

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591331

研究課題名(和文) 角化細胞の分化におけるプラキン・ファミリー分子の関与：
新たな癌治療への基礎的研究研究課題名(英文) Participation of plakin family proteons in differentiation of
keratinocytes: Fundamental study to new cancer therapy

研究代表者

辛島 正志 (KARASHIMA TADASHI)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：70211175

研究成果の概要(和文)：各種皮膚がんに対する新たな治療の開発を求めて、がんを分化に導いてがんの治療をおこなうという考えに基づき、基礎的な研究をおこなった。表皮細胞がもつプラキン・タンパク質が、がん細胞の増殖を抑え、分化させる可能性を示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：A basic research had done based on the idea of leading cancer cells to the differentiation for the development of new treatment to various skin cancers and treating cancer. Plakin family protein which of the expressed in epidermal cells had the function of inhibition the proliferation of the cancer cells, and the result of suggesting the possibility of differentiating cancer cells was obtained.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究代表者の専門分野：皮膚科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：角化細胞、プラキン・ファミリー、細胞分化、細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

本研究は、プラキン・ファミリーの機能と表皮角化細胞の分化との関連性について検討おこなったものである。表皮角化細胞は「角化」という他の細胞系にはみられない特異な分化過程をたどる運命付けられた細胞である。生体内において角化細胞は表皮という構造を構成する。表皮の最外層は、角質層という強固な構造をもつ。「角化」という過程は、生体の最外壁である皮膚においての重要な防御をになうこの角質層を形成することであるともいえる。近年、角化細胞の分化過程には様々な転写因子や機能蛋白が関与していることが明らかにされ

つつある。プラキン・ファミリーは細胞内タンパクであり、ケラチンやビメンチンなどの中間径線維とデスモゾームやヘミデスモゾームの裏打ちタンパクとを連結するリンカー・タンパク質として知られてきた。以前からプラキン・ファミリーはその発現時期が表皮角化細胞の分化と密な関連があることが指摘されてきたが、プラキン・ファミリーの機能やその動的挙動と表皮角化細胞の分化との関連についての研究は未だ皆無であった。今回、私共はプラキン・ファミリーの機能・動的挙動と表皮角化細胞の分化との関係を明らかにするために、おもに培養細胞系を用いた研究をおこなった。

組み換えタンパク質を用いた系および培養細胞発現系において、プラキン・ファミリーと中間径線維との結合性についての検討をおこない、その結果、各プラキン・ファミリー・メンバーと中間径線維との結合様式に差異があることを明らかにした。さらに各プラキン・ファミリー安定発現細胞を用いた系を用いることによって、プラキン・ファミリーの各々の組み合わせた安定発現により細胞形態や分化マーカーの発現に差異が生じることを示唆する結果が得られた。

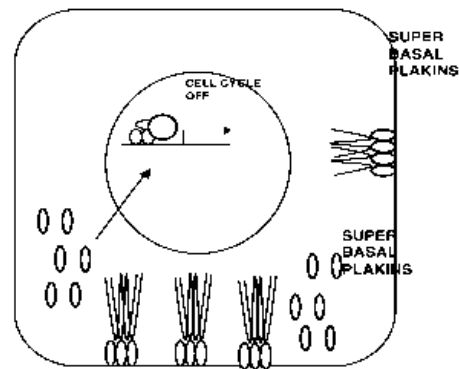
本研究によりプラキン・ファミリーの機能・動的挙動と表皮角化細胞の分化との密な関連性が示唆された。

