

4406 257/8

角化細胞辺縁帯形成機構の細胞生物学的検討

(研究課題番号：10470184)

平成10年度～平成12年度科学研究費補助金 (基盤研究(B)(2))
—研究成果報告書—

平成13年2月

研究代表者 山本明美
(旭川医科大学医学部講師)

角化細胞辺縁帯形成機構の細胞生物学的検討

(研究課題番号：10470184)

平成10年度～平成12年度科学研究費補助金(基盤研究(B)(2))
研究成果報告書

平成13年2月

研究代表者 山本明美
(旭川医科大学医学部皮膚科講師)

はしがき

臓器としての皮膚がはたす最も重要な働きのひとつはその内側の臓器を覆い、保護することである。表皮はその最も表層に存在する、生体と外界のインターフェイスである。表皮のさらに最表層である角層細胞には生体を各種の物理的、化学的侵襲からまもるための極めて強靱な構造が存在する。それが辺縁帯であり多数の蛋白が細胞膜の内面に架橋されて形成される。この生理的重要性はその架橋酵素の欠損により重篤な角化異常をきたすことでも証明されている。

さて、我々は過去10年以上にわたり辺縁帯の構成成分をはじめとする角化細胞の各種分化関連蛋白の発現、局在、機能を多方面から研究し、正常角化のメカニズムおよび各種角化異常症の原因、病態を明らかにしてきた。最近ではそれまで原因不明であったふたつの遺伝性角化異常症、すなわち「魚鱗癬を伴う Vohwinkel 症候群」と「掌蹠角化症を伴う進行性紅斑角皮症」が辺縁帯の主成分であるロリクリンの遺伝子変異によることを明らかにした。

本課題研究において我々はこれら過去の研究実績をふまえ、ロリクリ他いくつかの主要な辺縁帯成分の発現機構、細胞内局在、遺伝子異常による変化、架橋形成機構などを、細胞生物学的手法をはじめとする多方面からのアプローチにより明らかにした。特にそれまで全く知られていなかった構造蛋白の核内移行現象、すなわち「プロフィラグリンアミノ末端ドメインの終末分化に伴う核内移行」と「ロリクリン蛋白がヒトの遺伝性疾患をもたらす遺伝子変異によって核内移行シグナルを獲得する」ことを発見できたことは幸いであった。

