

令和元年6月17日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：26861505

研究課題名(和文) プロテオーム解析によるENaCが関わる創傷治癒因子の同定

研究課題名(英文) Identification of wound healing factors involving ENaC by proteomic analysis

研究代表者

青葉 香代 (Aoba, Kayo)

埼玉医科大学・医学部・助手

研究者番号：90468380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はプロテオーム解析によりENaCが関わる創傷治癒促進因子の同定を目指したものである。幼生両生類皮膚を形態的にも機能的にも成体型皮膚に分化誘導できる条件下で器官培養し、表皮から蛋白質を抽出した。抽出蛋白質について、プロテオーム解析を行ったところ、複数の発現差異のある蛋白質スポットを特定し、発現差異のある蛋白質を質量分析装置で同定した。同定した蛋白質の中で、炎症調節やシグナル伝達に関わるAnnexin-A1に対する抗体を作成し、発達段階における発現及び局在を明らかにした。また、ENaC活性化の有無で、創傷治癒過程での創面積変化の比較を行ったが、この実験系では有意差は確認されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ENaCの役割は上皮におけるNa再吸収、また味覚細胞における塩味知覚、尿細管における血圧の調節、浸透圧調節などが知られている。しかし細胞分化、組織構築、創傷治癒に対するENaCの寄与についての詳細は明らかではない。本研究課題は、ENaCの頂側への局在のメカニズムを研究し、創傷治癒に結びつけようと試みた。

研究成果の概要(英文)：This study aims to identify promoting factors of wound healing involving ENaC by proteomic analysis. Larval skin of bullfrog were cultured under conditions either induced larval-type skin or adult-type skin both morphologically and functionally, and proteins were extracted from each epidermis. Several protein spots with differential expression under those cultural conditions were identified by proteomic analysis of the extracted protein and examined by mass spectrometry. Among the identified proteins, Annexin-A1, relevant to regulation of inflammation and signal transduction, was selected and antibody against it was purified. We revealed expression pattern of the Annexin-A1 depending on developmental stages. In addition, we compared the size of wound area in the wound healing process between activated and blocked ENaC conditions, no significant difference was observed in the current experimental conditions.

研究分野：生理学

キーワード：両生類 創傷治癒

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

両生類から哺乳類にいたるまで、成体表皮を横切る電位差(皮膚電位)が発生している。この電位差は表皮の幹細胞である基底細胞が分裂し、分裂娘細胞が有棘細胞、顆粒細胞へと頂側に向かって最終分化していく過程で発生し、創傷治癒における cell migration に役をはたすと考えられている。この皮膚電位は Amiloride (ENaC 阻害剤) で阻害されるので、この皮膚電位の発生には ENaC (上皮 Na チャネル) が関わりと示唆されている。

幼体表皮は基底細胞、ステイン細胞、アピカル細胞からなる。幼体表皮にも表皮を横切る電位差が発生しているが、成体表皮と異なり非選択性 cation channel (NSCC) という機能分子が関わる。この電位差が損傷治癒に関わるか否かは不明である。

我々はこれまでに、両生類幼体表皮における ENaC の局在と機能の関係を免疫電顕等により調べ(Fujimaki-Aoba K et al., Acta histchemica 2013) 幼体表皮において mRNA の発現があるのにもかかわらず、ENaC 機能(Na 再吸収)の発現がないのは細胞質小胞に ENaC タンパクが留まっているからであることを示唆した。また、発生学的にも局在を調べた。(Fujimaki-Aoba K et al., Cell tissue Res.2014)。さらに in situ hybridization: ISH で、ENaC の mRNA の局在も調べた。(Kaneko Y, Fujimaki-Aoba K et al., Acta histchemica 2012) ENaC の主要な機能は上皮における Na の再吸収であるが、上皮の損傷治癒にも関わることが最近分かってきた。しかし、その詳細は明らかでない。

2. 研究の目的

ENaC の主な機能は Na の再吸収であるが、上皮の損傷治癒にも関わることが最近分かってきた。しかし、その詳細は明らかでない。本研究はプロテオーム解析により ENaC (上皮 Na チャネル) が関わる損傷治癒促進因子を同定し、その機能評価を行うことで、創傷治癒メカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 抗体特異的な幼生皮膚蛋白質のプロテオーム解析