2. 研究の目的

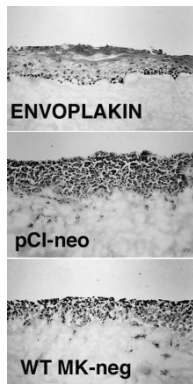
表皮角化細胞は「角化」という他の細胞系にはみられない特徴的な細胞分化過程をたどる運命付けられた細胞である。この「角化」という過程は、生体の最外壁である皮膚においての重要な防御をになう角質層を形成することがその目的のひとつでもある。また、この「角化」は、表皮角化細胞の「死」に向かう過程そのものでもある。表皮角化細胞の最終分化・角化の制御機構の詳細はいまだ不明な点が多く残されている。私共はこれまで、表皮角化細胞に強く発現しているプラキン・ファミリーのメンバーである、エンボプラキンとペリプラキンおよびBP230の細胞生物学的機能解析をおこなってきた。プラキン・ファミリーは細胞接着装置のひとつであるデスモゾーム・ヘミデスモゾームにおいて、ケラチン等の中間径線維とデスモゾーム・ヘミデスモゾームの細胞側付着斑とを結合する、リンカー的役割をもつ。また、プラキン・ファミリーには未分化細胞である表皮基底細胞または分化細胞である表皮有棘細胞それぞれに固有のファミリーメンバーが発現している。BP230やプレクチンは表皮基底細胞にのみ発現し、エンボプラキンとペリプラキンおよびデスモブラキンは表皮有棘細胞にのみ発現している。つまりプラキン・ファミリーはその現時期が表皮角化細胞の分化と密な関連があることが指摘されている。しかし、プラキン・ファミリーの機能やその動的挙動と表皮角化細胞の分化についての研究は未だ皆無である。表皮角化細胞は基底層に接着している未分化な状態ではヘミデスモゾームをもちプレクチンとBP230を発現しているが、基底膜を離れて有棘層へと分化する際、ヘミデスモゾームのプラキン・ファミリーであるプレクチンとBP230を発現停止させ、かつケラチン中間径線維との結合を解除し、分解されタンパク質としての役割を終えると考えられる。その一方で基底膜を離れて有

棘層へと分化する際、分化型ケラチンとして新たに発現してきたケラチン1、10などとデスモブラキンは新たな結合をし、表皮としての恒常性を維持している。ケラチン等中間径線維とデスモゾーム・ヘミデスモゾームの結合のいわば切り替えシステム機構の研究はなされていない。表皮角化細胞の分化機構を理解・究明するためには必要な、重要な研究であるにもかかわらず。私共はプラキントタンパク質とケラチン中間径線維との結合性や角化細胞におけるプラキントタンパク質の役割について研

究してきた (Karashima, T. and Watt, F. M.: J. Cell Biol. 2000)。有棘層型プラキントタンパク質であるエンボプラキンを未分化な表皮細胞株に強発現させると、角化が誘導された (図下)。



また、基底層型プラキントタンパク質を強制発現させることにより、表皮細胞の分化マーカーの発現が抑制された (投稿準備中)。これらの結果から私共はプラキン・ファミリーの機能・動的挙動が、表皮細胞の分化と密な関連があると考えた。基底層型/有棘層型プラキントタンパク質の発現・消失が、「角化」という分化過程の制御に関与している可能性をある。表皮角化細胞は未分化な時期、分化していく時期等、それぞれの時期・過程において、必要な分子・装置を発現させ、次の時期・過程に入る際には、不必要になるものは分解し、必要なものを発現する。プラキン・ファミリーの様に分化過程により発現を変化させるタンパク質ファミリーについてその挙動を正確にとらえることは、「表皮角化細胞の角化」という分化過程の制御機構の解明に重要な研究であり、かつ新鮮な切り口をもつ研究である。表皮角化細胞の分化過程の機構の解明により、「角化の異常」を呈する各種皮膚疾患における新たな治療法または治療薬の開発に役立つものと考えられる。また、有棘層型プラキントタンパク質を未分化な表皮細胞株に強発現させると角化が誘導されたこと



から、有棘細胞癌に対し有棘層型プラキタンパク質による分化誘導・増殖停止をねらう新たな癌の治療方法の開発にもつながる研究である(図左)。

これまでデスモゾーム・ヘミデスモゾームタンパク質のリン酸化制御機構について国内外的には研究報告は少ない。プラキン・ファミリーの

リン酸化・脱リン酸化についての詳細な機能解析の海外の施設からの報告は少なく、いまだ詳細は不明である。本研究のごとくプラキン・ファミリーのリン酸化制御機構と表皮角化細胞の分化についての報告はなく、本研究は細胞分化、癌治療の研究に新しい局面をひらく可能性を持つものである。また、本研究の基本概念である、デスモゾーム・ヘミデスモゾームタンパク質のリン酸化・脱リン酸化が中間径線維との結合のみならず表皮角化細胞の分化制御機構に関与しているという仮説をまだ間接的ではあるが立証する結果を得た。