研究組織

研究代表者：山本 明美（旭川医科大学医学部皮膚科講師）

研究協力者：高橋 英俊（旭川医科大学医学部皮膚科講師）

木山 博資（旭川医科大学医学部皮膚科教授）

加藤 英政（旭川医科大学医学部皮膚科助手）

研究経費

平成10年度 4300千円

平成11年度 1900千円

平成12年度 2300千円

計 8500千円

研究発表

- 1) Ishida-Yamamoto A, Takahashi H, Presland RB, Dale BA, 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
- 2) Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. Structural organization of cornified cell envelopes and alterations in inherited skin disorders. *Exp Dermatol*, 7: 1-10, 1998
- 3) Ishida-Yamamoto A, Takahashi H, Iizuka H. Loricrin and Human skin diseases: molecular basis of loricrin keratodermas. *Histol Histopathol*, 13: 819-826, 1998
- 4) Kon A, Pulkkinen L, Ishida-Yamamoto A, Hashimoto I, Uitto J. Novel COL7A1 mutations in dystrophic forms of epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*, 111: 534-537, 1998
- 5) Ishida-Yamamoto A, Tanaka H, Nakane H, Takahashi H, Iizuka H. Inherited disorders of epidermal keratinization. *J Dermatol Sci*, 18: 139-154, 1998
- 6) Inoue N, Kuwae K, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H, Shibata M, Yoshida S, Kato K, Shiosaka S. Expression of neuropsin in the keratinizing epithelial tissue - Immunohistochemical analysis of wild-type and nude mice. *J Invest Dermatol*, 110: 923-931, 1998
- 7) Matsuki M, Yamashita F, Ishida-Yamamoto A, Yamada K, Kinoshita C, Fushiki S, Ueda E, Morishima Y, Tabata K, Yasuno H, Hashida M, Iizuka H, Ikawa M, Okabe M, Kondoh G, Kinoshita T, Takeda J, Yamanishi K. Defective stratum corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1 (keratinocyte transglutaminase). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 1044-1049, 1998
- 8) Sasaki Y, Shimizu H, Akiyama M, Yoneda K, Ishida-Yamamoto A, Watanabe S, Hata J, Nishikawa T. Abnormalities of basal cell keratin in epidermolysis bullosa simplex do not affect the expression patterns of suprabasal keratins and cornified cell envelope proteins. *Arch Dermatol Res*, 290: 591-597, 1998
- 9) Kawagishi N, Hashimoto Y, Takahashi H, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. Epidermal cell kinetics of pig skin in vivo following UVB irradiation: Apoptosis induced by UVB is enhanced in hyperproliferative skin condition. *J Dermatol Sci*, 18: 43-53, 1998
- 10) Takahashi H, Kinouchi M, Tamura T, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. Adenylate cyclases in keratinocytes: FRSK cells express types I, II, III, IV, VI and VIII, and 1,25 (OH)₂D₃, retinoic acid and TPA augment forskolin-induced cyclic AMP accumulation in the absence of altered isozyme expression. *Arch Dermatol Res*, 290: 407-412, 1998
- 11) Takahashi H, Asano K, Manabe A, Kinouchi M, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. The α and η isoforms of protein kinase C stimulate transcription of human involucrin gene. *J Invest Dermatol*, 110: 218-223, 1998
- 12) Tamura T, Takahashi H, Ishida-Yamamoto A, Hashimoto Y, Iizuka H. Functional alteration of guanine nucleotide binding proteins (Gs and Gi) in psoriatic epidermis. *J Dermatol Sci*, 17: 61-66, 1998
- 13) Fujimoto W, Ishida-Yamamoto A, Hsu R, Nagao Y, Iizuka H, Yancey KB, Arata J. Anti-epiligrin cicatricial pemphigoid: a case associated with gastric carcinoma and features resembling epidermolysis bullosa acquisita. *Br J Dermatol*, 139: 682-687, 1998
- 14) Takahashi H, Asano K, Kinouchi M, Ishida-Yamamoto A, Wuepper KD, Iizuka H. Structure and transcriptional regulation of the human cystatin A gene. The 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) responsive element-2 site (-272 to -278) on cystatin A gene is critical for TPA-dependent regulation. *J Biol Chem*, 273: 17375-17380, 1998
- 15) Ishida-Yamamoto A, Tanaka H, Nakane H, Takahashi H, Iizuka H. Antigen retrieval of loricrin epitopes at desmosomal areas of cornified cell envelopes: an immunoelectron microscopic analysis. *Exp Dermatol*, 8: 402-406, 1999

