



Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

角化症研究会記録集 (2003.12) 18巻:25～29.

表皮層板顆粒形成機構の形態的解析

山本明美, 飯塚一



表皮層板顆粒形成機構 の形態的解析

山本明美, 飯塚 一
旭川医科大学皮膚科

Morphological analysis of epidermal
lamellar granule formation

Ishida-Yamamoto A, Iizuka H
(Department of Dermatology, Asahikawa Medi-
cal College)

はじめに

層板顆粒は角化性重層扁平上皮に特有の分泌顆粒で、バリア機構の形成と落屑に重要な働きかけをしていると考えられる。層板顆粒が含む物質としては、glucosylceramides (GlcCer) などの脂質, cathepsin D (CatD) などの加水分解酵素や、その他の蛋白質として corneodesmosin (Cdsn) などがある。層板顆粒は透過電顕では楕円形の膜に包まれた顆粒であり、有棘細胞において、おそらくゴルジ小体から形成され、細胞表面に向かって移動し、顆粒の膜が最も表層の顆粒細胞の表層側の細胞膜と癒着し、細胞外に顆粒内容が放出されるとみなされてきた¹⁻³⁾。

しかし最近、Norlenは層板顆粒がこれとは異なる構造をもつという 'membrane folding' モデルを提唱した^{4,5)}。これによれば、ゴルジ小体のトランス側のネットワークである trans Golgi network (TGN)、層板顆粒および顆粒層と角層の境界部の細胞外空間は連続した膜でつながっているという。層板顆粒の形成に関しては、その他にも多くの未知な部分がある。たとえば、各種層板顆粒関連分子の発現が同時に起きているのか、あるいは別個に発現しているのか知られていない。また、層板顆粒に含まれるさまざまな分子が、果たして同一の顆粒に混在しているのか、それとも別の物質は別の顆粒によって運ばれていくのかも知られていない。

われわれは層板顆粒の全体構造と顆粒内容物の合成、輸送機構を明らかにするために、正常ヒト表皮における GlcCer, CatD, kallikrein (KLK) 7, KLK 8 および Cdsn の局在を検討した。

材料と方法

1 次抗体として、Cdsn (G36-19, F28-27)⁶⁾, KLK7⁷⁾, KLK8⁸⁾, GlcCer⁹⁾ (Glycobiotech, Kuelns, Germany), CatD (Oncogene, San Diego, CA) および TGN46 (Sero-tec, Oxford, UK) に対する抗体を用いた。蛍光抗体法の 2 次抗体としては、Alexa-Fluor 488 goat anti-rabbit IgG highly cross-absorbed (Molecular Probes, Eugene, OR); Cy3-labeled goat anti-mouse IgG (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK); および Cy3-conjugated affinity-purified donkey anti-sheep IgG (Chemicon International, Temecula, CA) を用いた。免疫電顕の 2 次抗体としては 10-nm もしくは 5-nm のイムノゴールド (Amersham Bioscience, BBI International, Cardiff, UK) を用いた。

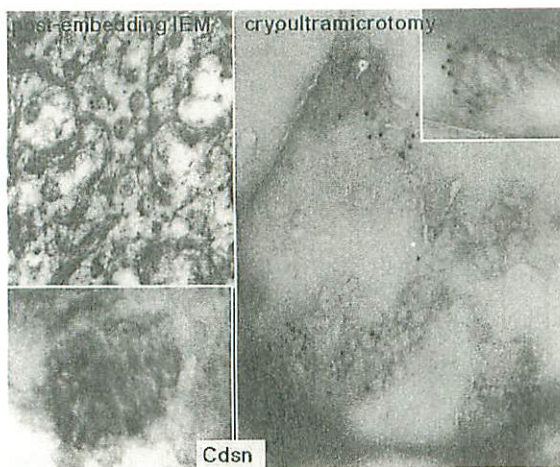


写真1-用いる電顕方法によって層板顆粒の形態は異なってみえる。Cdsnの免疫電顕。左はLowicryl HM20 樹脂を用いた, post-embedding法で, 孤立し, 独立した層板顆粒がみえる。右は cryo-ultramicrotomy 法で, 層板顆粒は連続性の網目状構造をとる。

