

氏名 (本籍)	松岡 百合子 (岐阜県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	乙第 1303 号
学位授与日付	平成 14 年 3 月 20 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	Transient translocation of hemidesmosomal bullous pemphigoid antigen 1 from cytosol to membrane fractions by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate treatment and $Ca^{2+}$ -switch in a human carcinoma cell line
審査委員	(主査) 教授 北 島 康 雄 (副査) 教授 高 橋 優 三      教授 近 藤 直 実

### 論文内容の要旨

表皮においてヘミデスモソームは基底細胞と基底膜を結びつける重要な役割を担っている。ヘミデスモソームを構成する主な分子として、 $\alpha 6 \beta 4$  インテグリン、180kDa 類天疱瘡抗原 (BPAG2)、230kDa 類天疱瘡抗原 (BPAG1)、HD1/プレクチン等が挙げられる。表皮の創傷治癒の際、これらヘミデスモソームを構成する分子が、分解と形成を繰り返し、その結果、水平方向へと移動していくと推測される。また、癌細胞の転移の過程においても、ヘミデスモソームが深く関与していると考えられる。今回、human squamous carcinoma cell line (DJM-1) を用い、12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) を添加、または培養  $Ca^{2+}$  濃度を低濃度から正常濃度にスイッチアップさせ、プロテインキナーゼ C を活性化することによって、ヘミデスモソームの構成要素の 1 つである BPAG1 の細胞内における分布の変化を免疫プロット法と免疫蛍光抗体法により検討した。

### 材料及び方法

BPAG1 に対するモノクローナル抗体としては mAb-A17 を、培養細胞としては human squamous carcinoma cell line (DJM-1) を用いた。

培地に TPA 添加 (50 ng/ml)、または  $Ca^{2+}$  濃度をスイッチアップ低 (0.07 mM) → 正 (1.87 mM) させた後、PBS 可溶性画分 (細胞質画分)、Triton X-100 可溶性画分 (膜画分)、Triton X-100 不溶性画分 (細胞骨格画分) とに分けた試料と、細胞全体のホモジェネートに関して、免疫プロット法を行い、検討した。これらの処理に対する反応が PKC の活性化あるいは蛋白合成に起因しているかを確認するために、それぞれ H7 (PKC の選択的阻害剤) 40  $\mu$ M を 30 分間前処理と cyclohexamide (蛋白合成阻害剤) 70  $\mu$ M を 30 分間前処理を行った。さらに、TPA 添加における BPAG1 の細胞内分布の変化に関しては、免疫蛍光抗体法を用い、形態学的にも検討した。

### 結果と考察

低  $Ca^{2+}$  濃度での DJM-1 細胞では、BPAG1 は細胞質画分、膜画分、細胞骨格画分いずれにも検出されたが、正  $Ca^{2+}$  濃度では細胞質画分と細胞骨格画分だけにしか検出されなかった。正  $Ca^{2+}$  濃度での培養細胞を TPA 処理すると 10 分で、BPAG1 は細胞質画分から膜画分へと完全に移動した。この変化は H7 によって阻害された。更に、TPA 処理後、30 分から 4 時間後、BPAG1 は細胞骨格画分でのみ検出された。免疫蛍光抗体法による形態学的観察では、TPA 処理によって、BPAG1 は細胞質から明らかに減少し、細胞接着部分に線状パターンを示した。一方、低から正  $Ca^{2+}$  濃度にスイッチアップさせると、4 時間後、BPAG1 は細胞質画分でも、膜画分でも明らかに増加した。この反応は H7 や cyclohexamide によって、阻害された。

これらの結果より、TPA添加やCa<sup>2+</sup>濃度のスイッチアップによるBPAG1の膜画分の増加はPKC活性を介するものであるということが推測される。

細胞全体では、TPA処理後4時間までBPAG1は漸減していくが、一方、Ca<sup>2+</sup>濃度のスイッチアップでは4時間までは漸増し、72時間で正常Ca<sup>2+</sup>濃度時の量に戻った。TPA処理によってはBPAG1は合成されることなく、細胞質に貯蔵されているものが膜へと再分布されることが考えられるが、Ca<sup>2+</sup>濃度の変化では、膜への移動とともに、BPAG1の合成もみられたと推察された。このことより、BPAG1の合成にはPKC以外のシグナルも関与していると推測される。

## 論文審査結果の要旨

申請者 松岡百合子は、ヘミデスモソームの分解と形成過程における、ヘミデスモソームの構成分子の一つであるBPAG1の制御に関して、PKCが関与することを始めて示した。

この研究成果は、皮膚科学の基礎的研究の分野に大きく貢献し、しいては水疱症の診断と治療の発展に寄与するものと認める。

---

### 主論文公表誌

Transient translocation of hemidesmosomal bullous pemphigoid antigen 1 from cytosol to membrane fractions by 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate treatment and Ca<sup>2+</sup>-switch in a human carcinoma cell line

Journal of Dermatological Science 2001 ; 27 : 206-214