HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ミトコンドリアとケラチン5/14の結合および単純型表皮水疱症の発症病態に関する検討［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	須藤, 明日香
Description	配架番号：2215
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12111号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61810
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Asuka_Suto_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　須藤　明日香

学 位 論 文 題 名

ミトコンドリアとケラチン 5/14 の結合および単純型表皮水疱症の発症病態に関する検討

(The connection between mitochondria and keratin 5/14; Implications for epidermolysis bullosa simplex pathogenesis)

[背景と目的]

ミトコンドリアとは生命活動に必要不可欠な細胞小器官である。ミトコンドリアを蛍光蛋白質で可視化し生細胞観察を行うと、ミトコンドリアはネットワーク構造を形成しながら、融合と分裂を繰り返し、細胞内を活発に移動する。このミトコンドリアの融合や分裂、細胞内移動をミトコンドリアダイナミクスと呼ぶ。ミトコンドリアダイナミクスは、カルシウムの調整や、細胞周期の調整、細胞死の制御など、生命維持に深く関与している。

近年、ミトコンドリアダイナミクスの異常によって神経変性疾患が発症すること、心筋細胞の恒常性維持にも関係することが報告されている。しかし、ミトコンドリアの形態変化が皮膚の恒常性維持に関係しているかどうかは未だに明らかになっていない。主に、ケラチン 5 または 14 (K5/14) の遺伝子異常で発症する単純型表皮水疱症 (Epidermolysis bullosa simplex: EBS) の亜型では、患者細胞でミトコンドリア異常が報告されており、ミトコンドリアとケラチン異常の直接的な関係が示唆されているが、解明には至っていない。本研究ではミトコンドリアとケラチンの結合と、EBS 発症病態におけるミトコンドリアの関わりに着目した。

[手技と手法]

1) 表皮角化細胞におけるミトコンドリアとケラチンの結合について

ミトコンドリアと K5/14 の結合を確認するため、ヒト正常表皮角化細胞を不死化した HaCaT 細胞にミトコンドリアを赤色蛍光蛋白質 DsRed2 で標識した pDsRed2-mito と、緑色蛍光蛋白質 EGFP で wild type K5 [K5 (WT)] または K14 (WT) を標識した pEGFP-K5 (WT)、pEGFP-K14 (WT) をトランスフェクションした。Mfn2 とケラチンの結合については、anti-Mfn2 抗体と、anti-K5 抗体または anti-K14 抗体を用いて免疫蛍光抗体法と免疫沈降反応を行った。また、K14 (WT) 上のミトコンドリアの動きを観察するため、HaCaT 細胞に pEGFP-K14 (WT) と pDsRed2-mito をトランスフェクションし、ミトコンドリアの動きを動画撮影した。

2) EBS 発症病態におけるミトコンドリアとの関わりについて

EBS の Dowling-Meara 型 (EBS-DM) で最も多く認められている変異は、K14 の 125 番目のアルギニンをシステインに置換した変異体である。EBS-DM 患者と同じ K14 の変異体に GFP 蛋白質を融合させた pEGFP-K14 (R125C) を作製した。pEGFP-K14 (R125C) と pDsRed2-mito を HaCaT 細胞にトランスフェクションし、ミトコンドリア動的変化や機能（ミトコンドリア膜電位、ATP 産生、ROS の発生）について検討した。また、電子顕微鏡を用いて EBS-DM 患者皮膚のミトコンドリアの形態や細胞内分布を観察した。

[結果]

1) 表皮角化細胞におけるミトコンドリアとケラチンの結合について

表皮角化細胞においてミトコンドリアは Mfn2 を介して K5/14 と結合すること、さらに K14 上を動いて移動することが明らかになった。

2) EBS 発症病態におけるミトコンドリアとの関わりについて

K14（R125C）を発現した細胞ではミトコンドリアの動きとミトコンドリアの膜電位異常が認められた。また、患者皮膚の表皮基底細胞では、ケラチンの凝集と共にミトコンドリアの分布異常が引き起こることが明らかになったが、正常皮膚と比較してミトコンドリアの大きさや形態学的な異常は認められなかった。また、患者皮膚の表皮有棘細胞でも同様にミトコンドリアの大きさや形態学的な異常は見られなかった。

[考察]

1) 表皮角化細胞におけるミトコンドリアとケラチンの結合について

ミトコンドリアを細胞質内の適切な場所に配置することは、細胞質内のエネルギーである ATP 供給やカルシウムイオンの調整に必要不可欠である。本研究では Mfn2 を介してミトコンドリアはケラチンと結合することが明らかになった。ケラチンの凝集によってミトコンドリアの動きが変化することから、ミトコンドリアが細胞内に適切に分布するためにケラチンを足場として利用していることが予測される。Mfn2 は神経細胞で微小管とミトコンドリアの結合を介在する Miro/Milton と結合し、ミトコンドリア輸送に関与する。K18 を発現する細胞では、Mfn2 は trichoplein というケラチン結合蛋白質と結合する。Mfn2 は、ある分子群と複合体を形成しながらケラチン上のミトコンドリア輸送に関係していると考えている。今後はケラチンが介するミトコンドリア輸送に関係する因子と、詳細な輸送システムのメカニズム解明が必要である。

2) EBS 発症病態におけるミトコンドリアとの関わりについて

EBS は出生後から皮膚に水疱が形成される遺伝性疾患であり、表皮基底細胞自体に裂隙が形成される。しかし、ケラチンの遺伝子異常から水疱形成に至る詳細な発症機序は解明されておらず、治療方法は対症療法である。神経細胞のミトコンドリア膜電位異常は、細胞内輸送異常を引き起こすことが報告されていることから、EBS 患者細胞でもミトコンドリアの細胞内輸送異常は膜電位異常によって引きおこると予測している。ミトコンドリアが発症機序と考えられているアルツハイマー病などの神経変性疾患と同様に、EBS で認められたミトコンドリア異常が病態の発症に関係する可能性が示唆される。

[結論]

本研究では表皮角化細胞においてミトコンドリアは Mfn2 を介してケラチンと結合すること、EBS-DM のミトコンドリア異常を明らかにした。以上の結果からミトコンドリアの細胞内輸送と機能は皮膚においても重要であることが示唆された。この研究が、ミトコンドリア異常を伴う EBS 発症機序の解明へ新たな糸口となることが期待される。