

02135

乾癬表皮における細胞内情報伝達系を介する 増殖と分化の異常制御の研究

(研究課題番号：08457233)

平成10年度科学研究費補助金（基盤-B）
—研究成果報告書—

平成11年 2月

研究代表者 飯塚 一
(旭川医科大学医学部皮膚科)

はしがき

乾癬においては表皮細胞の増殖亢進と異常角化が知られている。この2つは通常、別個に検討されているが、実は相互に関係があり、創傷治癒など人為的に増殖亢進状態を作ると乾癬と類似の角化パターンが現れてくる(Iizuka, Takahashi; Int J Dermatol 32: 333-338, 1993)。一方、表皮細胞の角化は各種細胞内情報伝達系により制御される秩序だったシステムであることが近年、明らかになりつつあるが、個々の角化関連蛋白の細胞内情報伝達系による修飾の検討はほとんどなされていない。我々の研究室では乾癬における β -adrenergic adenylate cyclaseの反応性の低下(Iizuka et al; J Invest Dermatol 91: 154-157, 1988)、乾癬におけるcalcium-calmodulin系の増強を示し(Mizumoto, Iizuka; J Invest Dermatol 85: 450-452, 1985)、protein kinase C (Iizuka et al; Biochim Biophys Acta 1093: 95-101, 1991)、phospholipase A2 (Iizuka et al; J Invest Dermatol 87: 577-581, 1986) およびphospholipase C (Iizuka et al; Epi Cell Biol 4: 51-56, 1995) との関連について検討を加えてきた。また乾癬と創傷治癒表皮との類似についてもin vivo動物モデルを用いて検討してきた(Hashimoto, Iizuka; J Dermatol Sci 10: 16-24, 1995)。しかしながら、これら情報伝達系の異常と乾癬で見られる増殖亢進にともなう異常角化との関係は不明のままであった。

本研究においては、乾癬表皮における角化異常を、細胞内情報伝達機構による修飾という観点から検討を加えた。特に細胞増殖に影響を与える情報伝達系の作用について(角化をマーカーにして)検討した。本研究により、乾癬における増殖亢進シグナル、特にTPA-protein kinase Cシグナルが、乾癬で見られる異常角化シグナルと共通しているとする我々の仮説が検証された。またいくつかの角化関連タンパクについて遺伝子発現、タンパクレベルでの解析、免疫電顕による局在の同定を行った。対象となるインボルクリンとシスタチンA、SPRRは、乾癬において通常の角化マーカーと異なり早期発現を示す一方、ロリクリン、フィラグリンは、その発現が遅い結果、顆粒層プラスの乾癬という特殊な状況下であられるという対照的な挙動を示す。

研究組織

研究代表者： 飯塚 一 (旭川医科大学医学部皮膚科)
研究分担者： 橋本 喜夫 (旭川医科大学医学部皮膚科)
研究分担者： 山本 明美 (旭川医科大学医学部皮膚科)
研究分担者： 高橋 英俊 (旭川医科大学医学部皮膚科)

