

## Mini Review

## 表皮細胞における伸展刺激の影響

小宮根真弓<sup>1)</sup>, 矢野正一郎<sup>1)</sup>, 大河内仁志<sup>2)</sup>, 玉置邦彦<sup>1)</sup>,  
Miroslav Blumenberg<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>東京大学医学部附属病院皮膚科

<sup>2)</sup>国立国際医療センター研究所細胞組織再生医療研究部

<sup>3)</sup>ニューヨーク大学メディカルセンター皮膚科

*The effects of mechanical stretch on keratinocytes*

Mechanical stress has profound influences on human body. Muscle training strengthens the muscles, and high blood pressure thickens the vessel walls. Intense studies have been made by various investigators on how mechanical stress influences the human tissues. Epidermal keratinocytes are continuously exposed to mechanical forces. The human skin surface can be thickened and enlarged by various stress such as tissue expander or abrasive pressure. Keratinocytes were plated on flexible silicone dishes, and they were continuously stretched. Stretching of keratinocytes caused up-regulation of 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)-positive cells and activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1/2. EGF receptor, calcium channel, and ERK were involved in stretch-induced BrdU incorporation. Stretching also induced keratin K6, which is expressed in activated and proliferating keratinocytes, and suppressed keratin K10, which is expressed in differentiated keratinocytes, and their regulation was inhibited by MEK1/2 inhibitor. EGF receptor as well as adhesion molecules have been reported to be involved in transducing mechanical stresses. Several diseases involving heart and palmoplantar skin are caused by the mutation in desmosomal proteins, indicating that adhesion molecules play an important part in sustaining normal structure of skin under the mechanical stress.

Rec.11/19/2004, Acc.2/28/2005, pp186-191

Mayumi Komine<sup>1)</sup>, Shoichiro Yano<sup>1)</sup>, Hitoshi Okochi<sup>2)</sup>, Kunihiko Tamaki<sup>1)</sup> and Miroslav Blumenberg<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Dermatology, University of Tokyo

<sup>2)</sup>Department of Regenerative medicine, Research Institute of International Medical Center of Japan

<sup>3)</sup>Departments of Dermatology and Biochemistry, New York University Medical Center

**Key words** mechanical stretch, keratinocytes, signal transduction, EGF receptor, MAP kinase

## はじめに

表皮は、人を構成する組織の一番外側にあつて、常に外的環境の影響を受けている。外的環境因子として、熱、光、化学物質などがあるが、機械的刺激も重要な外的刺激因子である。掻破や外力による刺激はもちろん、創傷治癒過程の創の収縮に伴い、創周囲の表皮細胞には伸展刺激が加わっていると考えられる。また、表皮内腫瘍は

周囲の表皮細胞を圧排、伸展しながら成長すると考えられる。さらに、ティッシュエクspanダーによる皮膚の伸展、急激な肥満や妊娠による皮膚の伸展といった現象も皮膚に加わる機械的刺激の一つである。このように、伸展刺激は、しばしば皮膚に影響を及ぼしていると考えられるが、伸展刺激が表皮に与える影響については、ほとんど研究が行われていない。