幼生皮膚蛋白質を抽出し共沈物質も含め、抗体特異的なタンパク質を得るため、ENaC 抗体で免疫沈降し、ゲルにアプライし、二次元電気泳動を行った。別に泳動した同サンプルゲルについて、ENaC 抗体で Western Blotting を行い、ENaC の spot の位置を確かめた。免疫沈降後のゲル、および免疫沈降無のゲルを高感度 CBB で染色し、免疫沈降後の染色ゲルから複数 spot を切り出し、ゲル消化を行い、質量分析装置で解析した。

(2) 成体形質の発現時に変化するタンパク質のプロテオーム解析

ウシガエル幼生皮膚(TK. stage10-15)を2種の培養条件(Aldosterone (Ald), Ald+Prolactin (PRL))で器官培養した。幼生皮膚を切り出し、EDTA で処理すると、アピカル細胞は取り除かれ、基底層のみの皮膚が作成できる。作成した皮膚に対し、RPMI-1640 に加え、Aldosterone (Ald) のみ、または Aldosterone (Ald) +Prolactin (PRL) を添加し、25、5%CO₂ 下で11日間培養した。この条件で培養を行うと、Ald のみでは成体型表皮が、Ald + PRL では幼生型表皮が分化する。(Takada et al., AJP, 268: C218, 1995; Takada et al., AJP, 271: C1059, 1996; Takada and Kasai, JEB, 206: 1137, 2003)複数回培養を行い、表皮をかきとり、タンパク質を抽出した。数枚のゲルの二次元電気泳動を行い、各誘導条件での二次元電気泳動ゲルのディファレンシャル解析を行い、発現差異のある蛋白質スポットを特定した。発現差異のある蛋白質を質量分析装置で解析し、同定した。プロテオーム解析は以下の条件で行った。

サンプル前処理/皮膚培養後表皮をかきとり抽出

電気泳動条件/等電点電気泳動: Immobiline DryStrip pH3-10NL 13cm (GE 社製)

染色方法/Framingo 染色 (Bio-rad) /画像取得: Typhoon 9410 (GE 社製)

ゲルディファレンシャル解析/解析ソフト: ImageMaster 2D Platinum (GE 社製)

質量分析 MALDI-MS/MS 解析 /AXIMA-QIT(島津製作所社製)

(3) 同定したタンパク質の幼生皮膚、成体皮膚における発現確認

複数同定したタンパク質の中から Annexin-A1 に着目し、抗体を作成した。幼生皮膚と成体皮膚を用い、免疫組織化学的解析を行った。また、幼生皮膚と成体皮膚から、コレステロールやスフィンゴ脂質、GPI アンカータンパク質およびパルミトイル化タンパク質が濃縮する細胞膜構造である脂質ラフト分画と非ラフト分画に分けて抽出し Western blotting で発現解析を行った。

(4) 創閉鎖実験

成体皮膚に Ald を作用させると ENaC の発現量が増えることがわかっており、創傷治癒に対する ENaC の関与を調べるために以下の条件で実験した。

成体ウシガエル皮膚 切り出した皮膚を皮膚トレパンデルマパンチで 6mm-punch 後 2mm-punch し培養に使用した。

Aldosterone、または Ald+Amiloride (ENaC 阻害剤) または 5%Frog serum を添加しながら 25、5%CO₂ 下で培養した。

時系列で実体顕微鏡での写真を撮影し、Image J で画像解析、創閉鎖 Area を測定した。

4. 研究成果

(1) 抗体特異的な幼生皮膚蛋白質のプロテオーム解析

ウシガエル幼生 (TK, Stage10-15) の表皮、成体表皮をかきとり、タンパク質を抽出し、の二次元電気泳動、 ENaC 抗体での免疫沈降後二次元電気泳動を行った。免疫沈降で成体表皮、幼生表皮ともに ENaC 抗体特異的な spot が確認された。(図 1) 別に泳動した同サンプルゲルについて、Western Blotting を行い、ENaC が確かに存在していることを確かめてから、免疫沈降後のゲルから切り出し、質量分析を行ったが、ENaC が同定できなかった。予備実験から、ENaC を強制発現させた HEKcell の泳動からの ENaC の同定はできることから、ENaC は存在するものの、免疫沈降の精度、あるいは質量分析の検出感度の問題で検出できなかった可能性がある。

