行い、p120ctn のチロシンリン酸化について PY20 抗体を用いて検出したところ、

PY228 が検出された。

3、さらに上記②の免疫沈降物を p120ctn 抗体で検出したところ、Tyr228 のリン酸化は未刺激、PV-IgG および正常 IgG 刺激のいずれのサンプルにおいても検出された。しかし、三者の間にリン酸化の程度に有意な差はなかった。

4、3で検出された Tyr228 のリン酸化は未刺激のサンプルにおいても検出され、細胞培養の際、高カルシウムへのシフトがリン酸化に影響を与える可能性が考えられたため、3と同様の実験を低カルシウム条件でも行った。しかし、リン酸化の影響が少ないと考えられる低カルシウム培養時においても、高カルシウム時よりは弱いものの Tyr228 はリン酸化されていたことから、定常的にリン酸化されていることが示唆された。

以上より、正常ヒトケラチノサイトにおいては、p120ctn の Tyr228 は定常的にリン酸化されており、天疱瘡抗体刺激でこのリン酸化がさらに増幅されることはなかった。また Tyr96、Tyr280 についても、天疱瘡抗体刺激によりリン酸化が起こらなかった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

周 円 (EN SHU)

岐阜大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：60444288

(2) 研究分担者

なし（ ）

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし（ ）

研究者番号：