

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792050

研究課題名(和文) 表皮角化細胞での細胞 細胞接着と細胞 細胞外マトリクス接着との動的相互作用の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the dynamic interaction with the cell - cell adhesion and the cell - extracellular matrix adhesion in the epidermal keratinocytes.

研究代表者

立石 千晴 (TATEISHI, CHIHARU)

大阪市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40597308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、表皮角化細胞における細胞 細胞接着と細胞 細胞外マトリクス接着の動的相互作用の解明を目的とする。細胞 細胞外マトリクス接着の視標にヒト正常表皮角化細胞に接着斑構成蛋白の アクチニン(CFP)プラスミドとヘミデスモソーム構成蛋白の α 4 integrin (YFP)プラスミドを遺伝子導入し、共焦点レーザー顕微鏡下に細胞を生きのまま観察(Live cell imaging)した。細胞 細胞接着阻害条件の検討中である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of our study is to examine the dynamic interaction of cell - cell adhesion and cell - extracellular matrix adhesion in the epidermal keratinocytes. We used live cell imaging method with confocal laser microscope. We made dual transfection alpha - actinin of focal adhesion protein (CFP) plasmid and beta4 integrin of hemidesmosome (YFP) plasmid in normal human epidermal keratinocytes to visualize targets of extracellular matrix adhesion. We investigated methods how to inhibit cell - cell adhesion.

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：細胞 細胞接着 細胞 細胞外マトリクス接着

1. 研究開始当初の背景

(1) Live cell imaging

Live cell imaging とは、目的とするタンパクに GFP タンパクを融合させて発現させることにより、細胞内での局在、運動を可視化する。可視化されたタンパクを分子レベルで観察することにより個々の生きた細胞において生命現象が“いつ”“どこで”“どのようなタイミング”で起こるのかを解明することができる。

(2) 細胞 細胞接着のダイナミクス

表皮角化細胞における細胞 細胞接着には、デスモゾーム、アドヘレンス結合、密着結合およびギャップ結合が存在する。今回の研究ではデスモゾームおよびアドヘレンス結合を対象に実験を行う。デスモゾームの少なくとも細胞内構成タンパクが非常にダイナミクスであることは、Godsel ら (J Cell Biol. 171:1045-59, 2005) により報告されている。

(3) 細胞 細胞外マトリクス接着 (接着斑とヘミデスモゾーム) の動的相互作用

表皮角化細胞における細胞 細胞外マトリクス接着には、接着斑 (Focal contact : FC) とヘミデスモゾーム (hemidesmosome : HD) がある。小澤らは、表皮角化細胞における2つの細胞 細胞外マトリクス接着 (接着斑およびヘミデスモゾーム) が共にダイナミックな構造であることに注目し、Live cell imaging 法を用いて両者の間に、はじめて動的相互作用があることを報告した。(Ozawa T, Tsuruta D, et al. J Invest Dermatol 130(6): 1624-35. 2010.)

(3) 細胞 細胞接着と細胞 細胞外マトリクス接着の相互作用

我々は、表皮角化細胞の細胞 細胞接着の binding partner である細胞骨格がアクチンおよびケラチンであり、これは細胞-細胞外マトリクス接着の binding partner と共通であることに注目し、両者に少なくとも細胞骨格を介した相互作用が存在すると考えた。また、アドヘレンス結合の細胞内裏打ちタンパクとしてピンキュリンおよびアクチニンがあり、また接着斑の細胞内裏打ちタンパクにもピンキュリンおよびアクチニンが存在することから、一方の接着を阻害する条件下では、これらのリサイクルが起こり相互作用すると考えた。

2. 研究の目的

表皮角化細胞における細胞 細胞接着と細胞 細胞外マトリクス接着の動的相互作用について検討することを研究目的とした。具体的には、細胞-細胞接着であるデスモゾームおよびアドヘレンス結合を阻害する条件下 (尋常性天疱瘡患者血清下、構成タンパク siRNA 下、細胞骨格阻害剤下) で、細胞-細胞外マトリクス接着である接着斑およびヘミデスモゾーム構成タンパクのダイナミクスが、どのように変化するかを共焦点レーザー顕微鏡下に Live cell imaging 法を用いて観察および解析・検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞

