

AMCoR

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

角化症研究会記録集 (1999.02) 13巻:24～26.

正常ヒト表皮とloricrin keratodermaにおける角化細胞終末分化に際する
プロフィラグリンN末ドメインの核内移行

山本明美, 高橋英俊, 飯塚一, DaleBA



正常ヒト表皮とloricrin keratodermaにおける角化細胞終末分化に際するプロフィラグリンN末ドメインの核内移行

山本明美, 高橋英俊, 飯塚 一
旭川医科大学医学部皮膚科

BA Dale
University of Washington

Nuclear translocation of N-terminal profilaggrin domain in the keratinocyte terminal differentiation of normal skin and loricrin keratoderma

Akemi Ishida-Yamamoto, Hidetoshi Takahashi, Hajime Iizuka
(Department of Dermatology, Asahikawa Medical College, Asahikawa, Japan)
Beverly A. Dale
(Departments of Medicine (Dermatology), Oral Biology, and Biochemistry, University of Washington, Seattle, Washington, USA)

プロフィラグリンは表皮角化細胞が顆粒層において発現する蛋白で、ケラトヒアリン顆粒の主成分となる。プロフィラグリン分子はヒトでは10~12個のフィラグリンドメインがリンカードメインでつながった部分と、これを挟むN, C末端ドメインからなる。¹⁻³⁾角化細胞が顆粒層から角層へ移行する過程でプロフィラグリンは蛋白分解を受け、リンカー部分が外れて個々のフィラグリンドメインが放出され、ケラチン線維を凝集させて角質細胞の緻密な細胞質の形成がなされると考えられている。一方、両末端ドメインのほうも、特にN末ドメインのA, BサブドメインのうちAドメイン内にはカルシウム結合ドメインがあることから角化過程に何らかの重要な機能があるものと推定されているが、まだ解明されていない。

今回われわれはプロフィラグリンのN末ドメインおよびフィラグリンドメインに特異的な抗体を用いた免疫電顕的観察により正常表皮でのN末ドメインのユニークな挙動を明らかにすることができたので報告する。さらに、最近われわれが同定した遺伝性角化異常症の1つであるloricrin keratoderma^{4,5)}においてこのN末ドメインの局在の異常が認められたので併せて報告する。なお本研究の詳細はすでに原著論文として報告している⁶⁾。

材料と方法

正常ヒト皮膚と、われわれがすでにロリクリン遺伝子の変異の存在を報告したprogressive symmetric erythrokeratodermaの1家系⁵⁾に属する患者2名の生検皮膚組織をすでに報告した方法⁶⁾によりpost-embedding法による免疫電顕に供した。また同じ材料を用いてOncor社のApop Tag fluorescein *in situ* apoptosis detection kitにより断片化DNAを検出した。免疫組織化学に用いた一次抗体はフィラグリン抗体(BT576, Biomedical Technologies, Stoughton, MA), プロフィラグリンのN末内のAドメインおよびBドメインに対する抗体³⁾およびヒトのロリクリンとも反応するmouse loricrin C-terminal peptideに対する抗体 (AF62, Berkeley Antibody Company, California)である。

結果

正常皮膚ではフィラグリン, Aドメイン, Bドメインいずれの抗体も表皮顆粒層と角層の細胞質が陽性であったが(写真1), それに加えてAドメイン, Bドメインの抗体にのみ顆粒層と角層の間に粗大顆粒状の陽性構造が観察された。この構造の本体を免疫電顕により検索すると、移行細胞(transition cell)の凝集した核であることがわかっ

写①
p.123

写② た(写真2)。フィラグリンドメインのほうは移行細胞では
p.123
写③ むしろ核よりも胞体に密に分布していた(写真3)。2重染
p.123
色をすると顆粒細胞内ではフィラグリンドメインとN末
端のA, Bドメインはともにケラトヒアリン顆粒内に共
存しているが, 移行細胞では分かれて存在することが明
瞭となった。

一方, loricrin keratodermaであるprogressive sym-
metric erythrokeratodermaの患者皮膚では, やはりフ
ィラグリン, Aドメイン, Bドメインの各抗体は顆粒層,

写④ 角層に陽性であったが(写真4), A, Bドメインの粗大顆粒
p.123
状の陽性構造が数層にわたって多数観察された。これは
移行細胞および角質細胞内に遺残した核が陽性に染色さ
れたものであることが免疫電顕により示された(写真

写⑤ 5)。核内にはloricrin keratodermaに特徴的なロリクリ
p.123
ンの凝集塊が存在するが, A, Bドメインはそれを取り囲
むように分布していた。一方, フィラグリンドメインは下
層では主に胞体内に, 上層では胞体内, 核内にびまん性