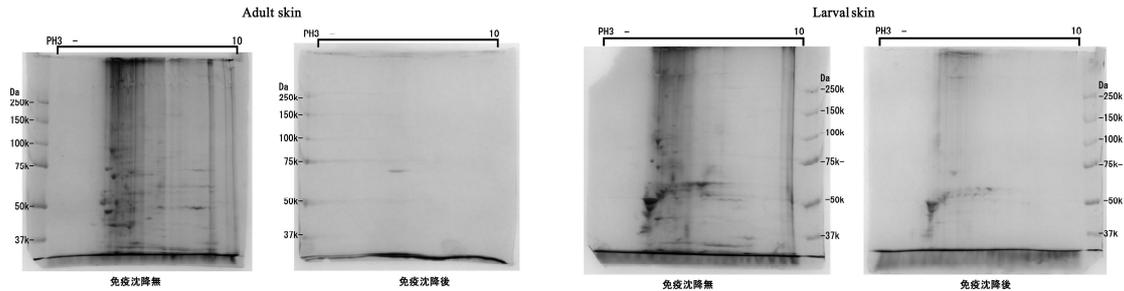


図 1. ウシガエル成体皮膚、幼生皮膚の 2 次元電気泳動像 (免疫沈降有無)

(2) 成体形質の発現時に変化する蛋白質のプロテオーム解析

2 種の誘導条件下で器官培養し、タンパク質を抽出した。抽出タンパク質について、複数回 2 次元電気泳動し、各誘導条件で 2 群間でのディファレンシャル解析を行ったところ、複数の発現差異のある蛋白質スポットを特定した。これらの発現差異のある蛋白質を質量分析装置で同定した。同定したタンパク質は beta-enolase isoform X2、Annexin A1 などであった。

(3) 同定したタンパク質の幼生皮膚、成体皮膚における発現確認

同定したタンパク質の中から炎症調節やシグナル伝達など様々な機能をもつ Annexin-A1 に着目し、抗体を作成した。作成した抗体を用い免疫組織化学的に発現解析を行い、さらに、脂質ラフト分画と非ラフト分画に分けて抽出し Western blotting で発現解析を行い、次のような結果を得た。Annexin-A1 と ENaC は幼生の皮膚では、表皮の最上層のアピカル細胞の頂側に発現していた。さらに、Annexin-A1 は脂質ラフトでの発現が多く確認された。成体化に伴い、表皮の基底層を除く細胞の細胞境界に存在し、脂質ラフト以外にも発現してくることが確認された。(図 2,3)

幼生皮膚の ENaC は細胞膜直下の小胞に貯蔵されており、ENaC 活性がないが、成体皮膚の ENaC は細胞膜に局在し、活性を有する (Fujimaki-Aoba K et al., Acta histchemica 2013)。ENaC 活性は細胞膜脂質ラフトで活性を修飾され、膜に局在するという報告もある。幼生皮膚では、免疫組織化学での ENaC と Annexin-A1 の発現パターンは非常に近似していた。成体皮膚では Annexin-A1 の方が表皮のより下層から発現していた。ENaC が膜に局在するプロセスに Annexin-A1 関与している可能性の検証をするために今後は共局在の解析および、さらに微細構造での局在をみるため免疫電顕法での解析を進めていく。

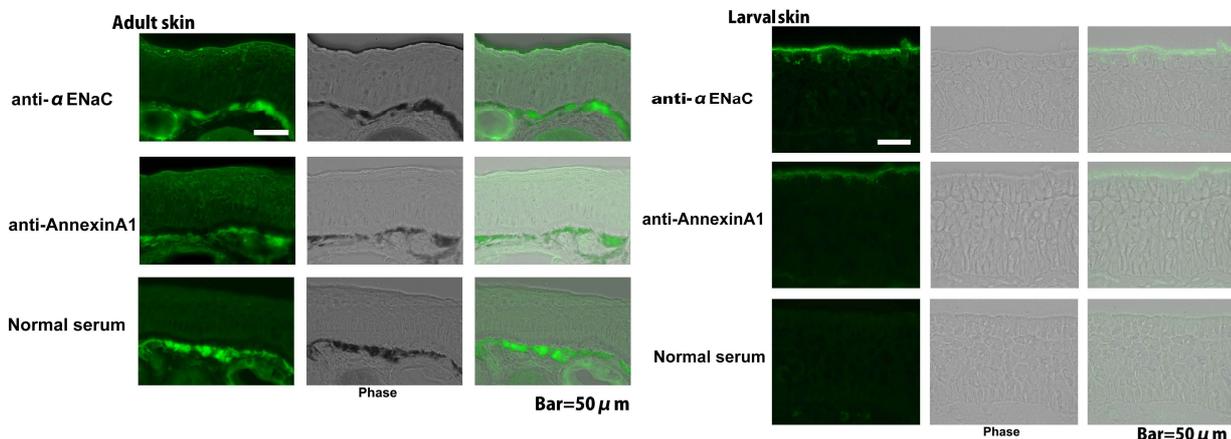


図 2. 免疫組織化学 (幼生表皮、成体表皮)