正常ヒト表皮角化細胞 (Normal Human Epidermal Keratinocytes : NHEK) を epidermal growth factor (50 ng/ml) および penicillin (100 U/ml) 入り keratinocyte serum-free medium で継代培養を行った。Hacat 細胞は、10% 牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum : FBS) および penicillin (100 U/ml) 入り DMEM で継代培養を行った。

(2) plasmid

接着斑の視標である CFP- actinin およびヘミデスモゾームの視標である YFP- 4 integrin を作成。

(3) Transfection の方法

NHEK を Live cell imaging の際に使用する 60mm ガラススライドの上に播種し 50-60% confluent の状態にした。遺伝子導入を行う 24 時間前に培養液を penicillin が含有されていないものに変更。Lipofectamin 10 μ l と plasmid 6 μ g を GlutaMAX 培地 1ml に溶解し、NHEK の培地と交換を行った。遺伝子導入の 6 時間後に通常培地に変換し、48 時間後に観察を開始。

(4) Live cell imaging

顕微鏡は共焦点レーザー顕微鏡 TCS SP5 を使用する。顕微鏡のステージにフィットする thermostatic chamber type FCS2 Closed Chamber System を使用して dish を 37 にキープし細胞を生きたまま観察する。5 分ごとに細胞のタンパク発現を撮影する。撮影された写真を Quick Time を使用し動画に加工し、ダイナミクスの変化を解析・検討した。

(5) 尋常性天疱瘡患者血清からの IgG 分離

当院皮膚科を受診した尋常性天疱瘡患者のうち当研究に同意をえた患者の血清を使用し、アフィニティークロマトグラフィー法により IgG を分離し使用する。

(6) 細胞 細胞接着阻害条件の検討

細胞 細胞接着を阻害する目的に尋常性天疱瘡患者血清から分離した IgG を投与し、30 分後および 24 時間後に細胞 細胞接着であるデスマゾームの構成タンパクのデスマグレイン 1、3 の発現について免疫染色法およびウエスタンブロット法を用いて検討した。

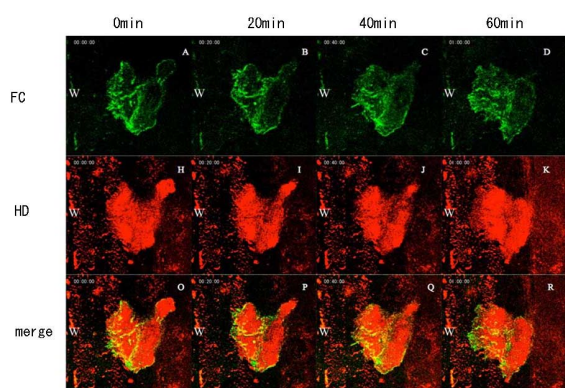
4. 研究成果

(1) live cell imaging

下図は Dual live cell imaging である。接着斑 (FC) の視標として CFP- actinin、ヘミデスマゾーム (HD) の視標として YFP-4 integrin を 1 つのケラチノサイトに遺伝子導入し、観察した。

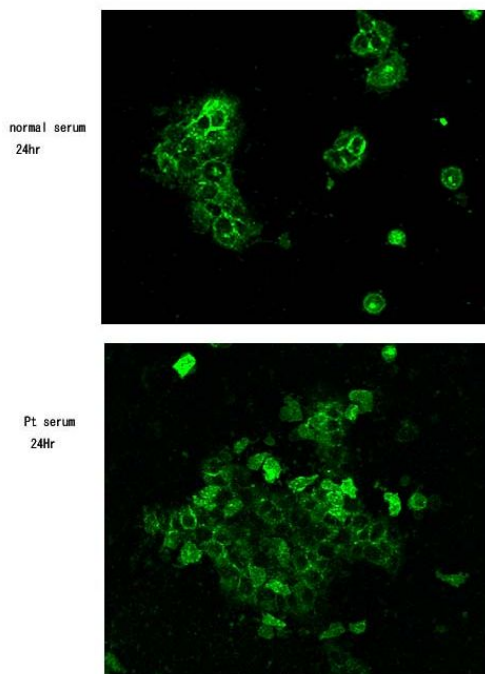
細胞は時間経過と共に右から左へと移動し、視標タンパクは assemble と disassemble していた。

上段の緑色が FC、中段の赤色が HD、下段の merge 像は、黄色で緑と赤の 2 色で表示している。



(2) 細胞 - 細胞接着阻害条件検討

図は、尋常性天疱瘡患者血清 (Pt serum) と正常血清 (normal serum) の投与 30 分後および 24 時間後に細胞免疫染色を行いデスマグレインの発現を比較した結果であるが、明らかな差異が認められなかった。また、ウエスタンブロット法を用いてデスマグレインの発現を比較検討したが明らかな有意差は認められなかった。引き続き阻害条件の検討を行っている。



