

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第443号	氏名	石川 一志
審査委員会委員	主査氏名	熊本俊秀 	
	副査氏名	久保田直治 	
	副査氏名	奈須家菜 	
論文題名 Epiplakin accelerates the lateral organization of keratin filaments during wound Healing (創傷治癒過程においてエピプラキンはケラチン線維の側方会合を促進する) 論文掲載誌名 Journal of Dermatological Science 2010; 60: 95-104. 論文要旨 エピプラキンは、細胞骨格結合蛋白であるプラキンファミリーに属し、共著者の1人であるFujiwaraらにより、自己免疫性表皮水疱症の自己抗原として同定された分子である。EPPKは、表皮細胞内に存在し、中間径フィラメントであるケラチンと結合する。しかし、EPPKの機能、とりわけ創傷治癒過程における機能は明らかではない。EPPKノックアウトマウスでは、創傷治癒過程で表皮細胞の移動速度が増加し、創傷治癒が早くなることから、EPPK欠損は、創傷治癒過程でケラチン・ネットワークの破綻を起こすのではないかとという仮説の下に、EPPK欠損および野生型マウスを用いて免疫組織化学（蛍光抗体、免疫電顕）および電顕による検索を行った。 その結果、創傷のない野生型マウスのEPPKは主に基底上部層の表皮細胞の細胞質にケラチン10と共存した。創傷4日目の野生型マウスの表皮細胞では、EPPKは創先端にはみられず、有棘層を中心に発現し、ケラチン5, 6, 10, 17と共に存在し、特にケラチン17でより著しかった。EPPK^{-/-}マウスでも同様の発現パターンを認めた。しかし、ケラチン線維の直径および電子密度は、野生型に比べ、EPPK^{-/-}マウスで有意に減少し、多数の細い線維を認めた。デスメゾームにも細いケラチン線維を認めた。これは創傷6, 8, 10日目でも同様であった。EPPK^{-/-}マウスの表皮細胞のサイズは創傷6日目には、野生型に比べ縮小した。創傷4日目の免疫電顕では、野生型の表皮細胞では、EPPKはケラチン5, 6, 10の周囲に発現し、これらのケラチンの重合に関与していると考えられた。 以上の結果から、EPPKは創傷治癒過程の表皮細胞におけるケラチンの会合を促進することが示唆され、創傷などの機械的ストレスの下では、その治癒過程においてケラチンネットワークの強化に関与し、表皮細胞の移動に影響を与えることが推察された。 本研究は、患者皮膚から同定されたEPPK分子の機能と病理学的意義を明らかにした点において意義のある研究であり、審査員の合議により学位論文に値するものと判断した。			

学 位 論 文 要 旨

氏名 石川 一志

論 文 題 目

Epiplakin accelerates the lateral organization of keratin filaments during wound healing(創傷治癒過程においてエピプラキンはケラチン線維の側方会合を促進する)

要 旨

(緒言) エピプラキンはプラキンファミリーと呼ばれる細胞内分子群に属しており、水疱性類天疱瘡抗原1 (BPAG1) やプレクチンのような他のプラキンファミリー分子に類似した構造をとる。in vitro では、プラキンリピート・ドメインと呼ばれる構造で、中間径フィラメントであるケラチンと結合すると考えられている。一方エピプラキン欠損マウスでは、創傷治癒過程で表皮細胞の移動速度が増し、創傷治癒が早くなることが示された。そこで今回、エピプラキン欠損および野生型マウスを用いて、創傷治癒過程における形態学的変化の比較検討を行った。

(方法) 野生型とエピプラキン欠損マウスの背部に皮膚欠損を作成し、共焦点レーザー顕微鏡、透過型電子顕微鏡、および二重免疫染色を用いた電子顕微鏡観察を行い、エピプラキンとケラチン線維の関係を形態学的に観察した。

(結果) 創傷のない正常の表皮細胞ではケラチン線維、デスモソーム、ヘミデスモソームに明らかな差はなく、ケラチンの発現パターンにも明らかな差は認めなかった。二重免疫電顕ではエピプラキンはケ

ラチン 10 と共に発現していた。創傷 4 日目の野生型マウス表皮細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、エピプラキンは創の先端には発現しておらず、有棘層を中心に発現しており、ケラチン 5、6、10、および 17 と共に発現し、特にケラチン 17 と局在が一致していた。欠損型マウスの創ではケラチンの発現パターンは野生型と比較して大差はなかった。しかし電子顕微鏡にてケラチンの存在様式を比較すると明らかな違いを認めた。野生型マウスの 4 日目の創の表皮細胞では細胞質の染色が濃く、核周囲に太いケラチン線維を認め、デスモソームに太いケラチンの刺入を認めた。細胞間の空隙も比較的規則的であった。一方欠損型では細胞質が全体的に淡く染色され、強拡大でも太いケラチン線維を認めず、デスモソームにも細いケラチン線維を認めた。これらの所見は創傷 6、8、10 日目でも同様であった。野生型ではケラチンは創傷 4 日目、6 日目と太くなり、それ以降徐々に細くなり、通常の表皮細胞の太さに戻ることが観察されたが、欠損型マウスでは、一貫して細いケラチン線維が認められた。さらに二重免疫電顕にて創傷 4 日目の野生型の表皮細胞では、エピプラキンはケラチン 10 以外にも、ケラチン 5、6 の近傍にも存在しており、ケラチン 5、6、10 との相互作用が考えられた。

(考察) 創傷治癒過程では、表皮細胞でのケラチンの発現パターンは劇的に変化するが、野生型とエピプラキン欠損マウスを比較すると、ケラチンの発現パターンは創傷時に差異がなく、エピプラキンはケラチンの発現には影響を与えないと考えられた。野生型マウスの電顕観察では、創辺縁で増殖する表皮細胞の核周囲に太いケラチン線維を認め、デスモソームへ連続していた。エピプラキン欠損マウスでは太いケラチン線維を認めなかった。創傷 6 日目はケラチン線維が最も太くなる時期で、それにより細胞の弾性を増加させ、剪断応力に対する抵抗性を増加させていると考えられる。同時期のエピプラキン欠損細胞は断面積が有意に小さくなるが、太いケラチン線維を形成できない為、応力に抗しきれず細胞が小さくなるのではないかと考えた。

通常の表皮有棘層ではケラチン 1/10 が二量体を形成するが、創辺縁の表皮細胞ではケラチン 6/16、および 6/17 の発現を認め、これらの線維が太いケラチン線維を構成すると考えられている。二重免疫電顕ではエピプラキンはケラチン 5、6、10 の周囲に発現しており、エピプラキンはこれらのケラチンの重合に関与していると考えられた。

(結語) 今回の実験では、エピプラキンは *in vivo* において、創傷治癒過程の表皮細胞で、ケラチンの側方会合を促進することが明らかになった。このことによって、エピプラキンは創傷治癒過程において表皮細胞の移動に影響を与えることが推察された。