写⑥ に存在した(写真6)。
p.123

正常表皮やloricrin keratodermaのこれらプロフィラ
グリンN末ドメイン陽性の核はDNAの断片化を検出す
る *in situ* nick endlabeling法で陽性であった。

考 按

これまでの報告でプロフィラグリンのN末ドメインは
蛋白分解酵素によってフィラグリンドメインから分離す
ること, 一部は辺縁帯上にその標識がみられることから
辺縁帯の成分の1つとなることが示されているが^{2,3)}それ
以外の機能については不明であった。今回われわれは正
常表皮が分化の過程で核を失う直前にプロフィラグリ
ンのN末がその核に移行していることを発見した。このド
メインの核内移行のメカニズムは現時点では不明であ
が, Aドメインが表皮の分化やアポトーシス一般に関与
が報告されているカルシウムの結合部位を含んでいるこ
とを考え併せると角化に伴う脱核現象に重要な働きをし
ていることが予想される。

Loricrin keratodermaはわれわれが同定したloricrin
遺伝子の変異による優性遺伝性の角化異常症で, 現在ま
でにVohwinkel症候群の中の魚鱗癬を伴う亜型とpro-
gressive symmetric erythrokeratodermaの亜型と思わ

れる掌蹠角化症が著明な例がこれに含まれる^{4,5)}。遺伝子
変異はheterozygousであり, 疾患は優性遺伝性であるこ
とより, 患者表皮で変異loricrinは何らかのdominant
negative effectを持つものと考えられる。今回われわれ
が示したプロフィラグリンN末端がロリクリンの凝集塊を
含む核に集積したまま角層内で体積している像は変異ロ
リクリンがプロフィラグリンN末端と何らかの相互作用
のもとに脱核の段階で角化の進行を妨げていることを示
しているように思われる。

今回のわれわれの発見が, これまでまったく知られて
いなかったプロフィラグリンN末端の角化における重要
な機能を明らかにする糸口となること, さらにloricrin
keratodermaを含む角化異常症の病態の解明と新しい
治療法の開発につながることを期待したい。

本研究の一部は資生堂からの研究助成金によって行われた。

文 献

- 1) Dale B A, Resing K A, and Presland R B: Keratohyalin granule proteins. Leigh IM, Lane EB and Watt FM ed. The keratinocyte handbook. Cambridge, Cambridge University Press, p323-350, 1994
- 2) Dale B A, Presland R B, Lewis S P, Underwood R A, and Fleckman P. Transient expression of epidermal filaggrin in cultured cells causes collapse of intermediate filament networks with alteration of cell shape and nuclear integrity. *J Invest Dermatol* 108: 179-187, 1997
- 3) Presland R B, Kimball J R, Kautsky M B, Lewis S P, Lo C Y, and Dale B A: Evidence for specific proteolytic cleavage of the N-terminal domain of human profilaggrin during epidermal differentiation. *J Invest Dermatol* 108: 170-178, 1997
- 4) Ishida-Yamamoto A, Takahashi H, and Iizuka H: Loricrin and human skin disease: molecular basis of loricrin kratoderma. *Histol Histopath* 13: 819-826, 1998
- 5) Ishida-Yamamoto A, McGrath J A, Lam H, Iizuka H, Friedman R A, and Christiano A M: The molecular pathology of progressive symmetric erythrokeratoderma: a frameshift mutation in the loricrin gene and perturbations in the cornified cell envelope. *Am J Hum Genet* 61: 581-589, 1997
- 6) Ishida-Yamamoto A, Takahashi H, Presland R B, Dale B A, Iizuka H: Translocation of profilaggrin N-terminal domain into keratinocyte nuclei with fragmented DNA in normal human skin and loricrin keratoderma. *Lab Invest*. 78: 1245-1253, 1998
- 7) Ishida-Yamamoto A, and Iizuka H: Structural organization of cornified cell envelopes and alterations in inherited skin disorders. *Exp Dermatol* 7:1-10, 1998