プラキン・ファミリーは生体内においてその発現・分布が表皮角化細胞の分化程度に相関することが知られている。私共は分化した角化細胞に発現するエンボプラキンとペリプラキンを未分化な角化細胞に強制発現させると角化細胞に分化が誘導されることを見出した。未分化である表皮基底細胞に発現しているプレクチンやBP230と、分化した有棘細胞に発現するエンボプラキンとペリプラキンにおいて、その細胞生物学的な機能に差異があるはずである。本研究により各プラキン・ファミリーがそれぞれ結合しうる中間径線維の種類に違いがあることが明らかになることが予想される。またプラキン・ファミリーの核移行による遺伝子発現制御の検討により各種角化マーカータンパク質の遺伝子発現に差異がみられることが予想される。基底細胞型プラキタンパク質の核移行により、角化マーカータンパク質や有棘細胞型プラキタンパク質の発現が誘導されるであろう。これらの予想される結果により、角化細胞がその分化過程に応じて異なるタイプの中間径線維を発現する理由や分化に応じて表皮角化細胞が使用するプラキン・ファミリーが異なる理由が説明できるようになる。このことは新しい概念—細胞接着装置構成タンパク質が細胞分化機能の制御に関与している—を証明するのに重要な道標となり、細胞生物学的意義は大きい。また細胞分化機能の制御機構の解明によって、癌の分化誘導を起こす新たな治療法をもたらす可能性が

あり、その医学的意義も大きい。

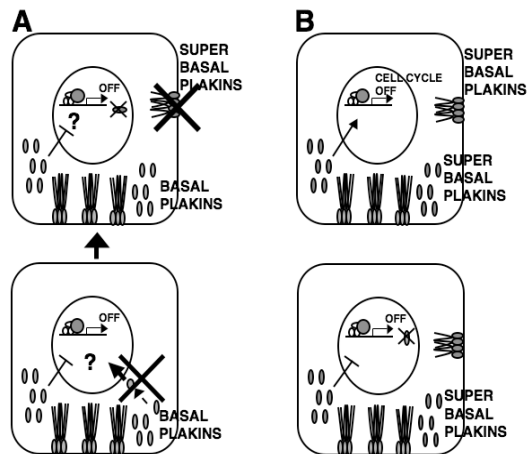
今回、私共はプラキン・ファミリーの機能・動的挙動と表皮角化細胞の分化との関係を明らかにするために、培養細胞系を用いた研究をおこない、報告した。

3. 研究の方法

申請した期間中において、具体的には以下の点について基礎的な研究をおこなった。

- 1) プラキン・ファミリーのリン酸化・脱リン酸化による中間径線維との結合制御についての検討
- 2) 細胞周期とプラキン・ファミリーのリン酸化・脱リン酸化についての検討
- 3) プラキン・ファミリー安定発現細胞株の動態と表皮角化細胞の分化についての検討。

デスモゾーム・ヘミデスモゾームタンパク質、特にプラキン・ファミリーはこれまで構造タンパクとしての解析がおもになされてきた。しかし、これらタンパク質の細胞における動的な解析は今までに全くなされていない。プラキン・ファミリーの中には核移行シグナルをもつものがあることや、その他のプラキン・ファミリータンパク質のIF結合ドメインを欠くものを細胞に発現させると核に移行することが知られている(図下)が、この意義についての研究は皆



