




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 号	氏 名	島田 浩光
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	藤 谷 長 久	
	副査氏名	横 山 繁 生	
	副査氏名	伊 奈 啓 輔	

論文題目

Epiplakin modifies the motility of the HeLa cells and accumulates at the outer surfaces of three-dimensional cell clusters. (エピプラキンはHeLa細胞の遊走性を変化させ、三次元培養下での細胞集塊の外側面に集積する)

論文掲載雑誌名

The Journal of Dermatology (in print)

論文要旨

【背景】エピプラキンは細胞骨格結合蛋白のプラキンファミリーの一員で、EPPK ノックアウトマウスに作製した創傷は野生型やヘテロ型に比べ治癒速度が速い傾向にあり、同マウス表皮細胞のケラチン線維は細い傾向にあることが示されていた。

【目的】本研究では細胞培養系での創傷治癒モデルを用い、治癒過程における EPPK の関与について、またケラチンやアクチンなど細胞骨格分子と EPPK との関連性について検討した。

【材料と方法】HeLa 細胞を用いた in vitro の実験であり、EPPK の機能を明らかにするため、EPPK 遺伝子ノックダウン (KD) HeLa 細胞と GFP 遺伝子結合 EPPK 遺伝子過剰発現 HeLa 細胞を作製した。GFP-EPPK 導入細胞では EPPK の B ドメインを 1ヶ所のみ導入 (GFP-EPPK-1B) と 3ヶ所導入 (GFP-EPPK-3B) したものの 2種を作製した。そして EPPK の細胞骨格への影響、創傷モデルでの細胞移動度を解析した。またマトリゲル内で三次元培養を行い、細胞集塊での EPPK の局在分布を調べた。解析方法としてウエスタンブロット法、共焦点レーザー顕微鏡による局在及び形態観察、蛍光染色微速度撮影装置を使用したスクラッチ法などを用いた。

【結果】①EPPK-KD HeLa 細胞：ウエスタン・ブロット法や免疫蛍光染色法で確認した結果、優位に EPPK の発現を低下させた。また、スクラッチ法で細胞移動距離が優位に延長したことを確認したが、マイトマイシン C 添加で移動距離に変化は認めなかった。アクチン線維は細胞膜付近に突起状に観察された。②GFP-EPPK 遺伝子導入細胞：GFP-EPPK-3B 細胞では蛍光 (EPPK) は細胞質に網目様構造として認められ、その分布はケラチンと殆ど一致した。スクラッチ法で細胞移動距離の短縮が観察されたが、個々の細胞を経時的に観察すると GFP (EPPK) の細胞質内局在が変化した。また、アクチン線維は細胞膜付近で伸長して観察された。両細胞をウエスタン・ブロット法で測定した結果、両者間に E-カドヘリンやアクチン蛋白の発現量に差を認めなかった。③三次元培養：EPPK は細胞集塊の外側部に存在し、その発現は密着結合マーカーである ZO-1 と細胞質内における局在が一致していた。集塊内部の細胞にはアクチン、ビメンチン、サイトケラチンの発現が認められた。一方、半接着斑タンパクである BP230 は集塊周囲の EPPK と共存するとともに集塊内部の細胞にも認められた。

【結論】EPPK の発現の多寡は細胞遊走能に影響を与えることが in vitro でも示された。EPPK はビメンチンよりケラチンや ZO-1 との相互作用が強いことも示され、細胞遊走時 EPPK の分布は動的に変化することも明らかになった。

本研究は、EPPK が細胞の移動と関係し、中間径フィラメントを介した細胞の再構築を介して移動や組織構築に関与していることを示した新しい知見を報告したものであり、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。