DISCUSSION

高橋 ただいまのご発表に対しまして, ご
討論をお願いします。
須賀 きれいなスライドをみせていただき

まして, どうもありがとうございました。
先生は, 変異ロリクリンがなぜ核内に移行
されるか, その機序をある程度予想されて

いるでしょうか。

山本 次の先生の演題をたいへん楽しみに
していますが, その前に先生のVohwinkel

症候群のモデルマウスでも核内にロリクリンが移行していましたか。

須賀 後ほど、供覧させていただきます。

山本 Vohwinkel症候群とerythrokeratodermiaで、なぜか両方とも核内に移行しているということがあって、アミノ酸変異部分に非常にアルギニンに富む部分があります。そういったアミノ酸の変化が、何らかの機序により局在の変化をもたらすのではないかと考えております。この部分に典型的な核内移行シグナルはないのですが、核移行のメカニズムは当初考えられていたよりもはるかに複雑です。典型的核内移行蛋白に結合することにより一緒に核内に移行するような蛋白があったり、あるいは蛋白のリン酸化の影響で普段は核内移行しないものが移行していたりすることが報告されています。正常のロリクリンでも分子量は小さいので、自由に核膜孔を通り抜けて核内でも核外でも分布しますが、アミノ酸のチャージが変わることで核内に集積するのではないかと考えています。

須賀 フィラグリンのA、Bドメインの場合も、特に移行シグナルみたいなものは存在しませんか。

山本 Bドメインのほうに少しそれに近い配列はありますが、そのところが発現するようなコンストラクトを構築して、増殖している細胞に一過性に発現させても核内移行はみられませんでした。それから考えると表皮の分化という特殊な状態では、また話は違ってくるのかもしれませんが。その場合例えばフィラグリン・ドメインもプロフィラグリンから分解されて放出されています。フィラグリン・ドメインのほうにアポトーシスを誘導するような働きがあるということが去年『J Invest Dermatol』に報

告されていたので、ある程度修飾された核でのみ核内に移行する可能性もあると考えています。

須賀 どうもありがとうございました。

高森 昔、われわれはトランジション・セルの状態では細胞内の小器官が消化されて消失し、それから角層へ移行しているので、そこではプロテアーゼが活性化していると想定していました。カテプシン系プロテアーゼが活性化して、トランスグルタミナーゼなども活性化されますが、プロテアーゼによって分解される結果フィラグリンの核内移行が起きる可能性についてはいかがでしょうか。また、最近プロテアーゼがアポトーシスを誘導するといわれていますので、そのへんとの関係を教えていただきたいと思います。

山本 今回の実験ではプロテアーゼの活性化、アポトーシスに関連しているカスパーゼの活性化はまだ検討していないので、今後の課題にさせていただきたいと思います。ありがとうございました。

北島 どうもありがとうございました。いまのことに関係しますが、ロリクリン角化症ではトランジション・セルは正常に比べて多かったのでしょうか、少なかったのでしょうか。

山本 水平に観察していきますと、常にトランジション・セルが介在しているので、その段階を観察するチャンスは多いと思います。

北島 先生のスライドから判別すると私も多いと思いますが、先生は、この現象は両方ともパラケラトーシスとおっしゃいました。しかしパラケラトーシスには2種類あって、1つは非常に表皮角化細胞のターンオーバー(角化細胞の上方移行)が早いもの、も

う1つは、角化細胞の上方移行のスピードが非常に遅いためにトランジション・セルの時間が長くなって、トランジション・セルをみるチャンスが多くなる場合です。ここでみえているものは、一見パラケラトーシスにはみえるのですが、ロリクリン角化症の時の核は上に行くとも全部消えてしまいませんね。つまり、角化の異質化はないのではないのでしょうか。

山本 最表層では消えています。

北島 いままでわれわれが知っているパラケラトーシスは、角化細胞の上方移行のスピードが早く完全角化への角化の進行が追いつかないのですが、この疾患ではただ単に角化のスピードが遅いだけではないのでしょうか。そうするとここでみられる現象は、先ほど高森先生がいわれたように、普通は観察することのできないトランジション・セルの生物学的な正常の角化反応がみられるようになっていただけかもしれません。ロリクリンの異常つまりN末が核に行くことが角化する表皮細胞の上方移行のスピードを遅くすることによってトランジション・セルが多くみられてきたのではないかと思います。