無である。本研究では私共のいくつかの基礎的な予備実験から示唆された新しい概念、すなわちプラキン・ファミリーのリン酸化・脱リン酸化が中間径線維との結合のみならず、プラキン・ファミリーが核に移行することにより表皮角化細胞におけるその分化制御機構に関与しているという、全く新しい考えを検証することを目指した。デスモゾーム・ヘミデスモゾームタンパク質、特にプラキン・ファミリーが分化制御機構に関与しているというこの考えは私共の独創的な発想であり、かつその細胞生物学的

な意義は大きく世界的にも先駆的である。さらには皮膚疾患の病態解明・新たな治療薬の開発などのためにも重要である。

1) 細胞周期とプラキン・ファミリーのリン酸化・脱リン酸化についての検討およびプラキン・ファミリーのリン酸化・脱リン酸化による中間径線維との結合制御についての検討：

ケラチン線維は各細胞周期においてリン酸化・脱リン酸化をうけることにより、高分子構造の変化を制御している。同じくプラキン・ファミリーもリン酸化・脱リン酸化により、高次構造を変化またはその分解が制御され、ケラチン線維との結合性を調節していることと予想される。そのためにまずプラキン・ファミリーの各細胞周期におけるリン酸化・脱リン酸化を検討した。

2) プラキン・ファミリーの核移行による遺伝子発現制御についての検討：

プラキン・ファミリーの核移行ドメインの同定と、それにもなう各種角化マーカータンパク質の遺伝子発現の検討をおこなう。さらにプラキン・ファミリーの核移行ドメインに結合する核内タンパク質およびDNA配列の同定も試みた。

3) プラキン・ファミリー安定発現細胞株の動態と表皮角化細胞の分化についての検討。

蛍光標識プラキン・ファミリー恒常発現株を用いてプラキン・ファミリーの動態について観察。表皮角化細胞の分化特に基底膜を離れる際には、プラキン・ファミリータンパク質のリン酸化または脱リン酸化およびヘミデスモゾームタンパクのプラキン・ファミリーの分解が観察される。各プラキン・ファミリーの詳細な動態の変化には生細胞を用いた蛍光標識プラキン・ファミリーの局在の変化を捉えることが重要である。

4. 研究成果

1) 細胞周期とプラキン・ファミリーのリン酸化・脱リン酸化についての検討およびプラキン・ファミリーのリン酸化・脱リン酸化による中間径線維との結合制御についての検討

2) プラキン・ファミリーの核移行による遺伝子発現制御についての検討

3) プラキン・ファミリー安定発現細胞株の動態と表皮角化細胞の分化についての検討。

平成20年度

1) 細胞周期とプラキン・ファミリーのリン酸化・脱リン酸化についての検討

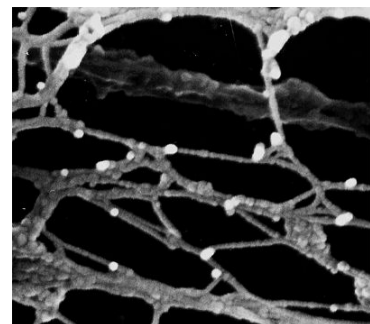
培養細胞の系での検討：各プラキン・ファミリーを一過性発現および安定性発現させたマウス正常表皮細胞株を用いた。細胞周期を同調させたのち、リン酸化・脱リン酸化についてアイソトープを用いウエスタン・プロット法など生化学的手法で検討をおこない、細胞周期ごとにリン酸化・脱リン酸化を評価した。細胞周期においてBP230のリン酸化・脱リン酸化の変化がみとめられた。細胞周期に関与したと推察されるアミノ酸配列について、変異遺伝子導入法を用いた一過性培養細胞系を用いケラチン中間径線維との結合についてのさらなる詳細な検討をおこなった。BP230、プレクチン、エンボプラキン、ペリプラキンについて、検討をおこない、細胞周期に関与したと推察されるアミノ酸配列の候補をいくつかを見いだした。また、BP230を安定発現させた細胞株を作製し、他のプラキン・ファミリーと類似の結果を得た（投稿中：参照；Karashima, T. and Watt, F.M.: Interaction of periplakin and envoplakin with intermediate filaments. : J. Cell Science 115 : 5027-5037, 2002, Karashima, T., DiColandrea, T., , Mattaa, A. and Watt, F.M.: Subcellular distribution of envoplakin and periplakin: insights into their role as precursors of the epidermal cornified envelope. J. Cell Biol. 151: 573-585, 2000)。