- 16) Ishida-Yamamoto A, Yamauchi T, Tanaka H, Nakane H, Takahashi H, Iizuka H. Electron microscopic in situ DNA nick end-labeling and combination with immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem*, 47: 711-717, 1999
- 17) Tamai K, Murai, T, Mayama M, Kon A, Nomura K, Sawamura D, Hanada K, Hashimoto I, Shimizu H, Masunaga T, Nishikawa T, Mitsunashi Y, Ishida-Yamamoto A, Ikeda S, Ogawa H, McGrath JA, Pulkkinen L, Uitto J, the Japanese Collaborative Study Group on Epidermolysis Bullosa. Recurrent COL7A1 mutations in Japanese patients with dystrophic epidermolysis bullosa: positional effects of premature termination codon mutations on clinical severity. *J Invest Dermatol*, 112: 991-993, 1999
- 18) Ishida-Yamamoto A, Tanaka H, Nakane H, Takahashi H, Hashimoto Y, Iizuka H. Programmed cell death in normal epidermis and loricrin keratoderma. Multiple functions of profilaggrin in keratinization. *J Invest Dermatol Symposium Proceedings*, 4: 145-149, 1999
- 19) Takahashi H, Asano K, Nakamura S, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. Interferon- γ -dependent stimulation of human involucrin gene expression: STAT-1 protein activates involucrin promoter activity. *Biochem J*, 344: 797-802, 1999
- 20) Takahashi H, Ishida-Yamamoto A, Kishi A, Ohara K, Iizuka H. Loricrin gene mutation in a Japanese patient of Vohwinkel's syndrome. *J Dermatol Sci*, 19: 44-47, 1999
- 21) Takahashi H, Nakamura S, Asano K, Kinouchi M, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. Fas antigen modulates ultraviolet B (UVB)-induced apoptosis of SVHK cells: sequential activation of caspases 8, 3, and 1 in the apoptotic process. *Exp Cell Res*, 249: 291-298, 1999
- 22) Ishida-Yamamoto A, Kato H, Kiyama H, Armstrong DKB, Munro CS, Eady RAJ, Nakamura S, Kinouchi M, Takahashi H, Iizuka H. Mutant loricrin is not crosslinked into the cornified cell envelopes but is translocated into the nuclei in loricrin keratoderma. *J Invest Dermatol*, 115: 1095-1103, 2000
- 23) Ishida-Yamamoto A, Kelsell D, Common J, Houseman MJ, Hashimoto M, Shibaki H, Asano K, Takahashi H, Hashimoto Y, Sensyu T, Leigh IM, Iizuka H. A case of erythrokeratoderma variabilis without mutations in connexin31. *Br J Dermatol*, 143:1283-1287, 2000
- 24) Ishida-Yamamoto A, Senshu T, Takahashi H, Akiyama K, Nomura K, Iizuka H. Decreased deiminated keratin K1 in psoriatic hyperproliferative epidermis. *J Invest Dermatol*, 114: 701-705, 2000
- 25) Ishida-Yamamoto A, Takahashi H, Iizuka H. Immunoelectron microscopy links molecules and morphology in the studies of keratinization. *Eur J Dermatol*, 10: 429-435, 2000
- 26) Takahashi H, Hashimoto Y, Aoki N, Kinouchi M, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. Copper, zinc-superoxide dismutase protects from ultraviolet B-induced apoptosis in SV40-transformed human keratinocytes: the protection is associated with the increased levels of antioxidant enzyme. *J Dermatol Sci*. 23: 12-21, 2000
- 27) Takahashi H, Oyama N, Itoh Y, Ishida-Yamamoto A, Kaneko F, Iizuka H. Transcriptional factor AP-2 γ increases human cystatin A gene transcription of keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 278: 719-723, 2000
- 28) Takahashi H, Aoki N, Nakamura S, Asano K, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. Cornified cell envelope formation is distinct from apoptosis in epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci*, 23: 161-169, 2000
- 29) 山本明美、高橋英俊、飯塚 一. Loricrin keratoderma ;免疫電顕による病因と病態の解明. *細胞*, 31: 570-573, 1999
- 30) 山本明美、中根 宏、飯塚 一. Elafin/SKALP/trappin-2 と炎症性皮膚疾患.

Monthly Book Derma (デルマ) , 22: 43-47, 1999

- 31) 山本明美、高橋英俊、飯塚 一. Loricrin keratoderma の病態. 日皮会誌, 109: 1724-1726, 1999
- 32) 山本明美、高橋英俊、飯塚 一. Loricrin keratoderma の臨床遺伝診断. 日皮会誌, 109: 1966-1967, 1999
- 33) 山本明美、飯塚 一. ロリクリン角皮症. 生体の科学, 50: 485-486, 1999
- 34) 山本明美、高橋英俊、飯塚 一. 新しい角化異常症 Loricrin Keratoderma とその病態形成機構. 皮膚病診療, 21: 1000-1002, 1999
- 35) 山本明美、中根 宏、高橋英俊、飯塚 一. 膿疱症における involucrin と elafin. Monthly Book Derma (デルマ) , 38: 13-17, 2000
- 36) 山本明美. 角化異常症と辺縁帯の異常. 電子顕微鏡, 35: 215-220, 2000

結果と考察

本研究において我々は表皮の生体防御機構である辺縁帯形成に関わるいくつかの主要な生物学的事象を明らかにした。以下に得られた主な研究結果を述べ、その意義について考察する。

1) ロリクリン角皮症と辺縁帯形成

ロリクリンは辺縁帯の70%をもしめる主成分蛋白である。過去に我々は本蛋白の遺伝子変異による角化異常症を世界で始めて発見している。本課題研究の期間においてはこのロリクリンの遺伝子変異による掌蹠角化症の初の日本人症例を発見した (J Dermatol Sci, 19: 44-47, 1999)。我々は従来の臨床症状のみにもとづいた古典的な角化症分類から脱却し、病因に基づく新分類を提唱し、国内外で発見したこれらロリクリン遺伝子変異による角化異常症を「loricrin keratoderma ロリクリン角皮症」と呼ぶことを提案した (Exp Dermatol, 7: 1-10, 1998, Histol Histopathol, 13: 819-826, 1998, J Dermatol Sci, 18: 139-154, 1998)。

