

学位の種類

博士

氏名

中根 宏

学位論文題目

Elafin a Secretory Protein, is Cross-Linked into the Cornified Cell Envelopes
from the Inside of Psoriatic Keratinocytes

(分泌蛋白である elafin は乾癬において辺縁帯の構成成分として
表皮細胞の内側から架橋される)

共著者

山本明美、高橋英俊、飯塚 一

Journal of Investigative Dermatology 119 巻1号 50 頁~55 頁

平成14年7月

研究目的

Elafin は serine proteinase inhibitor の一種で、正常表皮では発現せず、尋常性乾癬や創傷治癒過程などの病的表皮で強く発現し、好中球由来の蛋白分解酵素を阻害することにより、生体組織の過剰な損傷を防いでいる蛋白と考えられている。Steinert らは elafin を表皮辺縁帯の構成成分であるとしており、蛋白分解酵素阻害作用に加え、物理的バリアとしての機能をもつことが示唆される。しかし、分泌蛋白である elafin がいつ、どのように細胞膜の内側に形成される辺縁帯の成分となりうるのかという疑問に対する答えはいまだ明らかにされていない。今回我々は、シグナルペプチドを持ち表皮細胞内では層板顆粒を含む小胞内に局在し、その後細胞外に分泌されると報告されている elafin が、どのように辺縁帯に架橋されるのかを明らかにするために、尋常性乾癬表皮における elafin の局在を免疫組織化学、および免疫電顕学的に検討し、さらに二重染色法を用いて involucrin の局在との比較を試みた。

材 料・方 法

材 料 6名の尋常性乾癬患者より informed content 取得後、病変部皮膚を生検し、鱗屑は外科用メスで擦りとることにより採取した。

抗 体 抗ヒト elafin rabbit polyclonal 抗体を用い、involucrin との二重染色の際には抗ヒト involucrin mouse monoclonal 抗体を用いた。

免疫蛍光抗体法 一次抗体に抗 elafin 抗体と抗 involucrin 抗体を用い、免疫蛍光抗体直接法による二重染色を施行した。二次抗体に elafin は FITC、involucrin には Texas red を用いた。

免疫組織化学 抗 elafin 抗体によるパラフィン包埋切片を用いた免疫染色を行った。

免疫電顕法 post-embedding 法による免疫電顕については凍結固定、凍結置換し、Lowicryl K11M 樹脂にて包埋し、その後に、抗 elafin 抗体で incubation し標識抗体に 10nm colloidal gold を用い、二重染色の際には involucrin に対して 5 nm colloidal gold を標識抗体に用いた。pre-embedding 法による免疫電顕二重染色は、外科用メスを用いて採取した乾癬皮膚の角層を、はさみで細かく刻み、さらに homogenize し、2%SDS、1% β -mercaptoethanol を加えた 10mM Tris-HCl buffer で 10 分間の煮沸を 4 回繰り返し、その後 0.02%アジ化ナトリウムを加えた 10mM Tris-HCl、さらに PBS で洗浄し、一次抗体でラベルした後、elafin には 5nm の colloidal gold を involucrin に 10nm の colloidal gold を用いて標識し、1% オスミウムテトロキサイドで固定した後、通常の手法でエポン樹脂包埋を行い、電顕的に観察した。

成 績

今回用いた抗 elafin 抗体の特定は免疫ブロット法により elafin 分子に相当する 6kDa のバンドが認められたことにより確認された。

蛍光抗体二重染色では、elafin、involucrinともに乾癬表皮で強く発現しており、比較すると、involucrinがelafinよりも早期に発現していた。

elafin抗体を用いた免疫染色の結果、乾癬表皮においてelafinは基底層より数層上層より発現し、細胞質内で表層側により強く染色され、上層に向かうにしたがい、細胞辺縁に偏在する傾向がみられた。

post-embedding 免疫電顕においては、有棘層においてelafinは表皮細胞核近傍のゴルジ装置に局在あるいは分泌顆粒と思われる構造内に局在しており、角層においてははっきりとした分泌顆粒は認められず、elafinが細胞内にびまん性に分布し、細胞外に放出されたものに加えて辺縁帯に沿って位置しているものも認められた。これが細胞内から架橋されたものか、細胞外からなのかを知るために表皮辺縁帯形成のタイミングとelafinの局在の変化を知るために施行したpost-embedding法による免疫電顕二重染色では、有棘層のinvolucrin陽性の辺縁帯の構造が認められていない細胞では、細胞質内においてelafinを含んだ顆粒が存在していたが、より上方の細胞では辺縁帯の形成に伴い、involucrinが標識し始めており、細胞質内ではelafin、involucrinとも特定の細胞内小器官には関係なく、びまん性に分布し、さらに辺縁帯の形成が進むとinvolucrinの標識はより密となり、elafinの標識も同様に辺縁帯に沿って認められるようになることが確認された。以上のように、post-embedding法による免疫電顕では、辺縁帯形成に伴って、elafinを含む細胞内の分泌顆粒が失われること、辺縁帯上にelafinが沈着していくことが見いだされたが、これが細胞内からなのか、外からなのかはこの方法でははっきりさせることは不可能であり、この点を明らかにするために、乾癬角層より精製した辺縁帯を材料としたpre-embedding法を用いた免疫電顕二重染色を施行した。その結果、elafinとinvolucrinが共に辺縁帯の同じ面に標識されており、brushyと表現されるように毛羽立った構造物がみられる側が細胞質側とみなされていることから、辺縁帯においてelafinとinvolucrinは、共に細胞の内側に存在していることが確認された。