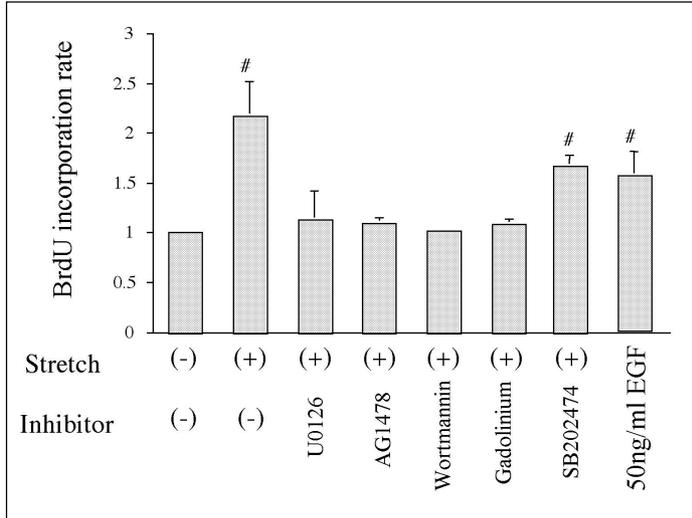


図1 伸展刺激によるBrdUの取り込み増強とシグナル伝達阻害剤による阻害

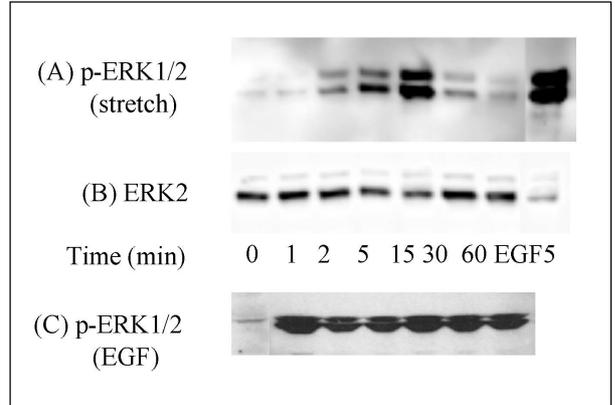


図2 伸展刺激によるERKのリン酸化

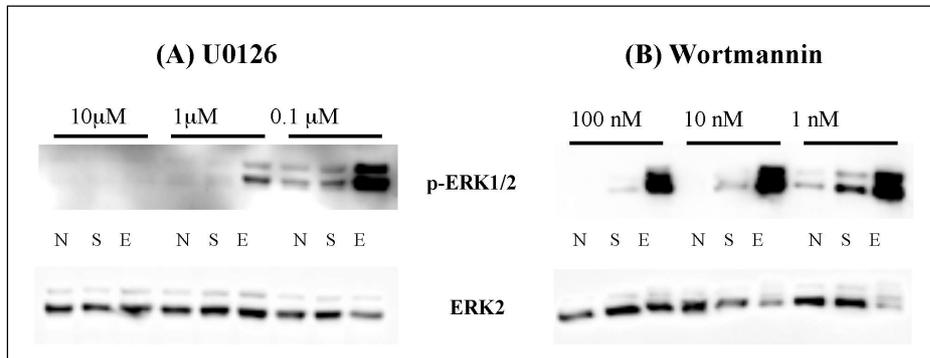


図3 伸展刺激によるERKのリン酸化はU0126, wortmanninにより阻害される。

### 機械的刺激の各種細胞に対する作用

伸展刺激は生体において様々な場面で重要な刺激の一つである。筋肉はトレーニングによりその体積を増し、機能的増強が認められ、また高血圧症や容量負荷により心肥大あるいは拡張型心筋症が生じ、高血圧症により血管平滑筋が増殖して病的状態を引き起こす<sup>1)</sup>。Vitroにおける機械的刺激としては、持続的な伸展刺激を加える static stretch, 頻回の伸展収縮を繰り返す cyclic stretch, また血管内圧に相当する伸展刺激の一つとして shear stress がよく用いられている。

心筋細胞における機械的刺激の作用は、以前よりよく研究されており、これらの機械的刺激は、様々な形で細胞内シグナルを惹起する<sup>1)</sup>。一つは、G-protein を介したシグナル伝達である<sup>2)</sup>。この際に、機械的刺激により細胞から放出された angiotensin II, endothelin-1, TGF などの液性因子が paracrine あるいは autocrine に働くことが知られている<sup>3)</sup>が、液性因子を介さない機序も報告されてい

る。さらに、機械的刺激は transmembrane glycoprotein である gp130 を介して JAK/STAT 経路, ERK の活性化を引き起こす<sup>4)</sup>。これらの最も上流の mechanoreceptor が何であるのかは未だ不明の点が多い。いくつかの細胞種においては、stretch-activated channels (SACs) の存在が明らかとなっている<sup>5)</sup>。また、インテグリンは細胞外では細胞外マトリックスと結合し、細胞内では細胞骨格や、focal adhesion kinase (FAK), Rho, Rac などの細胞内シグナル分子と結合しており、伸展による力学的刺激を細胞内シグナルに変換している<sup>6)</sup>。最近 caveolin-1 がインテグリンと結合しており、伸展刺激により Fyn や Shc を活性化し、さらに伸展刺激により局在を変え、血管平滑筋細胞において ERK の活性化を引き起こしているとの報告がある<sup>7)</sup>。また、細胞骨格蛋白や核膜を構成する分子による機械的刺激の伝達も報告されている<sup>8)</sup>。これら機械的刺激によるシグナルの活性化経路は、種々の細胞において共通に認められるものもあるが、細胞種に特異的なものも存在することが推測される。