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 7 件)

Itoi S, Tanemura A, Tsuji C, Kitaba S, Yokomi A, Katayama I, Tateishi C, Tsuruta D. A rare case of male bullous lupus erythematosus complicated with subsequent annular hypopigmentation. Case Rep Dermatol. 2014 Mar 19;6(1):91-7. (査読あり)

Kohata Y, Fujiwara Y, Kato K, Tanaka F, Yamagami H, Tanigawa T, Shiba M, Watanabe K, Watanabe T, Tominaga K, Tateishi C, Tsuruta D, Arakawa T. Successful treatment of betamethasone syrup on autoimmune esophagitis. Am J Gastroenterol. 2014 Mar;109(3):451-3. (査読あり)

Spatial and temporal control of laminin-332 and -511 expressions during hair morphogenesis. Imanishi H, Tsuruta D, Tateishi C, Sugawara K, Kobayashi H, Ishii M, Kishi K. Med Mol Morphol. Med Mol Morphol. 2014 Mar;47(1):38-42. (査読あり)

Sakaguchi M, Bito T, Oda Y, Kikusawa A, Nishigori C, Munetsugu T, Yokozeki H, Itotani Y, Niguma T, Tsuruta D, Tateishi C, Ishii N, Koga H, Hashimoto T. Three cases of linear IgA/IgG bullous dermatosis showing IgA and IgG reactivity with multiple antigens, particularly laminin-332. JAMA Dermatol. 2013 Nov;149(11):1308-13. (査読あり)

Majima Y, Yagi H, Tateishi C, Groth S, Schmidt E, Zillikens D, Koga H, Hashimoto T, Tokura Y. A successful treatment with ustekinumab in a case of antilaminin-1 pemphigoid associated with psoriasis. Br J Dermatol. 2013 Jun;168(6):1367-9. (査読あり)

Two cases of infantile linear immunoglobulin A/immunoglobulin G bullous dermatosis. Kanayama Y, Tsuruta D, Tateishi C, Hasegawa Y, Amo K, Fukai K, Kobayashi H, Ishii M. J Dermatol. 2012 Feb;39(2):176-8. (査読あり)

Yanagihara S, Mizuno N, Naruse A, Tateishi C, Tsuruta D, Ishii M. Linear immunoglobulin A/immunoglobulin G bullous dermatosis associated with Vogt-Koyanagi-Harada disease. J Dermatol. 2011 Aug;38(8):798-801. (査読あり)

〔学会発表〕(計 4 件)

立石 千晴, 小川 晋司, 木村 友香, 鶴田 大輔. 角層下膿疱症 (Subcorneal pustular dermatosis/SPD) 型 IgA 天疱瘡の一例. 第 64 回日本皮膚科学会中部支部学術大会. 2013.11.2-3. 名古屋国際会議場.

三和 拓人, 西村 景子, 有馬 豪, 矢上 晶子, 黒田 誠, 古賀 浩嗣, 立石 千晴, 橋本 隆, 松永 佳世子. 抗ラミニン 1(p200)類天疱瘡の 1 例. 第 112 回日本皮膚科学会総会. 2013.6.14-16. パシフィコ横浜.

橋爪 志保, 安齋 眞一, 山本 三幸, 松岡 保子, 武市 幸子, 小坂 素子, 川名 誠司, 立石 千晴, 古賀 浩嗣, 橋本 隆. 尋常性乾癬に合併した BP180C 末端抗体を有する抗ラミニン 1 類天疱瘡の 1 例. 第 76 回東京支部学術大会. 2013.2.16-17. 京王プラザホテル.

織田 好子, 末廣 尚美, 菊澤 亜夕子, 坂口 正展, 尾藤 利憲, 立石 千晴, 古賀 浩嗣, 橋本 隆, 錦織 千佳子. 7 型コラーゲンとラミニン 332 を含む多様な自己抗体を形成した線状 IgA/IgG 水疱性皮膚症の 1 例. 第 111 回日本皮膚科学会総会. 2012.6.1-3. 国立京都国際会館.

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立石 千晴 (TATEICHI, CHIHARU)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：40597308

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者なし