考 察

Steinertらは表皮角層より精製した辺縁帯を用いた検討により辺縁帯に架橋される様々なペプチドを明らかにし、elafinのアミノ酸配列がloricrin架橋されていることを示

している。しかし、他の辺縁帯構成蛋白と異なり分泌蛋白である elafin がいつ、どのように細胞膜の内側に形成される辺縁帯の成分となりうるのかという疑問に対する答えは明らかにされてはいない。これまで免疫電顕の手法を用いた辺縁帯の構成成分に対しての検討で多くの分子がみいだされているが、elafin に対しての検討はなされていない。過去、2%パラフォルムアルデヒド固定、Lowicryl HM20 樹脂包埋尋常性乾癬表皮を用いた post-embedding 法による免疫電顕的検討で細胞質内において elafin が細胞間、層板顆粒やゴルジ装置に局在する所見は示されているが、辺縁帯に局在する所見はみいだされていない。今回の検討で我々は、post-embedding および pre-embedding 法による免疫電顕を施行し、elafin が辺縁帯の構成成分であることを確認し、さらに elafin を含んだ顆粒が辺縁帯形成に伴い、分解され、その後 elafin は細胞の内側から辺縁帯に架橋されることを示した。

過去の報告において、精製された辺縁帯を用いた pre-embedding 免疫電顕による検討により、細胞質側に存在する辺縁帯構成成分の多くのエピトープが示され、loricrin、keratin desmoplakin、envoplakin、periplakin、involucrin、SPR1 などの分子が辺縁体架橋酵素であるトランスグルタミナーゼによって架橋されることによって辺縁帯が形成されることが明らかにされている²⁾。また、層板顆粒より細胞外に分泌されるセラミドも同様に involucrin、periplakin、envoplakin とエステル結合することにより辺縁帯に架橋され、同様に層板顆粒から細胞外に分泌される corneodesmosin も細胞外から辺縁帯に架橋する分子であると考えられていることから、辺縁帯は細胞内側および外側の両面より形成、発達するものと考えられている。

正常表皮において、層板顆粒からの分泌はすべて角化終了以前に行われるが、乾癬表皮においては、角層内に分泌が完了していない顆粒の残存がみられる。また乾癬表皮では有棘層において早くも辺縁帯の形成が始まるとの報告もあり、乾癬表皮においては辺縁帯の形成が正常表皮より早期に生じるためにすべての層板顆粒が細胞の上方に到達し、内容を細胞外に放出することができず、残存するものが存在すると考えられる³⁾。

細胞質内の Ca 濃度の上昇が Golgi 由来の分泌顆粒放出の trigger となり、同じくトランスグルタミナーゼによる辺縁帯への蛋白の架橋が生じる。すなわち、細胞内の Ca 濃度の上昇につれて、顆粒内の elafin は細胞外に分泌されるようになり、また辺縁帯の形成が開始され、そしてついには分泌顆粒は細胞膜との融合ができずに分解され、elafin

分子はその後細胞内に分散し、細胞の内側から辺縁帯に架橋されるようになると考えられる。

elafin は正常表皮においては発現していないが、乾癬表皮においては発現が誘導され、辺縁帯の主要な構成成分となる。今後の課題として elafin がもつプロテアーゼ阻害活性が辺縁帯に架橋された状態でなお生物学的な役割を果たしているかを検討する必要があるだろう。

結 論

今回の検討より、elafin を含む分泌顆粒は辺縁帯の形成の開始と共に分解され、その結果 elafin は、involucrin 陽性の辺縁帯上において表皮細胞の内側から架橋されることが示された。

引用文献

- 1) The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments,loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are odipeptide cross -linked components of the human epidermal cornified cell envelope.
Steinert PM et al
Journal of Biological Chemistry 270 : 17702-17711, 1995
- 2) Immunocytochemical evidence for a possible role of cross-linked keratinocyte envelopes in stratum corneum cohesion.
Haftak M et al
Journal of Histochemistry and Cytochemistry 39 : 1531-1538, 1991
- 3) Immunoelectron microscopic analysis of cornified cell envelope in normal and psoriatic epidermis.
Ishida-Yamamoto A et al
Journal of Histochemistry and Cytochemistry 44 : 167-175, 1996

