

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670527

研究課題名(和文)重層上皮のみに発現する新規の細胞・細胞間接着タンパク質ANKRD35の解析

研究課題名(英文)Analysis of a protein localized at stratified epithelial cell junction

研究代表者

平子 善章(Hirako, Yoshiaki)

名古屋大学・理学研究科・講師

研究者番号：50377909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：中間径線維が結合する接着装置であるヘミデスモソームやデスモソームには、重層上皮の接着装置には存在するが単層上皮には含まれない構成タンパク質が存在する。本研究計画では、これまで知られていなかった重層上皮特異的な細胞間接着タンパク質であるANKRD35について、まず特異的なモノクローナル抗体を作製し、その特徴的な組織分布を明らかにした。さらに、ANKRD35が細胞間接着部に局在するメカニズムを分子生物学的手法を用いて解明した。

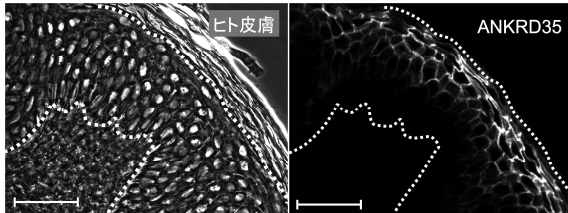
研究成果の概要(英文)：Hemidesmosomes and desmosomes in epidermis contain proteins that are not found in their counterparts in simple epithelia. In this study, we have analyzed a novel cell-cell junction protein that shows unique tissue distribution. First, we produced a monoclonal antibody specific to the protein. Using this antibody we demonstrated its differentiation-dependent expression in stratified epithelia. We further analyzed the mechanism that target the protein to cell-cell adhesion site by transient transfections of cDNA constructs encoding various mutants of the protein.

研究分野：皮膚科学

キーワード：細胞間接着 表皮分化

1. 研究開始当初の背景

私たちはこれまで、重層上皮でよく発達している接着結合であるデスモソームとヘミデスモソームの研究をおこなってきた。ケラチン線維が結合するデスモソームとヘミデスモソームには、重層上皮特異的な構成タンパク質が複数存在する。一方、私たちの知る限りアクチン系のアドヘレンスジャンクションについては、重層上皮特異的な構成タンパク質はこれまで報告されていない。そこで、既知のアドヘレンスジャンクションタンパク質やアクチン相互作用タンパク質と相同性の高い機能未知のタンパク質を Blast 検索し、さらにそのようなタンパク質の中から重層上皮組織に強い発現が認められるものを Unigene database の EST profile をもとに選出した。その結果、アクチン系の細胞間接着タンパク質であるアンキコーピンと相同性を示すタンパク質 Ankyrin repeat domain containing protein 35 (ANKRD35) を見出した。ANKRD35 に対するモノクローナル抗体を作製し、ヒト皮膚切片を免疫染色したところ表皮有棘層から顆粒層の細胞-細胞間接着部に局在が観察された(下図)。既知の細胞間接着タンパク質との二重染色の結果から、ANKRD35 はアドヘレンスジャンクションの構成タンパク質で、重層上皮特異的な分布を示すことが明らかとなった。



2. 研究の目的

重層上皮に存在するデスモソームやヘミデスモソームには特有の構成タンパク質が含まれている。これらのタンパク質は気相と液相の境界に存在し、強い力学的ストレスに曝される重層上皮の接着装置に、単層上皮の接着装置とは異なる特別な機能を付与しているものと考えられる。また、これらのタンパク質の多くは自己免疫性および遺伝性の表皮疾患の原因因子であることが知られている。ANKRD35 は機能未知のタンパク質であるが、重層上皮に特異的な分布を示す細胞間接着に関わるタンパク質と考えられる。重層上皮のもつ生理的機能を支える分子メカニズムを解明するために、私は ANKRD35 の組織分布や細胞内局在の分子メカニズムを明らかにし、さらに、ANKRD35 が組み込まれたアドヘレンスジャンクションの機能や構造、また表皮細胞の動態への影響を調べることを目的に本研究計画を遂行した。

3. 研究の方法

ANKRD35 に対するモノクローナル抗体は、ANKRD35 の C 端側コイルドコイルドメインを

抗原として作製した。ヒト ANKRD35 の全長塩基配列はヒト表皮培養細胞からクローニングした。培養細胞への遺伝子導入は effectene (QIAGEN 社) を用いたりポフェクション法を用いた。ベクターには pcDNA, pCMV, pEBMulti を使用し、安定発現株の選抜は puromycin 耐性によりおこなった。初代培養ケラチノサイトの重層化には Epi-kit (J-TEC 社) を使用した。