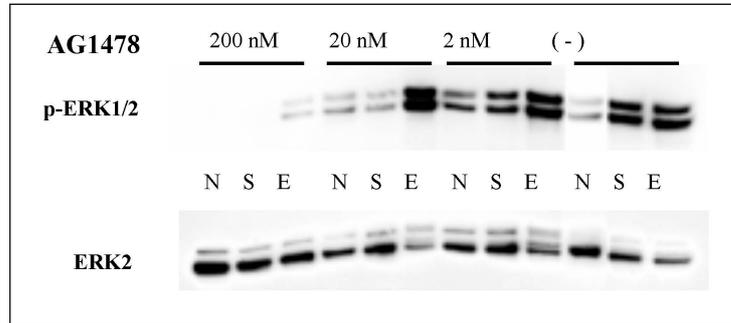


図4 伸展刺激によるERKリン酸化はAG1478により阻害される。

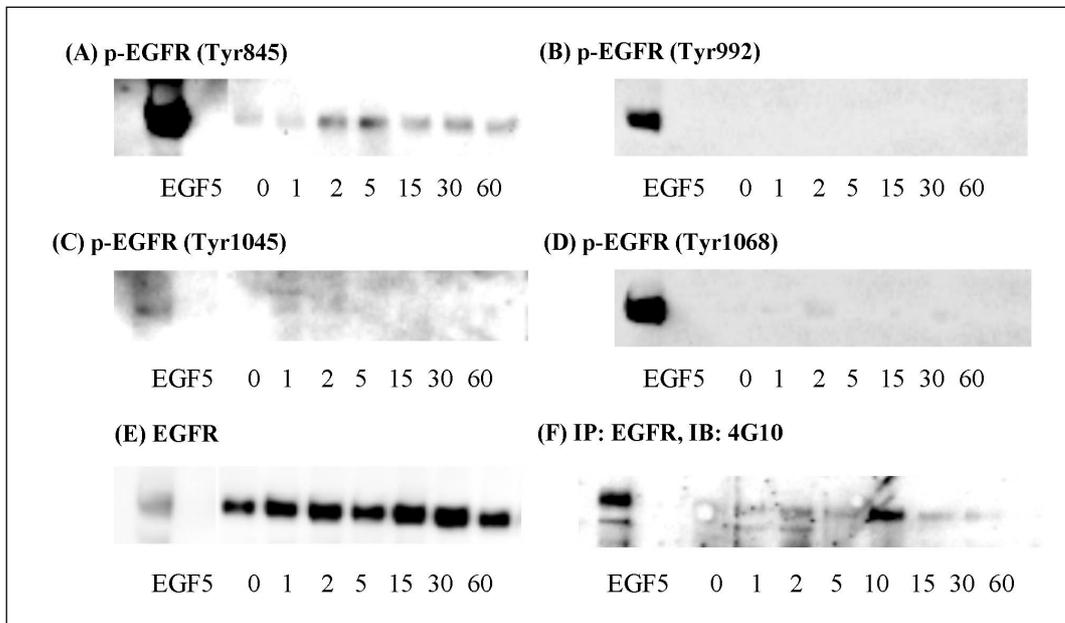


図5 伸展刺激によりEGF受容体がリン酸化する。

### 伸展刺激により表皮細胞の増殖が亢進する

以上のように、種々の細胞において機械的刺激は増殖シグナルを生じることが明らかとなっているため、われわれは表皮細胞を用いて伸展刺激によるBrdU取り込みを検討した。表皮細胞を20%、24時間伸展することにより、BrdU取り込みは、正常ヒト表皮細胞およびHaCaT細胞で約2倍に有意に上昇した( $p < 0.05$ )。このBrdU取り込みの上昇は、MEK1/2阻害剤であるU0126、PI3Kinase阻害剤であるwortmannin、EGF受容体阻害剤であるAG1478、カルシウムチャンネル阻害剤であるgadoliniumにて抑制された(図1)。これらの結果より、伸展刺激は表皮細胞の増殖能を上昇させ、その伸展刺激によるBrdU取り込みの増加は、ERK、PI3K、EGF受容体、カルシウムチャンネルに依存していることが示された。

