

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011 年度 ～ 2012 年度

課題番号：23791281

研究課題名（和文）エピプラキンは腫瘍悪性度を調節するか？

研究課題名（英文）Does Epiplakin modulate the malignant feature of tumor?

研究代表者 石川 一志 (Ishikawa Kazushi)

大分大学医学部皮膚科 助教

研究者番号：80600452

研究成果の概要（和文）：

エピプラキンを発現低下させた HeLa 細胞で、細胞の遊走能がどう変化するかを調べた。その結果、EPPK^{low}HeLa では、E カドヘリンの発現量、分布は変化せず、アクチンの細胞内局在が変化した。ビメンチンは、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。細胞運動能は亢進した。マウス・エピプラキンの C 末端側の 3 つのドメイン (GFP-EPPK-3B) を導入した HeLa 細胞では、運動能が低下した。GFP-EPPK-3B は、時間経過とともに、他の部位へ移動した。

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 by fluorescence/differential interference contrast time-lapse microscopy and immunolocalization of actin and vimentin. 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^{-/-} mice. Our results suggest that EPPK is associated with the machinery for cellular motility and contributes to tissue architecture via the rearrangement of intermediate filaments.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

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：アクチン、エピプラキン、細胞遊走、発現抑制、HeLa 細胞

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プ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^{-/-}) を作成した。そ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、エピプラキン欠損マウスでは、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、この分子は表皮細胞に機械的ストレスが加わる際、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)。

また EPPK^{-/-} や、エピプラキンの発現を低下させた HeLa 細胞 (EPPK^{low}HeLa) では、細胞の遊走が早くなることが判明し (Goto, et al Mol Cell Biol, 2006、および未発表)、細胞増殖能が増加することが示唆されている (未発表)。この遊走能・増殖能亢進は、腫瘍細胞の重要な性質の一つである。

一方ボーエン病や有棘細胞癌では、ケラチンの組成には変化がないが、トノフィラメントの発達が悪い細胞が、電子顕微鏡で観察される。これは、EPPK^{-/-} の細胞に酷似している。また基底細胞癌はケラチン 17 を発現し、エピプラキンは、これとの親和性が高い。そこで、本研究では、皮膚腫瘍におけるエピプラキンの動態を探りたい。

2. 研究の目的

エピプラキンのノックダウン時には、細胞増殖能が増すことが示唆されており、遊走能・増殖能亢進は、腫瘍細胞の特質である。したがって本研究では、皮膚腫瘍におけるエピプラキンの動態を探りたい。

い。

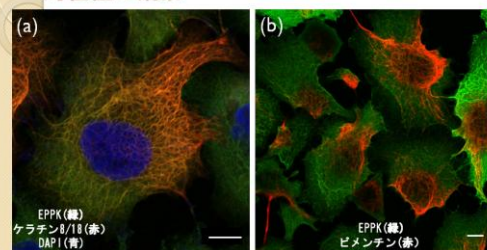
3. 研究の方法

3 種の si-RNA を用いて HeLa 細胞の EPPK をノックダウンし、ウェスタン・ブロット法及び免疫蛍光染色法により EPPK 発現の確認、細胞骨格への影響、スクラッチによる創傷モデルにおける細胞移動距離をタイムラプス法により解析した。GFP-EPPK 3B ドメイン導入細胞についても同様の検討を行った。

4. 研究成果

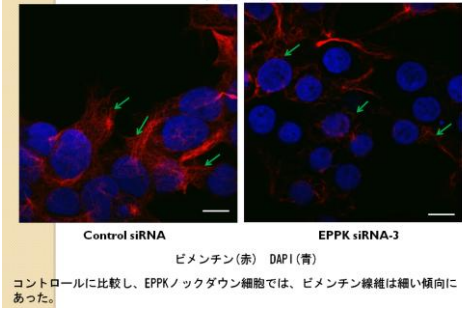
今回エピプラキン発現低下させた HeLa 細胞 (EPPK^{low}HeLa) では、細胞の遊走能、増殖能がどう変化するかを調べた。その結果、EPPK^{low}HeLa では、E カドヘリンの発現量、分布などには変化が見られなかったが、アクチンの細胞内局在が変化し、細胞接着斑の低下が見られた。下図のごとく EPPK は、ビメンチンよりむしろケラチンと局在が一致した。さらに下に示すごとくビメンチンについては、エピプラキン欠損マウスの創部表皮細胞と同様に、細胞骨格が、放射状に配向せず、核周囲に局在する傾向が見られた。

