

提出日：平成28年 5月20日

平成27年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

## (2) 研究成果の概要

課題名	ヒト皮膚表皮細胞株 HaCat、FEPE1L-8 細胞のコラーゲン、ラミニン認識機構の差異を解明する		
研究代表者	氏名	藤崎ひとみ	
	所属機関名・部局名	一般財団法人日本皮革研究所 マトリックス生体工学部門	
	職名	研究員	
事業名 (該当の事業名の右欄に○)	○	共同研究員	
		国際共同研究課題	
		超高磁場NMR 共同利用研究課題	
		客員フェロー	
蛋白研受入担当教員名	関口清俊		
<p>ヒト表皮角化細胞株 HaCat 細胞は皮膚の研究に広く用いられており、I 型コラーゲンの会合体上で培養して基底膜構造を形成する皮膚モデルの報告も多く、実用化されている。HaCat 細胞は I 型コラーゲン会合体上で培養すると伸展形態を保ったまま、増殖を続けることがわかった。我々は以前継代ヒト表皮角化細胞、及びその株化細胞 FEPE1L-8 は、I 型コラーゲン分子上では増殖するにもかかわらず、I 型コラーゲン会合体上で培養すると増殖が抑制されアポトーシスが誘導されることを報告している。このとき培地のカルシウム濃度を上げると、アポトーシスは回避された。2 種の株化表皮角化細胞の I 型コラーゲン会合体への応答の差に関する知見はほとんどないが、皮膚モデルの形成などに有用であると考え、(1) 細胞外マトリックスへの接着 (2) 培地に着目して本課題を行った。(1) HaCat 細胞と FEPE1L-8 細胞のインテグリン発現量を定量、比較し、コラーゲン、ラミニン 511 への接着実験を行った。両細胞ともコラーゲン受容体インテグリン <math>\alpha 2\beta 1</math>、ラミニン受容体 <math>\alpha 3\beta 1</math> を発現しているが、HaCat 細胞は計測したすべてのインテグリン、特に <math>\alpha 3</math>、<math>\alpha 6</math> の発現量が FEPE1L-8 細胞を上まわり、I 型、IV 型コラーゲン、ラミニン 511 にほぼ同程度の高い接着性を示し、丸い伸展形態を示した。一方、FEPE1L-8 細胞は特にコラーゲンに高い接着性を示し、ラミニン 511 上では HaCat 細胞に似た円形に伸展したが、I 型、IV 型コラーゲン上では伸展突起をのびした紡錘形に近い形態を示した。</p> <p>(2) HaCat 細胞は通常 10 %血清添加培地 (1 mM 程度あるいは以上の高カルシウム濃度) を用いて維持培養するが、FEPE1L-8 細胞はこの条件には馴化できなかった。HaCat 細胞は 0.03 mM カルシウム濃度の角化細胞用無血清培地 K110 typeII に馴化することは可能であった。K110 typeII 培地に馴化した HaCat 細胞は、分子状 I 型コラーゲンおよび未処理培養容器上で増殖を維持した。しかし I 型コラーゲン会合体上では増殖は阻害され、FEPE1L-8 細胞と同様の挙動を示すようになった。K110 typeII 培地のカルシウム濃度を 1.8 mM にして会合体上で培養すると、両細胞とも増殖するようになり細胞外カルシウム濃度により増殖を制御されることがわかった。興味深いことに培地の種類にかかわらず、ゲル上で 6 日培養した HaCat 細胞の annexinV が陽性になる割合はほぼ変わりがなく約 10%であった。この結果は I 型コラーゲン会合体への接着は、細胞外カルシウム濃度に依存する増殖とは、独立して細胞にアポトーシスを誘導する可能性を示唆している。</p>			