### 表皮細胞に伸展刺激を加えることにより、ERK、EGF受容体がリン酸化する

表皮細胞に伸展刺激を加えることにより、ERKが時間依存的にリン酸化し(図2)、またそのリン酸化は、MEK1/2阻害剤であるU0126、およびPI3K阻害剤であるwortmanninによって阻害された(図3)。EGF受容体チロシンキナーゼ阻害剤であるAG1478を加えることによっても、伸展刺激によるERKリン酸化は、AG1478の濃度依存的に抑制された(図4)。

BrdUの取り込み、ERKのリン酸化がEGF受容体チロシンキナーゼ阻害剤により抑制されたことから、伸展刺激によりEGF受容体がリン酸化している可能性を考え、伸展刺激によるEGF受容体におけるチロシンリン酸化の有無を、いくつかのチロシン残基特異的抗体を用いて検討した。その結果伸展刺激によりTyr845のリン酸化が時間依存的に認められたが、Tyr992、Tyr1045、Tyr1068のリン酸化は認められなかった。

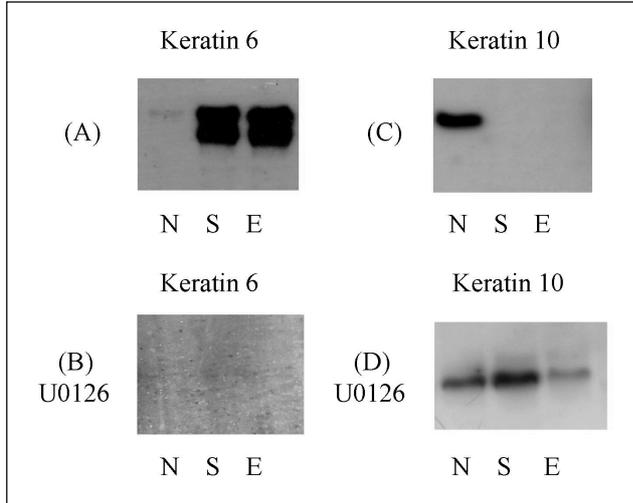


図6 伸展刺激によるケラチン発現の変化

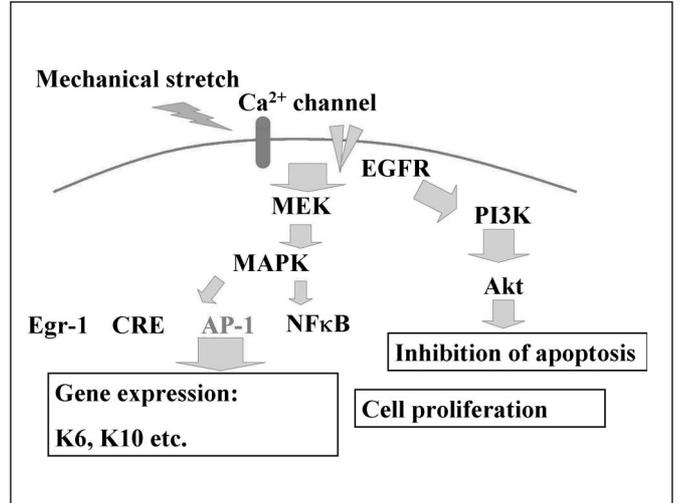


図7 表皮細胞における伸展刺激の作用

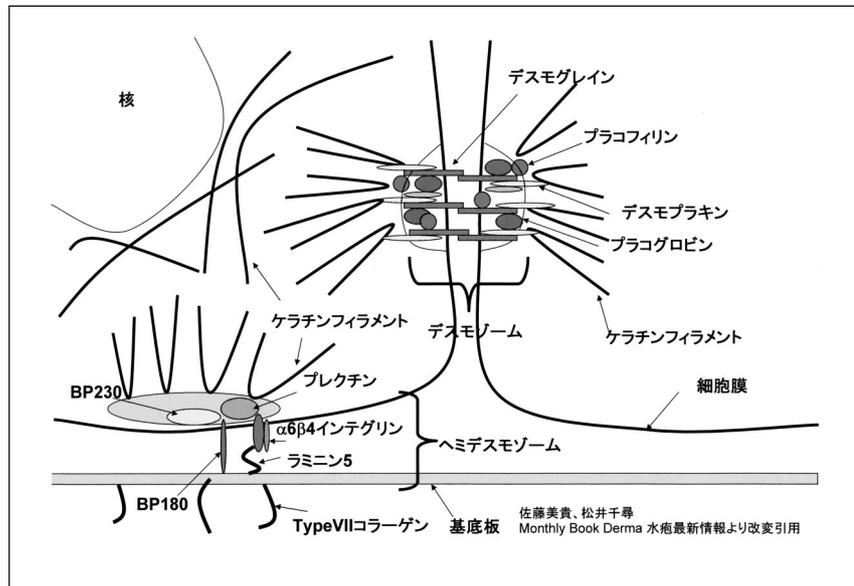


図8 表皮細胞における接着装置

ン酸化は認められなかった。さらに、このEGF受容体のリン酸化を免疫沈降法により確認した(図5)。

### 伸展刺激はケラチンK6の発現を誘導し、ケラチンK10の発現を抑制する

ケラチンは上皮細胞に特異的に発現する中間系フィラメントであり、これまでに50種以上のものが知られている。各々のケラチンには分化あるいは部位特異的発現が認められる。たとえばケラチンK5, K14は基底細胞に、ケラチンK1, K10は基底細胞より上方の有棘細胞に、またケラチンK6, K16, K17は毛包や、炎症あるいは過増殖状態の表皮細胞に発現する。われわれは伸展刺激を加えた細胞において、ケラチンK6発現が亢進し、ケラチンK10発現が抑制