平成21年度

2) プラキン・ファミリーのリン酸化・脱リン酸化による中間径線維との結合制御についての検討

プラキン・ファミリーのメンバーであるヘミデスモゾーム構成成分のBP230(BPAG1)とデスモゾーム構成成分であるエンボプラキンとペリプラキンについて、リン酸化・脱リン酸化によるケラチン中間径線維との結合制御についての検討をおこなった。培養細胞の系において、一過性発現および安定性発現させた各プラキン・ファミリーについて、免疫SEMにて各プラキン・ファミリーとケラチン中間径線維との局在を調べる。すでに私共はこの方法を確立している（図下：投稿中データ）。

またアイソトープを用いた免疫沈降法により、各プラキン・ファミリーと



ケラチン中間径線維とが共沈するかどうかの検討をおこなった。各プラキン・ファミリーのリン酸化・脱リン酸化について、安定性発現させた細胞株から、各プラキン・ファミリータンパク質を精製し、キナーゼまたはフォスファターゼを用いてリン酸化・脱リン酸化させ、カラムを用いたブルダウン法など生化学的手法にてケラチン中間径線維との結合性の変化についての検討をおこなった。現在までに私共はBP230についての実験をおこなったが、BP230とケラチンタンパク質との結合は弱いか、ほとんど検出できないレベルであった。また、安定性発現させた細胞株を用いて再検討をおこなったが、同様の結果であった。そのため、BP230においては、生体内では他のアダプター・タンパク質の関与が示唆された。

3) プラキン・ファミリー安定発現細胞株の動態と表皮角化細胞の分化についての検討。

プラキン・ファミリーのメンバーであるヘミデスモゾーム構成成分のBP230 (BPAG1) とデスモゾーム構成成分であるエンボプラキンとペリプラキンについて、生細胞を用いて、蛍光標識したプラキン・ファミリーの動態の観察を経時的に記録し、検討をおこなった。培養細胞の系で生細胞を用いた共焦点蛍光顕微鏡により、GFP融合タンパクとして安定性発現させた各プラキン・ファミリーと別の蛍光標識したケラチン中間径線維との経時的観察を試みた。また、表皮角化細胞の生細胞を用いて、3次元表皮をコラーゲンゲル上に構成させ、経時的観察をおこない、表皮角化細胞の分化との関連性について検討した。これらの生細胞を用いた実験と同時に一定時間毎に固定した標本を作製し同様に蛍光抗体法にて検討し総合的な検討をした。また、さらにプラキン・ファミリーの核移行ドメインに結合する核内タンパク質およびDNA配列の同定を試みた。一過性発現または安定性発現系にて核分画を精製し、各抗プラキン抗体にてそれぞれ免疫沈降法またはクロマチン沈降法をおこない、検索をした。現在までにいくつかの既知の核内タンパク質およびDNA配列を得、現在まだ解析・検討中である。

平成21年度

2) プラキン・ファミリーのリン酸化・脱リン酸化による中間径線維との結合制御についての検討

当年度はプラキン・ファミリーのリン酸化・脱リン酸化による中間径線維との結合制御についての検討：組み換えタンパク質および精製タンパク質を用いた系での検討をおこなった。精製中間径線維タンパク質と大腸菌またはほ乳類細胞による組み換え

タンパク質を用いたタンパク・オーバーレイ法にて検討をおこなった。BP230のケラチン繊維への結合性は、上記に述べたごとく、微弱で検出できなかった。しかし、BP230のC末端の一部を用いると、ケラチン繊維との結合性を検出しえた。その結果、細胞周期間において、弱いながらも、BP230がリン酸化・脱リン酸化をうけている可能性を示唆する結果を得た。また、

