

学 位 論 文 の 要 旨

学 位 の 種 類	博 士	氏 名	吉 田 雅 紀
学 位 論 文 題 目			
ATP2C1 is specifically localized in the basal layer of normal epidermis and its depletion triggers keratinocyte differentiation			
ゴルジ体 Ca/Mn ATPase(ATP2C1)の表皮基底層への局在と、その発現抑制による表皮細胞の分化誘導に関する研究			
共 著 者 名 山崎 和生、大保 貴嗣、飯塚 一、鈴木 裕			
Journal of Dermatological Science 印刷中			
研 究 目 的			
ATP2C1 はゴルジ体に存在する Ca/Mn ATPase であり、その遺伝子異常は表皮の棘融解を主症状とする皮膚疾患 Hailey-Hailey 病の原因となる。この蛋白質はゴルジ体の Ca 蓄積の 7 割を担い、Mn を蓄積する唯一の蛋白質である。そのため ATP2C1 の活性不全は様々な細胞機能異常につながると想像されるが、現時点ではこの蛋白質の局在や表皮細胞機能に対する役割など基本的な情報はほとんど明らかではない。そのため本報告では、この蛋白質の表皮内の局在及びこの蛋白質の発現と表皮細胞分化とのかかわりについて検討した。			
材 料 ・ 方 法			
(1) 組織染色 ヒト成人男性背部 (25-45 歳) 6 名より 3 mm のトレパンを用いてバイオプシーをおこない樹脂内に包埋し、未固定の凍結ブロックを作成した。常法に基づき 5 μ m の凍結切片を作成し、10 分間のアセトン固定あるいは 4% PFA 固定後、ATP2C1, involucrin, および K10 keratin について蛍光免疫組織染色をおこない蛍光顕微鏡により観察した。			
(2) アデノウイルス構築 BLOCK-IT U6 RNAi entry vector に特異的配列を導入して shRNA 発現ベクターを作成した。更に該当領域を PL adenovirus destiny vector (Invitrogen) にクローニングし、アデノウイルス DNA を構築した。これを L293 細胞に遺伝子導入し、約 2 週間後に、感染により融解した細胞の培養上清を回収してアデノウイルス液とした。			
(3) 表皮細胞の分化誘導およびアデノウイルス感染 ヒト正常表皮細胞を 6cm コラーゲンコート dish に継代培地 (MCDB153, 1 ng/ml EGF, 5 μ g/ml insulin, 500 ng/ml hydrocortisone, 50 ng/ml ethanolamine, 500 ng/ml of phosphoethanolamine) で播種、2-3 割コンフルエントの状態のアデノウイルス含有培養上清を m.o.i=10 になるよう混合して (約 10 倍希釈) 5 時間処理した。培地を継代培地に交換して一晚培養後、再び培地交換し 72 時間後に細胞を回収した。さらに培養する場合は 1 日おきに培地交換した。 Ca による細胞分化誘導は 1 mM MCa を継代培地に添加し培養することによりおこなった。浮遊培養に関しては、培養細胞をトリプシン処理後 4 x 10 ⁵ cells/ml の濃度で			

1.2% methyl cellulose を含有した継代培地に懸濁し培養した。

(4) mRNA の抽出および RT-PCR

トータル RNA を RNAeasy mini prep kit (QIAGEN) により抽出し、各サンプル 1 μ g のトータル RNA に対して ReverTra Ace- α kit (TOYOBO) を用いて cDNA を形成した。形成された cDNA を適宜希釈後、SYBR Green Fast Kit 溶液中(Roche)に特異的 primer Set と混合し、real time PCR (Roche Light Cycler S350)にて各遺伝子発現量を決定した。

成 績

(1) ATP2C1 の表皮内局在

ATP2C1 は表皮基底層に特異的に染色された。さらに、他の ATP2C1 特異的抗体によっても染色が同様に観察されたこと、および、ATP2C1 染色は抗原ペプチドの同時添加によって阻害されたことから ATP2C1 が表皮基底層に特異的に発現していることが明らかとなった。