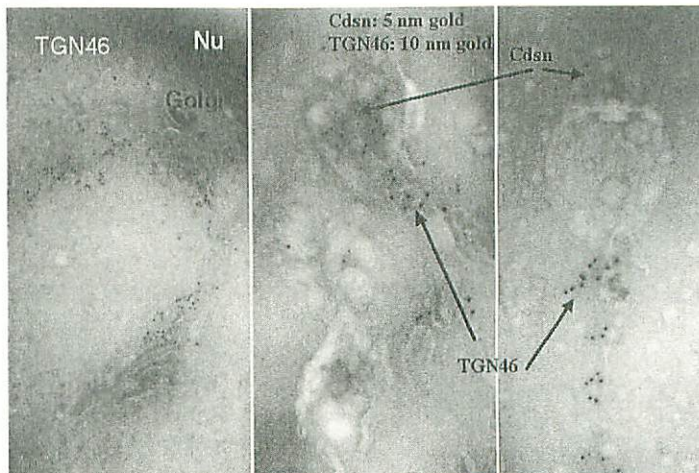


写真2-層板顆粒に含まれる分子はTGNから連続した袋状の部分に現れる。TGN46の標識は核(Nu)の近くにあるゴルジ小体(Golgi)の trans面にあるTGNに認められる(左)。Cdsnの標識はTGN46陽性の管状構造から連続した袋状部分に認められる(中央, 右)。

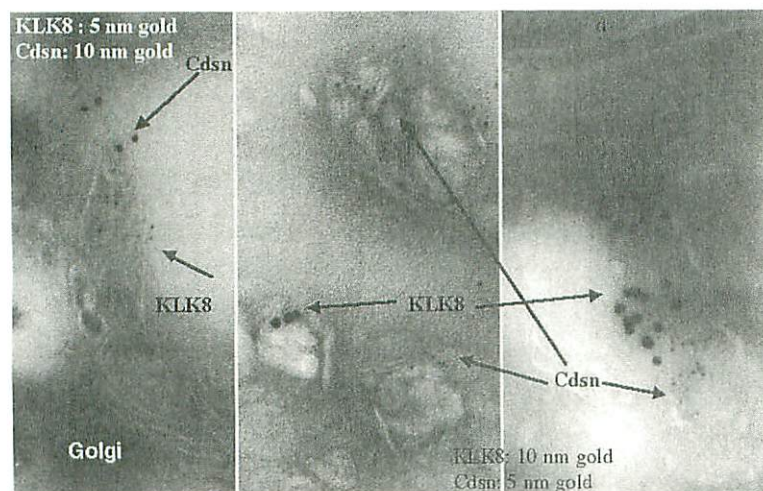


写真3-層板顆粒分子は凝集塊となって存在する。CdsnとKLK8の標識はゴルジ小体 (Golgi)の袋状の突出部(左)や連結した小胞内に現れる(中央, 右)。d: デスマゾーム。

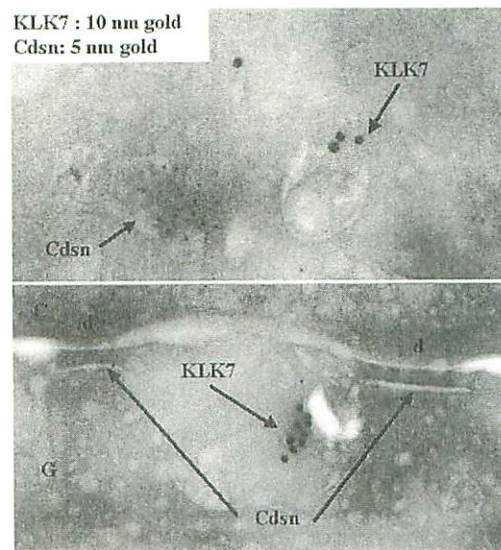


写真4-CdsnとKLK7の局在。CdsnとKLK7は独立した凝集塊として現れる(上)。顆粒層(G)と角層(C)の境界部の細胞外では, Cdsnの標識はデスマゾーム(d)の細胞外部分に局限しているが, KLK7の標識はデスマゾーム以外の部分にある。

蛍光抗体法

正常ヒト皮膚を2% paraformaldehyde/phosphate buffered saline (PBS)にて1時間, 4℃ 固定し, 凍結切片を作成した。核はpropidium iodide (Sigma Chemical, St Louis, MO)もしくはTO-PRO-3 (Molecular Probes)にて染色した。蛍光像はargon-ion laser (excitation lines at 488nm), Helium Neon Green laser (excitation lines at 543nm)およびHelium Neon Red laser (excitation lines at 633nm)を搭載したFluoviewFV500共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus, Tokyo)にて観察した。画像はFluoview version 2.0 software (Olympus America Inc, Melville, NY)にて獲得した。