次に我々はこのロリクリン角皮症の病態形成機構を多方面から検討した。まず表皮の分化は一種のapoptosisともとらえられていることからDNAの断片化をTUNEL法によって検討したところロリクリン角皮症患者表皮の角層において観察される遺残した核はTUNEL陽性であることがわかった (Lab Invest 78: 1245-1253, 1998, JID symposium proceedings 4: 145-149, 1999)。我々はまたロリクリン角皮症患者におきている遺伝子変異から予想される変異蛋白を特異的に検出できる抗体の作成に成功し、その蛋白局在をあきらかにした (J Invest Dermatol, 115: 1095-1103, 2000)。その結果、変異蛋白は顆粒細胞、角質細胞の核に集積していることが明らかになった。意外なことに辺縁帯にはほとんど移行しないことかが判明し、辺縁帯の形成が変異蛋白により直接障害される可能性は否定的となった。変異ロリクリンはとりわけ初期には核小体に局在することから、我々は変異ロリクリンは角化細胞の核、核小体機能を障害することにより表皮細胞の分化過程をちょうどDNA断片化が起きる時点で停止させるのではないかと考えた。今後、変異ロリクリン蛋白が獲得した核移行シグナルの解析、核小体機能との関連についてさらに検討し、表皮終末分化における核の変化とその機能を明らかにする計画である。

2) プロフィラグリンのドメイン特異的な細胞内局在

プロフィラグリンは従来、単にケラチン凝集蛋白であるフィラグリンの前駆体として理解されてきた。しかし近年、そのアミノ末端ドメインはプロフィラグリンの限定的な蛋白分解後は辺縁帯に局在することから、辺縁帯前駆体となると考えられるようになった。今回我々は、プロフィラグリンが蓄積されている

ケラトヒアリン顆粒が崩壊後、そのアミノ末端ドメインは核内に移行することを発見した (Lab Invest 78: 1245-1253, 1998)。これは核 DNA の断片化の時期に一致した現象であったことから、プロフィラグリンアミノ末端ドメインは辺縁帯前駆体としての機能の他に、終末分化の際の核変化に関与する蛋白であることが示唆された。これまで辺縁帯前駆体蛋白が核内移行する例は知られておらず、表皮の分化関連蛋白の機能は従来考えられていた以上に複雑であることが示された。この我々の発見をもとに、共同研究者の BA Dale, RB Presland らは *in vitro* の系でプロフィラグリンアミノ末端ドメインの核内移行の詳細なメカニズムを検討中である。

3) インボルクリンとシスタチン A の遺伝子発現調節機構

研究協力者の高橋が中心となって辺縁帯の成分であるインボルクリンとシスタチン A の遺伝子発現調節機構の一端を明らかにすることができた (J Invest Dermatol 110: 218-223, 1998, J Biol Chem 273: 17375-17380, 1998, Biochem J 344: 797-802, 1999, BBRC 278: 719-723, 2000)。今後これらの遺伝子発現がどのように統合的に調節されているのかを明らかにすることにより表皮の秩序だった分化メカニズムが解き明かされるだろう。

4) 辺縁帯形成におけるエピトープマスキング

我々は以前、辺縁帯形成過程を *post-embedding* 法による免疫電顕法でしらべると、ロリクリンが顆粒細胞においてはデスモゾームの *attachment plaque* に局在するのにたいし、角層細胞ではデスモゾーム部分をのぞく細胞辺縁に局在しているように観察されることを報告していた。この奇妙な現象がおきる理由として、我々は辺縁帯形成過程においてデスモゾーム部分での分子間の架橋の進展によりロリクリンの抗原エピトープのマスキングがおきるためではないかと考え、特殊な免疫電顕法を開発することによりこれを証明した (Exp Dermatol 8: 402-406, 1999)。すなわち超薄切片を水面上に浮遊させたまま一面をデスモゾーム蛋白抗体で標識した後、この面を指示膜でコートし、他面を蛋白分解酵素により部分消化し、最後にロリクリン抗体で標識した。この結果、デスモゾーム抗体であらかじめマークされた部位にロリクリンの標識が検出され、エピトープのアンマスキングに成功したのである。今後も辺縁帯形成過程を追うときに常につきまとう抗原マスキングの問題を同様の手法により解決し、さらに研究を発展させる予定である。