参 考 論 文

参 考 論 文 1

1. 題 目 Inherited disorders of epidermal keratinization
 Ishida-Yamamoto A 他 2 名と共著
- 2.印刷公表の方法 Journal of Dermatological Science 18 卷 139 頁～154 頁
 及び時期 平成 1 0 年

参 考 論 文 2

- 1.題 目 Programmed cell death in normal epidermis and loricrin keratoderma.
 Multiple functions of profilaggrin in keratinization.
 Ishida-Yamamoto A 他 2 名と共著
- 2.印刷公表の方法 Journal of Investigative Dermatology
 (Symposium Proceedings) 4 卷 145 頁～149 頁
 及び時期 平成年 1 1 月

参 考 論 文 3

1. 題 目 Electron microscopic in situ DNA nick endlabelling and combination
 with immunoelectron microscopy
 Ishida-Yamamoto A 他 4 名と共著
2. 印刷公表の方法 Journal of Histochemistry and Cytochemistry 47 卷 711 頁～717 頁
 及び時期 平成 1 1 年

参 考 論 文 4

1.題 目

Elafin/SKALP/trappin-2 と炎症性皮膚疾患

山本明美 他 1 名と共著

2.印刷公表の方法

Monthly book Derma. 22 巻 43 頁～47 頁

及び時期

平成 11 年 4 月

参 考 論 文 5

1.題 目

膿疱症における involucrin と elafin

山本明美 他 2 名と共著




2.印刷公表の方法

Monthly book Derma. 38 巻 13 頁～17 頁

及び時期

平成 12 年 8 月

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	中根 宏
<p>審査委員長 <u>伊藤 喜久</u> </p> <p>審査委員 <u>飯田 一</u> </p> <p>審査委員 <u>若宮 伸隆</u> </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p style="text-align: center;">Elafin a Secretory Protein, is Cross-Linked into the Cornified Cell Envelopes from the Inside of Psoriatic Keratinocytes (分泌蛋白であるelafinは乾癬において辺縁帯の構成成分 として表皮細胞の内側から架橋される)</p>			
<p>Elafin は分子量 6 kDaの分泌性蛋白で、正常表皮では発現せず、尋常性乾癬や創傷治癒過程など細胞増殖性の高い表皮に発現し、細胞外ではserine protease inhibitorとして組織保護作用に、細胞内では皮膚辺縁帯の架橋成分として、表皮の物理的バリアーとしての機能を担うとされる。</p> <p>架橋成分として唯一の分泌蛋白であるelafin の、架橋形成に関わる機序はこれまで明らかにされていないことから、申請者は架橋主要成分であるinvolucrinとの比較対照から、尋常性乾癬表皮におけるelafinの局在を免疫組織化学的、免疫電顕的に検索を行い解明を進めた。</p> <p>免疫組織染色は抗ヒトelafin家兎抗体、抗ヒトinvolucrinマウスモノクローナル抗体を行いFITC, Texas Red標識抗体により染色した。一方、post-embedding免疫電顕はLowicryl K11Mにより包埋し一次抗体を反応させた後、サイズの異なる (5, 10 nm) colloidal gold標識抗体にて二重染色した。Pre-embeddingは乾癬皮膚角層を細切し、還元処理した後、一次抗体、colloidal gold標識抗体を反応させて、固定し、通常の方法によりエポキシ樹脂に包埋した。</p>			

この結果、免疫組織化学染色ではelafinは有棘層で発現し、上層に向かって強く染色される“うろこ”状を示し、これらはinvolucrin遅れて発現が見られた。post-embedding免疫電顕においては、有棘層でゴルジ装置、層状顆粒に局在し、角層では一部辺縁帯に沿っての局在、細胞内のびまん性の分布、細胞外への分泌が認められた。さらに免疫電顕2重染色においては、辺縁帯形成初期にinvolucrinが出現するのに対しelafinは細胞内にびまん性に分布し、辺縁帯形成の成熟に伴いここでの局在が初めて認められた。Pre-embedding法2重染色により、involucrinと同側の細胞内に共存局在することが示され、細胞内からの架橋形成に関わることが最終的に示された。

本研究は、尋常性乾癬の角化過程におけるelafinの細胞内局在を、免疫組織化学的、免疫電顕的に追跡し、elafinの高度の発現が誘導され、表皮の発達過程において細胞内に分泌され、角層の辺縁帯に移動して細胞内から構成成分となることを初めて示した。尋常性乾癬の病態解明、さらには扁平上皮細胞に広く局在分布する本蛋白の機能を明らかにする上からも新たな道を開いた研究で、今後の研究の進展が期待される。

発表後、本研究、将来への展開も含めた関連領域について質疑を行い、適切かつ明快な回答が得られ、本学の博士を授与するにふさわしい知識、技能を有すると考え、全員一致で合格とした。

本研究はJournal of Investigative Dermatology 119巻5号に公表されている。