4. 研究成果

(1) ANKRD35 にはファミリータンパク質として UACA, アンキコーピン, ANKRD24 の3種のタンパク質が存在する。作製した ANKRD35 に対するモノクローナル抗体がこれらファミリータンパク質の大腸菌リコンビナントとは交差反応しないことを確認した後に、各種上皮組織の免疫蛍光染色をおこなった。その結果、ANKRD35 は表皮だけでなく、食道等の粘膜上皮を含む重層上皮組織に分布していることがわかった。偽重層上皮である気管上皮では分布が認められなかったが、移行上皮に分類される膀胱上皮では ANKRD35 は細胞間接着部に局在していた。一方、血管内皮や消化管上皮など調べた限りの単層上皮組織では、ANKRD35 の分布は全く検出されなかった。これらのことから、ANKRD35 は、重層上皮と移行上皮に分布するタンパク質であることが明らかとなった。

(2) 初代培養ケラチノサイトは、通常培養条件下では単層の上皮シートを形成する。このような状態のケラチノサイトでは ANKRD35 タンパク質はほとんど検出されなかった。ヒト表皮由来の培養細胞株である HaCaT 細胞でも ANKRD35 タンパク質はまったく検出されなかった。HaCaT 細胞に JNK 阻害剤を添加して培養すると、2-3 層程度に分化/重層化し、タイトジャンクションも形成するようになることが報告されている。このような条件下でも、ANKRD35 タンパク質の発現は検出されなかった。ところが、角層の分化が観察される初代培養ケラチノサイトの3次元培養系では、ANKRD35 タンパク質の産生が誘導され、重層化した表皮細胞の細胞間部に局在するのが確かめられた。これらのことから、ANKRD35 は表皮細胞の分化に伴って発現されるように厳密に制御されていることが示唆された。

(3) エピソーマルベクターである pEBMulti を用いて、ANKRD35 を安定的に発現する HaCaT 細胞株を作製した。本来、ANKRD35 タンパク質をまったく発現しない単層シート状の HaCaT 細胞においても、ANKRD35 は細胞間接着部に局在した。また、大腸がん由来の DLD-1 細胞でも ANKRD35 の安定発現株を作製したが、単層上皮細胞由来の DLD-1 細胞でも ANKRD35 は細胞間接着部に局在した。これらのことから ANKRD35 の細胞間接着部への局在には分化した重層上皮に特有の分子の存在が関わっている訳ではないことが明らかとなった。ま

た、ANKRD35 を安定発現する HaCaT 細胞は親株に比べて、より扁平な形態を示した。このことは、機序は不明ながら、ANKRD35 の発現が表皮細胞の動態に影響を及ぼし得る事を示唆している。

(4) ANKRD35 の細胞間接着部への局在に関わっている分子を明らかにするため、外因性の ANKRD35 を安定発現している HaCaT 細胞で各種のアドヘレンスジャンクション構成分子の siRNA ノックダウンをおこなった。その結果、カテニン、カテニン、プラコグロビンのノックダウンでは ANKRD35 の細胞間接着部への局在にほとんど影響は認められなかった。カテニンのノックダウンでは HaCaT 細胞の細胞間接着がほとんど失われていたが、ごく一部に観察される細胞が物理的に接している部分では ANKRD35 は接触箇所を集積していた。現在はカドヘリンなど他のアドヘレンスジャンクション関連タンパク質のノックダウン実験を引き続きおこなっている。

(5) 以上の研究成果から、ANKRD35 の細胞内局在のメカニズムの解明についてはかなりの部分が解明されたと考えられる。今後は、十分に明らかにすることができなかった ANKRD35 の機能の解明を進めるため、遺伝子改変マウスの作製を計画している。

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 10 件)

1. Li X, Qian H, Sogame R, Hirako Y, Tsuruta D, Ishii N, Koga H, Tsuchisaka A, Jin Z, Tsubota K, Fukumoto A, Sotozono C, Kinoshita S, Hashimoto T. Integrin 4 is a major target antigen in pure ocular mucous membrane pemphigoid. *Eur J Dermatol.* 2016;26(3):247-53. 査読有り

2. Hashimoto T, Hirako Y, Tsuruta D. 4 integrin in hereditary and acquired mucocutaneous diseases. *Exp Dermatol.* 2016;25(4):267-8. 査読有り