(2) 表皮細胞分化誘導の ATP2C1 発現に与える影響

表皮細胞の分化は Ca 処理や、浮遊培養によるインテグリンシグナルの遮断によって引き起こされることがわかっている。これらの方法を用いて ATP2C1 の発現に対する影響を調べたところ発現低下は見られず、組織染色の結果を説明できる結果は得られなかった。

(3) ATP2C1 のノックアウトによる表皮細胞分化誘導

上記のように人工的な分化誘導は ATP2C1 の発現低下を引き起こさず、表皮基底層特異的 ATP2C1 発現を説明できなかつたことから、逆に ATP2C1 の消失によって分化誘導の引き金が引かれる可能性について検討した。アデノウイルス導入で shRNA を発現させ RNAi により ATP2C1 遺伝子をノックアウトしたところ、感染 3 日目に顕著な K10 ケラチンの発現上昇が観察され、更に 5 日目にはインボルクリンの発現も上昇した。このことから ATP2C1 の発現低下が表皮細胞の分化を引き起こすことが明らかとなった。

(4) Mn イオノフォアによる表皮細胞分化誘導

ATP2C1 はゴルジ体の Ca/Mn ポンプであることから、ゴルジ体内の Ca あるいは Mn の蓄積の低下が表皮細胞の分化を誘導したと想像される。そこでイオノフォアを用いて検討したところ、Mn 選択性の高い Br-A23187 を用いた時のみに ATP2C1 のノックアウトと同様の K10 ケラチンの発現上昇が認められた。従って ATP2C1 による Mn の蓄積が表皮細胞を未分化の状態に留めるのに非常に重要な役割を果たしていることが示唆された。

考 案

ATP2C1 は表皮の基底層のみに局在し、この蛋白質の発現低下により分化マーカーである K10 ケラチンが誘導された。このことから、ATP2C1 は表皮細胞の分化、未分化の状態を決定づける蛋白質であることが明らかとなった。また、この調節におけるゴルジ体内の Mn 蓄積の関与がイオノフォアの実験より示唆された。表皮細胞の分化抑制には基底膜成分と細胞表面のインテグリンの結合が必須であり、浮遊培養では K10 ケラチンが短時間で誘導される。インテグリンの機能には submillimoler オーダーの Mn が必要であることがインテグリン蛋白の研究で報告されていることから、ATP2C1 によるゴルジ体内への Mn 蓄積がインテグリンの活性に必須である可能性が本研究で示唆された。表皮細胞分化調節への関与が想定されている p63 などの転写因子が ATP2C1 の発現を調節していると考えると、基底層表皮細胞の分化についてほぼ全体の説明が可能なることから、本研究の成果により表皮の分化誘導調節機構の解明が進むことが期待される。

また、今回の結果は、Hailey-Hailey病における棘融解発症位置では、もともと

正常皮膚でも ATP2C1 は発現していないことを示した。Hailey-Hailey 病については ATP2C1 の蛋白機能不全だけでなく、外環境など複合要因が伴って発症にいたる可能性が示唆される。

結 論

ATP2C1 の発現低下が表皮における表皮細胞分化開始の引き金であることがわかった。またその働きはゴルジ内の Mn 蓄積を介していることが示唆された。

引 用 文 献

- 1) Hu Z, Bonifas JM, Beech J *et al.*: Mutations in ATP2C1 encoding a calcium pump, cause Hailey-Hailey disease. *Nature Genetics*, 24: 61-65, 2000
- 2) Hotchin NA, Gandarillas A, Watt FM.: Regulation of Cell Surface β 1 Integrin Levels during Keratinocyte Terminal Differentiation. *The Journal of Cell Biology*, 128: 1209-1219, 1995
- 3) Baneres J, Roquet FC, Martin AL, Parello J: A Minimized Human Integrin α 5 β 1 That Retains Ligand Recognition. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 5888-5903, 2000.