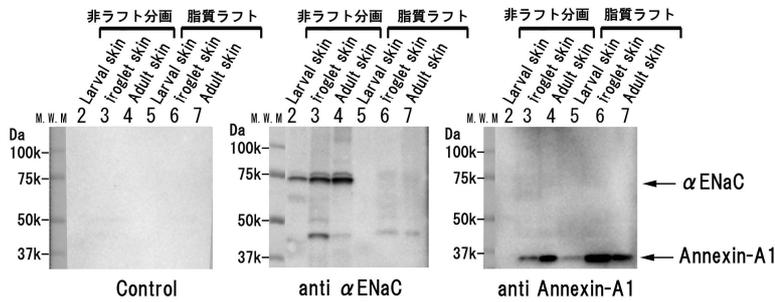


図 3.脂質ラフト分画における成体皮膚、幼生皮膚での発現 (Western blotting)

(4) 創閉鎖実験

表皮基底細胞のみの幼生皮膚に Ald を作用させると成体型皮膚が分化し、ENaC 活性をもつ。さらに、成体皮膚に Ald を作用させると ENaC の発現量および、膜への局在時間が増えることがわかっており、創傷治癒に対する ENaC の関与を調べるため、切り出した Adult 皮膚に、創傷後 Ald 添加、Ald+Am (ENaC 阻害剤) 添加で実験したが、有意な差は確認されなかった。ウシガエル血清添加では有意に創閉鎖面積が増大した。カエル血清中に創傷治癒を促進する物質が含まれていることが示唆されたがそれは少なくとも Ald ではないと考えられた。(図 4)

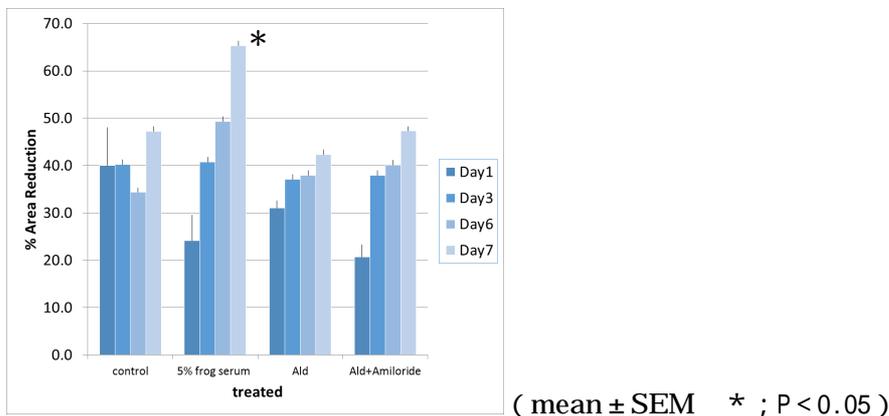


図 4.創閉鎖実験

これらの成果については国内学会で報告を行った。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

青葉香代、高田真理. ウシガエル皮膚における成体形質の発現時に変化する物質の同定. 日本動物学会関東支部 第 71 回大会 (2019)

Rie Suge, Kayo Fujimaki-Aoba, Makoto Takada. Evaluation of activity of amiloride-blockable epithelial Na⁺ channel in cement glands by hanging behavior in young bullfrog tadpoles. The 95th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2018)

Rie Suge, Kayo Fujimaki-Aoba, Makoto Takada. Expression and function of amiloride-blockable epithelial Na⁺ channel in cement glands on hanging behavior in young *Xenopus laevis* tadpoles. The 94th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2017)

Rie Suge, Kayo Fujimaki-Aoba, Makoto Takada. Function of amiloride-blockable epithelial Na⁺ channel on hanging behavior in young tadpoles of *Xenopus laevis* and Bullfrog. The 93th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2016)

Yuko Kaneko, Kayo Fujimaki-Aoba, Syuichi Watanabe. Expression Pattern of voltage-gated sodium channel in dopaminergic amacrine cells. The 93th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (2016)

〔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)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：高田 真理

ローマ字氏名：(TAKADA, MAKOTO)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。