免疫電顕法

Lowicry K11M樹脂およびLowicry HM20樹脂を用いたPost-embedding法はすでに報告した方法によった¹⁰⁾。超薄凍結切片による方法はTokuyasu法¹¹⁾によった。

結 果

蛍光抗体法

層板顆粒関連分子の発現と細胞内局在をまず蛍光抗体法にて観察した。KLK7とKLK8は最も表層の顆粒層で発

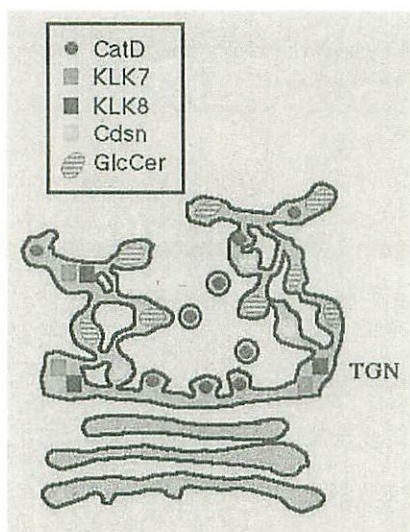


図-角化細胞内における層板顆粒分子の輸送のモデル図。

層板顆粒はTGNから連続した分岐する管状構造であり、KLK7、KLK8、Cdsn、GlcCerはそれぞれ凝集塊をつくってTGNの袋状突出部から運ばれる。CatDのいくつかはTGNから出る小胞によって運ばれ、後に層板顆粒に合流するのかもしれないが、はじめから層板顆粒に組み込まれるものもあるかもしれない。

現していた。Cdsnはそれよりやや下層から発現しており、GlcCerはこれと同時かあるいはやや下層から発現していた。CatDは表皮全層で発現していたが、顆粒層で最も強く発現していた。高倍率では、これらは細胞質内の小顆粒に一致しているようにみえた。TGNとの関連を明らかにするために、TGN46との2重染色を行った。TGN46は主にTGNに局在することが知られている糖蛋白である¹²⁾。表皮全層の核周囲がTGN46陽性であり、層板顆粒関連分子の局在と部分的に重なっていた。

免疫電顕法

層板顆粒関連分子の細胞内局在をより詳細にみるために免疫電顕を行った。post-embedding法では層板顆粒は通常の透過電顕と同様に孤立性の顆粒として観察された(写真1左)。しかしcryo-ultramicrotomy法では、層板顆粒は部分的に層板構造をもつ分岐した管状構造としてみえた(写真1右)。後者の方法のほうがよく膜構造を保っていたので、この後の研究ではこの方法を用いることとした。この分岐管状構造はTGN46陽性のTGNと連続していた(写真2)。Cdsn、KLK7、KLK8、CatDおよびGlcCerは、すべてこの分岐管状構造の中にそれぞれ凝集して標識がみられた(写真1~4)。TGNではCdsn、KLK7、KLK8およびGlcCerに陽性の袋状の突出部がみられた。CatDの標識はTGN部分の小胞内にみられた。顆粒細胞

と角層細胞の境界部ではCdsnの標識はデスモゾーム部分に、その他の分子はそれ以外の部分にみられた。

考案

本研究によりわれわれは、複数の層板顆粒関連分子の局在を検討し、これらが独立したタイミングで発現し、別個に輸送されることを示した。この意義に関連して、CdsnはKLK7の基質であるという事実は注目に値する¹³⁾。すなわち酵素と基質が別個に運ばれることにより基質の分解が細胞内で起きることを防いでいることが示唆される。また、顆粒内容が凝集塊として存在するという事は、分子を濃縮し、分別し、正しく輸送するうえで意味のあることかもしれない。そのようなしくみは他の一般的な分泌細胞においてよく知られているところである。層板顆粒が連続した管状構造であったという観察結果は、Norlenの'membrane folding'モデルを支持するものである^{4,5)}。この像はまた、Eliasらの観察結果とも矛盾しない¹⁴⁾。