されていることを明らかにした。このK6発現誘導およびK10発現抑制は、U0126によって抑制された(図6)。

### 伸展刺激におけるEGF受容体と接着分子

われわれの検討<sup>9)</sup>では、伸展可能なシリコンチャンパーに表皮細胞を播種してstaticな伸展刺激を加えたが、この方法は、小室らの報告<sup>10)</sup>に準じたものである。伸展刺激の表皮細胞への作用がEGF受容体の活性化を介していることは、血管平滑筋細胞<sup>11)</sup>など、他の細胞における機械的刺激の受容と平行な結果である。これまでのわれわれの実験結果(ここには示さなかったデータも含め)より、表皮細胞における伸展刺激の作用について、図7のような模式図を考えている。

ドイツのグループ<sup>12)</sup>は、同様の伸展刺激システムを用いて表皮細胞に伸展刺激を加えることにより、ERK がリン酸化し、そのリン酸化は 1 インテグリン中和抗体により抑制されることを示した。1 インテグリンおよびEGF 受容体はともに細胞膜上にあり、伸展刺激によるERK リン酸化に関わることから、これらが細胞膜上で何らかの相互作用を引き起こしているか、あるいは双方からの刺激がERKに収束している可能性が考えられる。以前より、EGF 受容体の活性化がインテグリンの影響下にあり、また逆にEGF 受容体の活性化によりインテグリンへのシグナルが入るといった報告がなされている<sup>13-15)</sup>。最近細胞外マトリックスへの 1 インテグリンの結合は乳腺上皮細胞においてインテグリンに結合するbimを介して細胞死をコントロールしているという報告がある<sup>16)</sup>。bimは 1 インテグリンおよびEGF 受容体の下流にあり、双方からの刺激を受容するので、伸展刺激においても同様な機序が存在する可能性が考えられる。一方で、気管上皮細胞において機械的刺激はHB-EGF の shedding を介してEGF 受容体を活性化すると報告があり<sup>17)</sup>、paracrine, juxtacrine 刺激によるEGF 受容体の活性化も考慮する必要がある。