3. Li X, Tsuchisaka A, Qian H, Teye K, Ishii N, Sogame R, Harada K, Nakagomi D, Shimada S, Tateishi C, Hirako Y, Hashimoto T. Linear IgA/IgG bullous dermatosis reacts with multiple laminins and integrins. *Eur J Dermatol.* 2015;25(5):418-23. 査読有り

4. Sueki H, Sato Y, Ohtoshi S, Nakada T, Yoshimura A, Tateishi C, Borza DB, Fader W, Ghohestani RF, Hirako Y, Koga H, Ishii N, Tsuchisaka A, Qian H, Li X, Hashimoto T. A case of subepidermal blistering disease with autoantibodies to multiple laminin subunits who developed later autoantibodies to alpha-5 chain of type IV collagen associated with membranous

glomerulonephropathy. *Acta Derm Venereol.* 2015;95(7):826-9. 査読有り

5. Li X, Qian H, Takizawa M, Koga H, Tsuchisaka A, Ishii N, Hayakawa T, Ohara K, Sitaru C, Zillikens D, Sekiguchi K, Hirako Y, Hashimoto T. N-linked glycosylation on laminin 1 influences recognition of anti-laminin 1 pemphigoid autoantibodies. *J Dermatol Sci.* 2015;77(2):125-9. 査読有り

6. Li X, Qian H, Ishii N, Yamaya M, Fukuda H, Mukai H, Hirako Y, Hashimoto T. A case of concurrent antilaminin 1 pemphigoid and antilaminin-332-type mucous membrane pemphigoid. *Br J Dermatol.* 2014; 171(5): 1257-9. 査読有り

7. Yamauchi T, Matsushita S, Hashimoto T, Hirako Y. Major cleavage-dependent epitopes for linear IgA bullous dermatosis are formed at the boundary between the non-collagenous 16A and collagenous 15 domains of BP180. *J Dermatol Sci.* 2014; 76(1): 25-33. 査読有り

8. Solano-López G, Concha-Garzón MJ, Sánchez-Pérez J, Hirako Y, Li X, Ishii N, Hashimoto T, Daudén E. Pure ocular mucous membrane pemphigoid reactive with both 4 integrin and the BP180 C-terminal domain. *Br J Dermatol.* 2015;172(2):542-4. 査読有り

9. Miyamoto S, Chikazu D, Yasuda T, Enomoto A, Oh-i T, Hirako Y, Tsuchisaka A, Yasukochi A, Sogame R, Teye K, Koga H, Ishii N, Qian H, Li X, Hashimoto T. A case of oral mucous membrane pemphigoid with IgG antibodies to integrin 6 4. *Br J Dermatol.* 2014;171(6):1555-7. 査読有り

10. Hirako Y, Yonemoto Y, Yamauchi T, Nishizawa Y, Kawamoto Y, Owaribe K. Isolation of a hemidesmosome-rich fraction from a human squamous cell carcinoma cell line. *Exp Cell Res.* 2014;324(2):172-82. 査読有り

[学会発表](計 4 件)

1. 山内友恵、加茂遼太郎、平子善章、XVII 型コラーゲンを欠失した DJM-1 細胞は、I 型ヘミデスモソーム形成とラミニン 332 マトリックス沈着パターンに異常を示す、第 68 回日本細胞生物学会(京都府京都市京都メルサ) 2016 年 6 月 15-17 日
2. 平子善章、DJM-1 細胞を用いたヘミデスモソームの基礎研究、第 3 7 回水疱症研究会(福島県福島市コラッセ福島) 2015

- 年 9 月 26-27 日
3. 平子善章、山内友恵、松下知嗣、橋本隆、Major cleavage-dependent epitopes for linear IgA bullous dermatosis are formed at the boundary between the NC16A and C15 domains of BP180、第 39 回日本研究皮膚科学会学術大会 (大阪府大阪市ホテル阪急) 2014 年 12 月 12-14 日
 4. 平子善章、米元裕貴、山内友恵、西沢祐治、川本善之、尾張部克志、Preparation of the hemidesmosome-rich fraction from a human squamous cell carcinoma line DJM-1、第 66 回日本細胞生物学会大会 (奈良県奈良市奈良県新公会堂) 2014 年 6 月 11-13 日
 5. [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 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

平子 善章 (HIRAKO, Yoshiaki)
名古屋大学・大学院理学研究科・講師
研究者番号：50377909

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

西沢 佑治 (NISHIZAWA, Yuji)
中部大学・生命健康科学部・教授
研究者番号：80252229

青山 裕美 (AOYAMA, Yumi)

川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：90291393

(4) 研究協力者

岩塚友紘 (IWATSUKA, Tomohiro)
松田和久 (MATSUDA, Kazuhisa)