山本 先生のおっしゃることが恐らく正しいと思います。

高橋 山本先生、どうもありがとうございました。

座長—高橋昌江
近畿大学医学部皮膚科

須賀 康
順天堂大学医学部皮膚科

高森建二
順天堂大学医学部附属浦安病院皮膚科

北島康雄
岐阜大学医学部皮膚科

5. 正常ヒト表皮とloricrin keratodermaにおける角化細胞終末分化に際する
プロフィラグリンN末ドメインの核内移行

写真1-正常表皮のフィラグリン(A), Aドメイン(B)およびBドメイン(C)染色。後2者に粗大顆粒状の陽性構造(矢頭)が観察される。
Bar=50 μ m

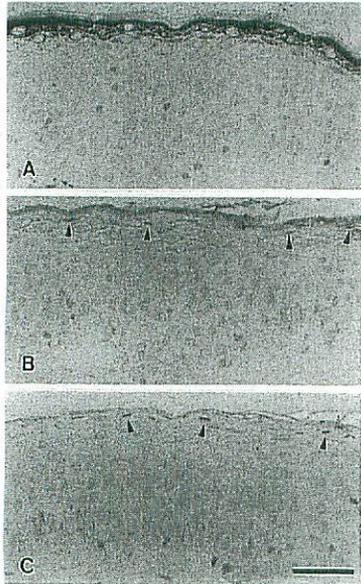


写真4-Loricrin keratodermaでもフィラグリン(A), Aドメイン(B), Bドメイン抗体(C)は顆粒層と角層に反応する。後2者では粗大顆粒状の陽性構造が角層に多数観察される。Bar=50 μ m

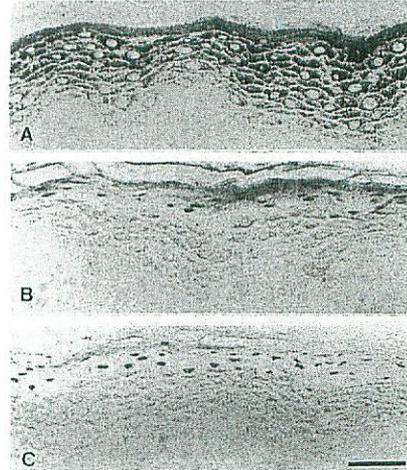


写真2-正常表皮移行細胞の核(Nu)に強くAドメインの反応がみられる。辺縁帯上への標識も認める(矢頭)。

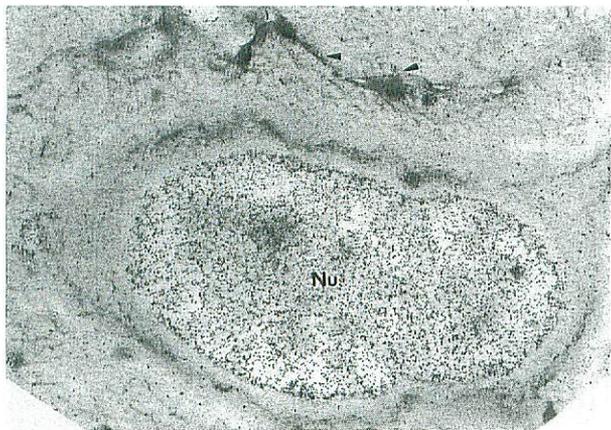


写真5-Loricrin keratodermaの角層内に遺残した核(Nu)はロリクリン凝集塊(*)を含み、それをAドメインの反応が取り囲んでいる。辺縁帯上の標記も認める(矢頭)。

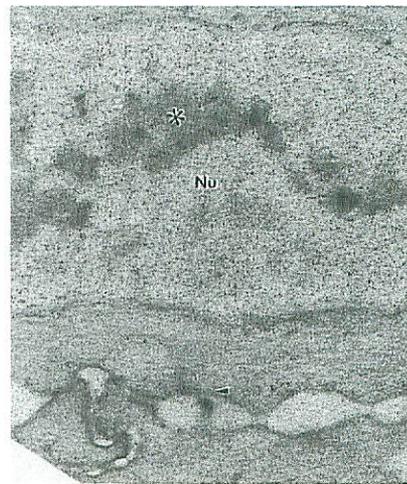


写真3-正常表皮の移行細胞。フィラグリンの反応は核(Nu)を避けて胞体内にみられる(A)。Bは一次抗体を除いて反応させた陰性コントロール。

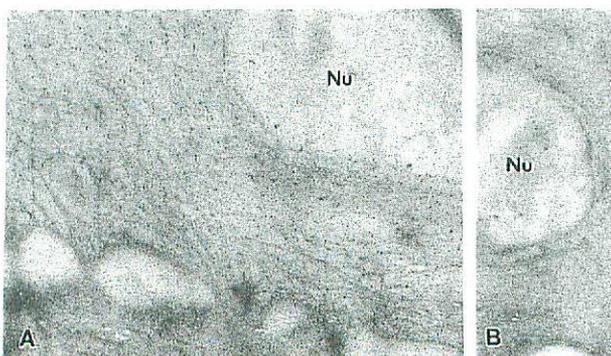


写真6-Loricrin keratodermaの角層細胞の核(Nu)内と胞体内にびまん性のフィラグリンの反応がみられる。*はロリクリン凝集塊。