最近 gap junction の構成分子である connexin が、伸展刺激による心肥大に深く関与していることが報告されている<sup>18)</sup>。Plakoglobin や desmoplakin は、上皮細胞や心筋細胞の接着斑に存在し、細胞接着分子と細胞骨格蛋白の橋渡しを担っていると考えられている(図8)。表皮細胞同士の接着装置としてデスモゾームがあるが、desmoglein が細胞膜貫通蛋白としてhomophilicに結合し、desmoplakin, plectin, plakoglobin, plakophilin などのリンカー分子が desmoglein と細胞骨格であるケラチンフィラメントとの橋渡しを担っている(図8)。表皮細胞と基底膜の接着にはヘミデスモゾームが関与し、BP180(bullous pemphigoid antigen II)が細胞膜貫通蛋白として、細胞膜上のインテグリン  $\alpha 6 \beta 4$  とともに、細胞外マトリックスとの接着を担う。細胞骨格であるケラチンフィラメントとの橋渡しには plectin などのリンカー分子が関与している(図8)。

Naxos 病は、plakoglobin の変異による遺伝性疾患であるが<sup>19)</sup>、不整脈や右室心筋症などの心病変に加え、毛髪の異常、手掌足底の角化などの皮膚の異常も認められる。Carvajal 症候群は desmoplakin 遺伝子の変異により発症する遺伝子疾患であり<sup>20)</sup>、拡張型心筋症に加え、やはり毛髪異常と手掌足底の角化が認められる。手掌足底は機械的刺激を特に受けやすい部分であり、機械的刺激がこれらの接着装置を介して心筋のみならず表皮細胞にも作用しており、さらにその異常は表皮細胞の増殖のみならず分化にも影響を与えていることを示唆している。

また、表皮の基底層に発現するケラチンであるケラチンK14 遺伝子の変異により、単純型表皮水疱症が発症することが知られているが、この変異を持つ表皮細胞においては、cyclic stretchによりケラチンフィラメントは正常の構造をとれずに分断し、特徴的なリング構造をとることが報告されている。この際に、接着装置であるデスモゾームがケラチンフィラメントに引き込まれるようにして細胞膜から細胞質内へ取り込まれ、リング構造をとるケラチン繊維と局在を共にすることが報告されている<sup>8)</sup>。この結果は、伸展刺激に対する正常構造の維持には、正常なケラチンフィラメントが必要であり、さらにケラチンフィラメントによる力学的刺激がデスモゾームの細胞膜上での発現維持に必要であることを示唆している。

## おわりに

機械的刺激が細胞に与える影響、また正常構造を維持していく上での機械的刺激は、生体において非常に重要な意味を持っていると考えられる。われわれは、表皮細胞におけるこれらの機械的刺激の影響を検討していく中で、機械的刺激の生体におけるより普遍的な意義についての知見を得られることを期待している。

## 文 献

- 1) Lammerding J, Kamm RD, Lee RT: Mechanotransduction in cardiac myocytes. *Ann N Y Acad Sci*, 1015: 53-70, 2004.
- 2) Zou Y, Akazawa H, Qin Y, Sano M, Takano H, Minamino T, Makita N, Iwanaga K, Zhu W, Kudoh S, Toko H, Tamura K, Kihara M, Nagai T, Fukamizu A, Umemura S, Iiri T, Fujita T, Komuro I: Mechanical stress activates angiotensin II type 1 receptor without the involvement of angiotensin II. *Nat Cell Biol*, 6(6): 499-506, 2004.
- 3) van Wamel AJ, Ruwhof C, van der Valk-Kokshoorn LE, Schrier PI, van der Laarse A: The role of angiotensin II, endothelin-1 and transforming growth factor-beta as autocrine/paracrine mediators of stretch-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Mol Cell Biochem*, 218(1-2): 113-124, 2001.
- 4) Pan J, Fukuda K, Saito M, Matsuzaki J, Kodama H, Sano M, Takahashi T, Kato T, Ogawa S: Mechanical stretch activates the JAK/STAT pathway in rat cardiomyocytes. *Circ Res*, 84(10): 1127-1136, 1999.
- 5) Yamaguchi O: Response of bladder smooth muscle cells to obstruction: signal transduction and the role of mechanosensors. *Urology*, 63(3 Suppl 1): 11-16, 2004.
- 6) Aikawa R, Nagai T, Kudoh S, Zou Y, Tanaka M, Tamura