最終試験
の結果の要旨
学力の確認

審査区分 (課)・論	第 号	氏 名	島 田 浩 光
審 査 委 員 会 委 員		主査氏名	藤 谷 美 久 (藤谷印)
		副査氏名	横 山 繁 生 (横山印)
		副査氏名	伊 奈 啓 輔 (伊奈印)
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. エピプラキン (EPPK) に対する抗体作製方法について。 2. シャーレ上のスクラッチは培養系の創傷治癒モデルとしてよく使われるのか。 3. 有意差を出してあるデータは何回行った結果なのか。 4. EPPK の細胞内の移動が細胞の進行方向に一致しているとのことであるが、ムービーで確かめているのか。 5. EPPK を過剰発現させる時、B ドメインを1あるいは3個導入しているが、4とか5個ではどうか。 6. 細胞の欠損部が被覆されるには、細胞の遊走能だけではなく、増殖能も関係すると思われるが、EPPK が増殖に関わる事はないのか。 7. Fig 6, 7 で示されている細胞の各々の比率に関する記載がないが。 8. 3次元培養では細胞集塊のどちらが基底側になるのか。また、集塊中央の細胞に EPPK は全く発現しないのか。 9. 細胞の進行方向に lamellipodia は出現しなかったのか。 10. 顕微鏡写真の倍率について。 11. HeLa 細胞を Matrigel で培養した場合の cluster 形成過程について。 12. 上皮性の HeLa 細胞にビメンチンが発現する理由は何か。 13. EPPK ノックダウン細胞では創傷の治癒が早いですが、EPPK 発現は創傷治癒の点で不利益になるのか。 14. 内因性と外因性の EPPK の細胞内分布の違いは何を意味しているのか。 15. Matrigel を使った3次元培養で ZO-1 を発現しているが、tight junction 形成を TEM で確認しているのか。 16. 3次元培養で細胞凝集の外側に ZO-1 が発現しているがそれでよいのか。Matrigel の接触面と関係があるのではないのか。 17. EPPK を過剰発現させるとアクチンに対し stress fiber を形成させるとのことだが、migration で stress fiber は細胞牽引の作用を有すると言われている。EPPK 導入は migration を抑制するとなると、どういうことになるのか。 18. EPPK がケラチンとアクチンに作用しているが、まとめるとどういうことになるのか。 19. EPPK 阻害剤を創傷治癒の治療薬として使える可能性はあるのか。 <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 島田 浩光

論 文 題 目

Epiplakin modifies the motility of the HeLa cells and accumulates at the outer surfaces of three-dimensional cell clusters.

(エピプラキンは HeLa 細胞の遊走能を変化させ、三次元培養下での細胞集塊の外側面に集積する)

.....

.....

要 旨

緒言: エピプラキン (EPPK) は、1992 年自己免疫性水疱症患者の自己抗原として同定された推定分子量 450 kDa の蛋白質で、中間径フィラメント架橋蛋白質であるプラキン・ファミリー蛋白質に属する。エピプラキンの構造としては、他のプラキン・ファミリー蛋白質と異なり、デスモブラキン I の B ドメインに相当するドメインがヒトでは 13 個、マウスでは 16 個直列に配列しており、その間はリンカーで接続されている。EPPK ノックアウトマウスの背部皮膚に創傷を作成した場合、治癒速度は、野生型あるいはヘテロ型に比べて若干速い傾向にあり、その表皮細胞のケラチン線維は細い傾向にあった。In vitro でのスロットブロットアッセイにより、ケラチン、ビメンチン、デスミンなどと相互作用しうることも示されていた。

目的：本研究では、細胞培養系での創傷治癒モデルにおけるエピプラキンの関与について、またケラチンやアクチンなどの細胞骨格分子とエピプラキンとの関連性についての検討を行った。

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。また、EPPK の細胞集塊での局在分布を調べるために、マトリゲル内で三次元培養を行った。

結果：EPPK si-RNA (標的配列：ヒト EPPK4832-4856) は 100 nM において、ウェスタンブロット法及び免疫蛍光染色法において優位に EPPK の発現低下を認めた。スクラッチ法では対照に比し EPPK ノックダウン細胞では、優位に細胞移動距離が延長した。細胞増殖による創閉鎖の影響を除外するため、マイトマイシン C を加えたが、細胞移動距離の変化は認めなかった。GFP を融合させた EPPK 3B ドメインを導入した細胞では、蛍光は網目状に観察され、ケラチンと走行が一致した。スクラッチ法では、対照に比し、細胞移動距離の短縮が観察されたが、経時的に個々の細胞を観察したところ、GFP は局在部位が変化した。ファロイジン染色では、アクチン線維は EPPK ノックダウン細胞で細胞膜付近に突起状に観察されたが、EPPK 3B ドメイン導入細胞では伸張して観察された。E-カドヘリンやアクチンの蛋白発現量にウェスタンブロット法では差は認めなかった。また三次元培養では、EPPK は細胞集塊の外側面に存在し、内部には発現は認めなかった。タイトジャンクションのマーカである ZO (zonula occludens) -1 と最も局在が一致していた。

考察：ケラチン 6a,6b やプレクチン、プラコフィリン、プラコグロビンといったケラチン結合蛋白質の発現低下はいずれも細胞遊走を亢進させることが知られている。また近年、ケラチン 6 は Src と結合し、そのキナーゼ活性を負の制御し、創傷治癒における表皮角化細胞の移動能力を阻害するということが証明されている。さらに、MEK-ERK シグナルによるケラチン 8 のリン酸化は上皮腫瘍細胞の遊走を高めるということも報告されている。以上のことから EPPK は中間径フィラメントのリン酸化に寄与し、Src を含む接着斑に関わる分子の結合を変化させている可能性がある。

結論：EPPK の発現の多寡は細胞遊走能に影響を与えることが *in vitro* でも示された。EPPK はビメンチンよりケラチンとの相互作用が強いことも示された。細胞遊走時、EPPK 分布は動的に変化する事も明らかとなった。