以上の観察結果から、われわれが考えた層板顆粒の構造と分子輸送のモデルを図に示した。

文 献

- 1) Hayward AF: Membrane-coating granules. *Int Rev Cytol* 59: 97-127, 1979.
- 2) Odland GF, Holbrook K: The lamellar granules of epidermis. *Curr Probl Derm* 9: 29-49, 1981.
- 3) Landmann L: The epidermal permeability barrier. *Anat Embryol* 178: 1-13, 1988.
- 4) Norlen L: Skin barrier formation: the membrane folding model. *J Invest Dermatol* 117: 823-829, 2001.
- 5) Norlen L, Al-Amoudi A, Dubochet J, et al: A cryotransmission electron microscopy study of skin barrier formation. *J Invest Dermatol* 120: 555-560, 2003.
- 6) Serre G, Mills V, Haftek M, et al: Identification of late differentiation antigens of human cornified epithelia, expressed in re-organized desmosomes and bound to cross-linked envelope. *J Invest Dermatol* 97: 1061-1072, 1991.
- 7) Tanimoto H, Underwood LJ, Shigemasa K, et al: The stratum corneum chymotryptic enzyme that mediates shedding and desquamation of skin cells is highly overexpressed in ovarian tumor cells. *Cancer* 86: 2074-2082, 1999.
- 8) Underwood LJ, Tanimoto H, Wang Y, et al: Cloning of tumor-associated differentially expressed gene-14, a novel serine protease overexpressed by ovarian carcinoma. *Cancer Res* 59: 4435-4439, 1999.
- 9) Brade L, Vielhaber G, Heinz E, et al: In vitro characterization of anti-glycosylceramide rabbit antisera. *Glycobiology* 10: 629-636, 2000.
- 10) Nakane H, Ishida-Yamamoto A, Takahashi H, et al: Elafin, a secretory protein, is cross-linked into the cornified cell envelopes form the inside of psoriatic keratinocytes. *J Invest Dermatol* 119: 50-55, 2002.
- 11) Tokuyasu KT: Use of poly(vinylpyrrolidone) and poly(vinyl alcohol) for cryoultramicrotomy. *Histochem J* 21: 163-171, 1989.

- 12) Ponnambalam S, Girotti M, Yaspo ML, et al.: Primate homologues of rat TGN38: primary structure, expression and functional implications. *J Cell Sci* 109: 675-685, 1996.
- 13) Simon M, Jonca N, Guerrin M, et al.: Refined characterization of corneodesmosin proteolysis during terminal differentiation of human epidermis and its relationship to desquamation. *J*

- Biol Chem* 276: 20292-20299, 2001.
- 14) Elias PM, Cullander C, Mauro T, et al.: The secretory granular cell: the outermost granular cell as a specialized secretory cell. *J Invest Dermatol Dermatol Symposium Proceedings* 3: 87-100, 1998.

DISCUSSION

秋山 非常におもしろいデータをありがとうございます。僕自身が知りたくてたまらないところだったので、うれしいやら悲しいやらというところですが、2つお尋ねしたいと思います。

lamellar granuleの中身は1個1個別のものメインの中身は違う、ヘテロな顆粒だという結論だと思います。われわれ電顕屋がずっとみてきた古典的な層状の構造は、中身が違うことによる形態的な差異は果たしてあるのですか。脂質がたくさん詰まっているlamellar granuleもあれば、コルネオデスモシンみたいなものがたくさん詰まっているものもあるでしょうが、それは形態的にはみんな同じ層板構造を持った顆粒としてみられるのでしょうか。

山本 先生も長らく電顕をやっているのご経験があると思いますが、通常電顕では細胞の中に何も無いところがありますね。おそらく本当は、そこにいろいろな分子を含んだ層板顆粒の管状構造の続きがあると思います。そこがアルコール脱水などしている間になくなってしまっている。層板顆粒としてみられる層板のあるものは、主にグルコシルセラミドなどの脂質を含むもののだけが最終的に観察されたものではないか。そうでないと説明しにくいと私も思っています。私も先生と同じように、いつもみる層板顆粒はだいたい層板を持ってると認識しています。

秋山 古典的な電顕でみていた層板顆粒は、やはり脂質がメインにある。

山本 おそらくそうではないかと思えます。

秋山 もう一つお聞きしたいのですが、共焦点顕微鏡で、倍率を上げて分解能を高めることによって、たとえばTGN46の抗体を使ってゴルジのネットワークをみることはできるのでしょうか。

山本 それはやってみました。うまくネットワーク構造が得られませんでした。

培養細胞でやるにしても、lamellar granuleを放出させるほど分化させたものを観察するのなかなか難しいなと思っています。清水 先生のお仕事でpost-embeddingではよくみえないということですが、それはいくら低温でもメタノールかアセトンで抽出されてしまうからというお考えですか。