EPPK発現時における中間径フィラメントの局在性の観察

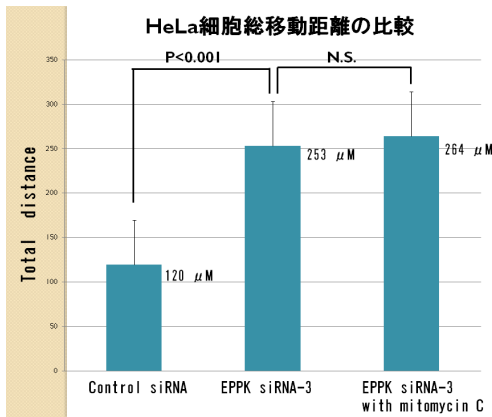


EPPKとケラチン線維はほぼ一致
EPPKとビメンチンの局在性は低い

EPPK ノックダウン細胞におけるビメンチン線維の局在、性状の変化

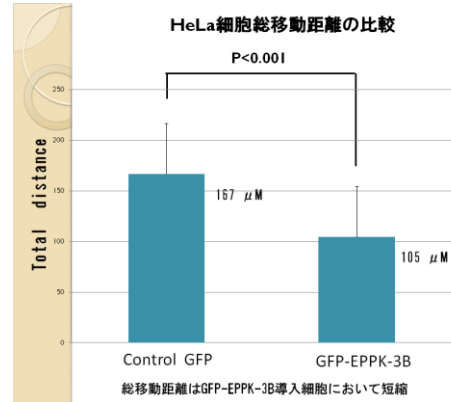


細胞運動能について、微速度顕微鏡撮影装置で観察した結果、下図のごとく運動能の亢進が認められた。



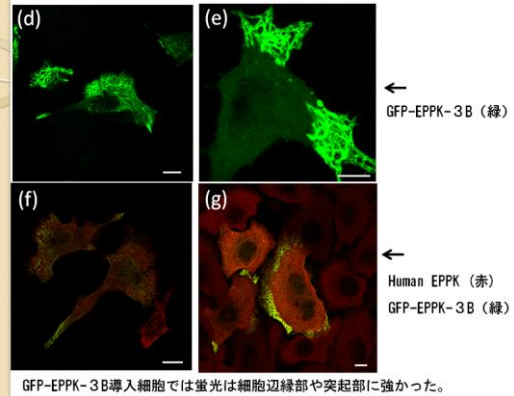
上図のごとく EPPK^{low}HeLa で、マイトマイシン処理後も移動距離に変化を認めなかったため、細胞増殖の影響はないと考えられた。増殖能については、対照と比較して EPPK^{low}HeLa では、明らかな細胞増殖能の増加は認められなかった。

マウス・エピプラキンの C 末端側の 3 つのドメイン (GFP-EPPK-3B) を導入した HeLa 細胞では、下図のごとく運動能の低下が認められた。



GFP-EPPK-3B の導入細胞では、下図のごとく GFP-EPPK-3B が細胞の辺縁あるいは細胞突起に局在し、時間経過とともに、他の部位へ移動した。

GFP-EPPK-3B導入細胞におけるGFPとEPPKの局在



このことは、細胞運動時、ケラチンとともにエピプラキンはダイナミックに移動し、おそらく細胞内シグナルを介してその情報がアクチンに伝えられ、細胞運動を調節していることが示唆された。

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 2 件)

- ① Epiplakin modifies the motility of the HeLa cells and accumulates at the outer surfaces of 3-D cell clusters.

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. J Dermatol.
2013 Apr;40(4):249-58. 査読あり

②Increased fragility, impaired
differentiation, and acceleration of
migration of corneal epithelium of
epiplakin-null mice. Kokado M, Okada Y,
Goto M, Ishikawa K, Miyamoto T, Yamanaka
O, Fujiwara S, Saika S. Invest Ophthalmol
Vis Sci. 2013 Apr 18. doi:pil:
iovs.12-11077v1.10.1167/iovs.12-11077.
査読あり

[学会発表] (計1件)

① Shimada H, Nambu-Niibori A,
Wilson-Morifuji M, Mizoguchi S, Araki
N, Sumiyoshi H, Ishikawa K, Fujiwara
S: Epiplakin modifies the cellular
motility and migration. The 36th
Annual Meeting of the Japanese
Society for Investigative
Dermatology, December 9-11, 2011,
Kyoto

[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]
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者 石川 一志
(Ishikawa Kazushi)
大分大学医学部皮膚科 助教
研究者番号: 80600452

(2) 研究分担者 なし

研究者番号:

(3) 研究協力者 藤原 作平
(Fujiwara Sakuhei)
大分大学医学部皮膚科 教授
研究者番号: 90181411