- M, Akazawa H, Takano H, Nagai R, Komuro I: Integrins play a critical role in mechanical stress-induced p38 MAPK activation. *Hypertension*, 39(2): 233-238, 2002.
- 7) Kawabe J, Okumura S, Lee MC, Sadoshima J, Ishikawa Y: Transduction of caveolin regulates stretch-induced ERK activity in vascular smooth muscle cells. *Am J Phys Heart Circ Physiol*, 286: H1845-H1852, 2004.
  - 8) Russell D, Andrews PD, James J, Lane EB: Mechanical stress induces profound remodelling of keratin filaments and cell junctions in epidermolysis bullosa simplex keratinocytes. *J Cell Sci*, 117(Pt 22): 5233-5243, 2004.
  - 9) Yano S, Komine M, Fujimoto M, Okochi H, Tamaki K: Mechanical stretching in vitro regulates signal transduction pathways and cellular proliferation in human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 122: 783-790, 2004.
  - 10) Komuro I, Katoh Y, Kaida T, Shibazaki Y, Kurabayashi M, Hoh E, Takaku F, Yazaki Y: Mechanical loading stimulates cell hypertrophy and specific gene expression in cultured rat cardiac myocytes. Possible role of protein kinase C activation. *J Biol Chem*, 266: 1265-1268, 1991.
  - 11) Iwasaki H, Eguchi S, Ueno H, Marumo F, Hirata Y: Mechanical stretch stimulates growth of vascular smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor. *Am J Phys Heart Circ Physiol*, 278: H521-H529, 2000.
  - 12) Kippenberger S, Bernd A, Loitsch S, Guschel M, Muller J, Bereiter-Hahn J, Kaufmann R: Signaling of mechanical stretch in human keratinocytes via MAP kinases. *J Invest Dermatol*, 114: 408-412, 2000.
  - 13) Cabodi S, Moro L, Bergatto E, Boeri Erba E, Di Stefano P, Turco E, Tarone G, Defilippi P: Integrin regulation of epidermal growth factor(EGF) receptor and of EGF-dependent responses. *Biochem Soc Trans*, 32(3): 438-442, 2004.
  - 14) Katsumi A, Orr AW, Tzima E, Schwartz MA: Integrins in mechanotransduction. *J Biol Chem*, 279(13): 12001-12004, 2004.
  - 15) Yu X, Miyamoto S, Mekada E: Integrin  $\alpha 2 \beta 1$ -dependent EGF receptor activation at cell-cell contact sites. *J Cell Sci*, 113: 2139-2147, 2000.
  - 16) Reginato MJ, Mills KR, Paulus JK, Lynch DK, Sgroi DC, Debnath J, Muthuswamy SK, Brugge JS: Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat Cell Biol*, 5(8): 733-741, 2003.
  - 17) Tschumperlin DJ, Dai G, Maly IV, Kikuchi T, Laiho LH, McVittie AK, Haley KJ, Lilly CM, So PT, Lauffenburger DA, Kamm RD, Drazen JM: Mechanotransduction through growth-factor shedding into the extracellular space. *Nature*, 429(6987): 83-86, 2004.
  - 18) Saffitz JE, Kleber AG: Effects of mechanical forces and mediators of hypertrophy on remodeling of gap junctions in the heart. *Circ Res*, 94: 585-591, 2004.
  - 19) McKoy G, Protonotarios N, Crosby A, Tsatsopoulou A, Anastasakis A, Coonar A, Norman M, Baboonian C, Jeffery S, McKenna WJ: Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair(Naxos disease). *Lancet*, 355(9221): 2119-2124, 2000.
  - 20) Norgett EE, Hatsell SJ, Carvajal-Huerta L, Cabezas JC, Common J, Purkis PE, Whittock N, Leigh IM, Stevens HP, Kelsell DP: Recessive mutation in desmoplakin disrupts desmoplakin-intermediate filament interactions and causes dilated cardiomyopathy, woolly hair and keratoderma. *Hum Mol Genet*, 9(18): 2761-2766, 2000.