山本 内容物が抽出されて、おそらく膜状構造もあまりみられない。先生もご存じのように、K11M樹脂では層板顆粒はあまりうまくでませんね。今日お示したのはHM20のLowicrylですが、それでもあれぐらいで、数珠状になっているところは観察されないの、そのへんの膜構造の保持が不十分なのではないかと思っています。

清水 先生もお考えかもしれませんが、押さえで、液体ヘリウムか何かでボンと凍結固定して、それを80℃で2%GAウランか何か入れたもので漬けて形態だけみる方法がありますね。あの方法で脂も置いたまま形態を電顕でみるとします。先生の説が正しいとすると、つながったボディがきれいにみえるのではないかと思います。

山本 私のところではその施設がないのでやっていませんが、最初のほうの文献で紹介したNorlenという人たちがJIDに発表しています。無固定で凍結したものの電顕をみていますが、そこではあの説を支持するような一続きの構造があったとJIDに写真も載っているの、おそらくそれが正しいのだらうと思っています。

石橋 たいへんすばらしいお仕事の発表をありがとうございます。私は古典的な電顕でいろいろな疾患をみてきて前から気がついていましたが、lamellar granuleはいろいろな形をしていますね。教科書に書いてあるような内部がきれいな層板構造をすることもありますが、小胞状の構造をとったり、中が膨らんだり、病態の違いでいろいろ変わってしまうような構造のように思っていました。

デスモソームは最近細かいことまでよく研究されているのに、lamellar granuleについてはあまり検索が進んでいないようなので、そのへんのことが知りたいと思っていました。ああいう構造が疾患別に出るのか、あるいは状態によって変わった形をとるのか、それが解明されると面白いと思います。先生のお話をうかがって、これからもっとそのへんの研究が進むことを期待しております。いい話をどうもありがとうございます。

山本 ありがとうございます。

小川 こういう観点からものごとをみるのは非常におもしろいことだと思ったのですが、基本的なこと、こういうgranuleがあったときには、はじめは必ず層板構造があって、染色に対する安定性が違うから残るものと消えるものがあるのか、あるいはlamellaがないものもある可能性があるのか。

当初いろいろなディスカッションもされましたが、さまざまな生物活性を持つものがどこに局在するかと考えたときに、私は多様性のあるものがあっても悪くはないのではないかと思います。どうですか。いまのお話では、lamellaは処理の過程で消えるものがあって、たまたま残るものをこれまでの古典的な染色法では見ていた。しかしもっとファインなものでやることでみえるものが増えてきたという話になったわけですね。

山本 先生のおっしゃった2つの考え方のあとのほうが正しいのではないかと考えています。石橋先生もお話しになられたように、必ずしも層板ばかりではなく、中に小胞がみられる構造もあるので、ヘテロニアスではないかと思っています。

小川 私もそう思います。形態学の観点でみると前者のような考えがあるかもしれないけれども、いろいろな生物活性を持った物質が、これまでも分離されてきています

ので、その局在をみたときに多様なものがあつたと考えたほうがいいと思います。

山本 ありがとうございました。

池田 ある分子が集まってつくられて、送られてきて、また違う物質が送られていくという現象は、ゴルジの中で証明されているのでしょうか。

山本 たとえば内分泌細胞や神経内分泌細胞は、分泌顆粒をつくるときに効率よく顆粒をつくるために、枠組みをつくる分子とホルモンなどが一緒になって、枠組みの筏の上にホルモンやニューロトランスミッターが集合体として存在して、コンパクトな形になって、効率よくゴルジから分泌顆

粒として出ていくという考えがあります。ですから、おそらく同一の分子を固めるなら別機能を果たすものがある。

池田 シャペロンみたいなものですね。それでシャペロンに乗って、あるものが先に行って、次のものがまた行っているわけですね。

山本 はい。この中には基質と酵素が一緒に入ると困るものもあります。コルネオデスモシンはカリクレインの中のあるもので消化されることが示されています。消化されてしまつては困るので、基質と酵素を別々に運ぶ巧妙な仕組みがああいう形で現れているのではないかと考えています。

池田 まさに、宅急便みたいなものですね。(笑)

座長—池田志幸
順天堂大学医学部皮膚科

秋山真志
北海道大学大学院医学研究科皮膚科

清水 宏
北海道大学大学院医学研究科皮膚科

石橋康正
東京通信病院名誉院長

小川秀興
順天堂大学医学部皮膚科