参 考 論 文

- 1) Watt FM, Kubler M-D, Hotchin NA, Nicholson LJ, Adams JC: Regulation of keratinocyte terminal differentiation by integrin-extracellular matrix interactions *Journal of Cell Science*, 106:175-182, 1993
- 2) Erdahl WL, Chapman CJ, Wang E, Taylor RW, Pfeiffer DR: Ionophore 4-BrA23187 Transports Zn²⁺ and Mn²⁺ with High Selectivity Over Ca²⁺. *Biochemistry*, 35: 13817-13825,1996.
- 3) Van Baelen K, Vanoevelen J, Callewaert G *et al.*: The contribution of SPCA1 Ca²⁺ pump to the Ca²⁺ accumulation in the Golgi Apparatus of HeLa cells assessed via RNA mediated interference. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 306: 430-436, 2003.
- 4)Leitinger B, McDowall A, Stanley P, Hogg N: The regulation of integrin function by Ca²⁺. *Biochimica Biophysica Acta*, 1498: 91-98, 2000
- 5) Hidehiko Baba, Masaki Yoshida, Tomohiro Yokota, Hideyo Uchiwa, Shinichi Watanabe: Human epidermal basal cell responses to ultraviolet-B differ according to their location in the undulating epidermis. *J Dermatol Sci* 38, 41-46, 2005

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	吉 田 雅 紀
審査委員長 吉 田 成 孝 ㊞ 審査委員 飯 塚 一 ㊞ 審査委員 鈴 木 裕 ㊞			
学 位 論 文 題 目 ATP2C1 is specifically localized in the basal layer of normal epidermis and its depletion triggers keratinocyte differentiation (ゴルジ体 Ca/Mn ATPase(ATP2C1)の表皮基底層への局在と、その発現抑制による表皮細胞の分化誘導に関する研究)			
本論文の概要 本論文は Golgi 装置の Ca/Mn ATPase の機能と表皮の分化との関連を細胞生物学的に検討したものである。			
研究方法の適切性 本論文の研究材料はヒトの皮膚およびケラチノサイトの初代培養である。また、培養細胞にアデノウイルスを用いて ShRNA の導入も行った。これらの組織と細胞を用い、免疫ブロッティング法によるタンパク質発現解析および定量的リアルタイム RT-PCR 法による RNA 発現解析を行った。いずれの方法も確立されたもので、また統計処理も適切に行われている。			

新規性

以前に得られていた本研究に関連する主な知見は次の通りである：(1) Ca/Mn ポンプである ATP2C1 はケラチノサイトのゴルジ装置に豊富に存在する事。(2) ケラチノサイトの分化には Ca^{2+} イオン濃度の上昇とインテグリンのはたらきが重要である事。本論文ではこれらの知見を以下のように発展させた：(1) ATP2C1 は未分化の表皮基底層に特異的に発現する。(2) ケラチノサイトの分化によって ATP2C1 発現は変化しない。(3) ATP2C1 発現抑制によりケラチノサイトが分化する。(4) Mn 選択性が高いイオノフォアにより、ケラチノサイト分化が促進された。以上の様に本論文によりケラチノサイトの分化に Mn^{2+} イオンの大きな関与があると示唆する重要な知見が得られた。

科学的小よび医学的意義

先天性および後天性の皮膚疾患の多くは表皮角化の異常によるものが多い。ATP2C1 も角化細胞の分化異常である Hailey-Hailey 病の原因遺伝子である。本論文は表皮分化が Ca^{2+} の直接作用であるとの定説に修正をもたらす可能性があり、医学的意義は非常に大きい。 Mn^{2+} 特異的キレーターなどによる新たな研究の展開に期待したい。

論文の構成

本論文は適切に考察され構成も適当である。

論文提出者に対して本論文および関連領域に関する試問を行い、これに対して適切な応答が得られた。ゆえに博士として十分な学力を有することが示された。

以上より、本審査委員会は本論文を学位論文として適切なものであると判断した。