プラキン・ファミリーの核移行による遺伝子発現制御についての検討をあわせておこなった。プラキン・ファミリーの核移行ドメインの同定を、一過性発現系にて同定することを試みた。Chip法の結果、角化に関連した既知の転写因子を数種、同定した。さらにおよび安定性発現系で核移行に伴い、今回同定した各種角化マーカータンパク質の遺伝子発現の検討をノーザンブロットとウエスタンブロットにて検討を試みた。しかし、抗体の交差反応や特異性などの問題があり、明瞭な結果を得るには、更なる検討が必要である。

《まとめ》

プラキン・ファミリーのメンバーであるヘミデスモゾーム構成成分のBP230 (BPAG1) とデスモゾーム構成成分であるエンボプラキンとペリプラキンについて、リン酸化・脱リン酸化によるケラチン中間径線維との結合制御についての検討をおこなった。その結果、培養細胞を用いた一過性発現および安定性発現の系において、細胞周期間において、弱いながらも、BP230がリン酸化・脱リン酸化をうけている可能性を示唆する結果を得た。つまり、わらわれの仮説の少なくとも一部は確からしいことが示唆された。確証を得るためには、さらに今後、他のプラキン・ファミリーのリン酸化・脱リン酸化について、今回と同様に安定性発現させた細胞株を用いた系で各プラキン・ファミリータンパク質のリン酸化・脱リン酸化とケラチン中間径線維との結合性の変化についての検討をおこなうことが必要と思われる。

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4件)

- ① Dainichi T, Koga H, Tsuji T, Ishii N, Ohyama B, Ueda A, Natsuaki Y, Karashima T, Nakama T, Yasumoto S, Zillikens D, Hashimoto T. From anti-p200 pemphigoid to anti-laminin gammal pemphigoid. J Dermatol 37:231-238, 2010.

- ② Ishii N, Hamada T, Dainichi T, Karashima T, Nakama T, Yasumoto S, Zillikens D, Hashimoto T. Epidermolysis bullosa acquisita: What's new? J Dermatol 37:220-230, 2010
- ③ Dainichi T, Kurono S, Ohyama B, Ishii N, Sanzen N, Hayashi M, Shimono C, Taniguchi Y, Koga H, Karashima T, Yasumoto S, Zillikens Z, Sekiguchi K, Hashimoto T. Anti-laminin gamma-1 pemphigoid. Proc Natl Acad Sci USA. 106(8):2800-2805, 2009.
- ④ 橋川恵子、寺原慶子、辛島正志、安元慎一郎、橋本隆、hypomelanosis of Ito、皮膚病診療、査読有、Vol. 31、No. 2、2009、pp. 175-178.

[学会発表] (計 4 件)

- ① Natsuaki Y, Koga H, Fukuda S, Ishii N, Dainichi T, Hamada T, Karashima T, Ishikawa T, Yasumoto S, Goto M, Fujiwara S, Hashimoto T. Anti-epiplakin autoantibodies in paraneoplastic pemphigus. The 70th annual Society for Investigative Dermatology meeting (May. 5-8, 2010, Atlanta, USA)
- ② 古賀浩嗣、石井文人、濱田尚宏、大日輝記、辛島正志、安元慎一郎、橋本隆、抗ラミニン γ 類天疱瘡の自己抗体の病原性の検討. 第13回九州基礎皮膚科研究会(2009年12月12日、福岡市)
- ③ Koga H, Ishii N, Dainichi T, Hamada T, Karashima T, Yasumoto S, Hashimoto T. development of mouse animal model for anti-laminin gamma-1 pemphigoid. The 34th Annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology(Dec. 4-6, 2009, Fukuoka)
- ④ 大島明奈、古賀浩嗣、福田俊平、大山文悟、石井文人、濱田尚宏、辛島正志、安元慎一郎、橋本隆、当科で検討した抗BP180型粘膜類天疱瘡症例のまとめ. 第31回水疱症研究会(2009年10月31日-11月1日、松山市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辛島 正志 (Karashima Tadashi)
久留米大学・医学部・講師
研究者番号: 70211175

(2) 研究分担者

橋本 隆 (Hashimoto Takashi)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号: 20129597