研究経費

平成 8年度	2 2 0 0千円
平成 9年度	2 3 0 0千円
平成10年度	2 6 0 0千円
計	7 1 0 0千円

研究発表

1. Ishida-Yamamoto A, Eady RAJ, Watt FM, Roop DR, Hohl D, Iizuka H: Immunoelectron microscopic analysis of cornified cell envelope formation in normal and psoriatic epidermis. *J Histochem Cytochem* 44: 167-175, 1996
2. Takahashi H, Kinouchi M, Tamura T, Iizuka H: Decreased beta2-adrenergic receptor-, loricrin-, and increased involucrin-mRNA transcripts in psoriatic involved versus uninvolved epidermis: analyses by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Br J Dermatol* 134: 1065-1069, 1996
3. Iizuka H, Ishida-Yamamoto A, Honda H: Epidermal remodelling in psoriasis. *Br J Dermatol* 135: 433-438, 1996
4. Ishida-Yamamoto, Kartasova T, Matsuo S, Kuroki T, Iizuka H: Involucrin and SPRR are synthesized sequentially in differentiating cultured epidermal cells. *J Invest Dermatol* 108: 12-16, 1997
5. Takahashi H, Kinouchi M, Wuepper KD, Iizuka H: Cloning of human keratolinin cDNA: Keratolinin is identical with a cysteine proteinase inhibitor, cystatin A, and is regulated by Ca⁺⁺, TPA, and cAMP. *J Invest Dermatol* 108: 843-847, 1997
6. Takahashi H, Kinouchi M, Iizuka H: Interleukin-1 β -converting enzyme (ICE) and CPP32 are involved in ultraviolet B-induced apoptosis of SV40-transformed human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 236: 194-198, 1997
7. Ishida-Yamamoto A, Hashimoto Y, Manabe M, O'Guin WM, Dale BA, Iizuka H: Distinctive expression of filaggrin and trichohyalin during various pathways of epithelial differentiation. *Br J Dermatol* 137: 9-16, 1997
8. Iizuka H, Ishida-Yamamoto A: Another support for the location of epidermal stem cells residing adjacent to the tips of dermal papillae in the interfollicular epidermis. *J Invest Dermatol* 109: 697, 1997.
9. Iizuka H, Honda H, Ishida-Yamamoto A: Epidermal remodeling in psoriasis (II): a quantitative analysis of the epidermal architecture. *J Invest Dermatol* 109: 806-810, 1997
10. 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
11. Takahashi H, Hashimoto Y, Kinouchi M, Iizuka H: Interferon- γ -dependent induction of manganese superoxide dismutase activity of SV40-transformed human keratinocytes by anti-Fas antibody and by TNF- α . *J Dermatol Sci* 16: 191-199, 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. Takahashi H, Asano K, Kinouchi M, Ishida-Yamamoto A, Wuepper KD, Iizuka H: Structure and transcriptional regulation of human cystatin A gene: The 12-o-tetradecanoyl[phorbol-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
14. Takahashi H, Kinouchi M, Tamura T, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H: Adenylate cyclases in keratinocytes: FRSK cells express types I,II, III, IV 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
15. 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
16. Ishida-Yamamoto A, Yamauchi T, Tanaka H, Nakane H, Takahashi H, Iizuka H: Electron microscopic in situ DNA nick end-labeling to combination with immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* (in press)

結果と考察

周辺帯形成に関与する角化関連タンパクの発現を正常表皮と比較検討し、乾癬においてインボルクリンは、角質層上層に至るまで陽性であるのに対し、正常ではロリクリンが周辺帯に組み込まれ、その過程でインボルクリン-エピトープがマスクされることを示した (Ishida-Yamamoto, Iizuka et al; *J Invest Dermatol* 104: 391-395, 1995; Ishida-Yamamoto, Iizuka et al; *J Histochem Cytochem* 44: 167-175, 1996)。またSprr, trichohyalinの発現の変動も明らかとなった (Ishida-Yamamoto, Iizuka et al; *J Invest Dermatol* 108: 12-16, 1997, Ishida-Yamamoto, Iizuka et al; *Br J Dermatol* 137: 9-16, 1997)。

ケラトリンンに関しては、cDNAのdirect sequenceにより、ケラトリンンがシスタチンAと同一タンパクであることを証明した。あわせてシスタチンA遺伝子発現の検討を行い、シスタチンAが、TPA-protein kinase Cシグナルにより正の制御を受けていることを明らかにした (Takahashi, Iizuka, et al; *J Invest Dermatol* 108: 843-847, 1997; Takahashi, Iizuka et al; *J Biol Chem* 273: 17375-17380, 1998)。さらにシスタチンAの発現が、乾癬表皮で増強しているという知見も得た。これらの結果は、乾癬では表皮細胞の増殖亢進にともないターンオーバー時間が短縮しており、ロリクリンやフィラグリンといった最終角化マーカーが間にあわない状況で、辺縁帯の形成が起こってしまうとするわれわれの仮説に合致するものと考えられる (Iizuka et al; *Br J Dermatol* 135: 433-438, 1996; Iizuka et al; *J Invest Dermatol* 109: 806-810, 1997)。

乾癬の角化はprotein kinase Cシグナルに基づくAP-1依存性の角化マーカー (インボルクリン、シスタチンAなど) の転写亢進と、終末角化の早期発現による角化の中断機構のもとに現れることが明らかとなった (Ishida-Yamamoto, Iizuka et al; *J Invest Dermatol* 104: 391-395, 1995; Ishida-Yamamoto, Iizuka et al; *J Histochem Cytochem* 44: 167-175, 1996; Iizuka et al; *Br J Dermatol* 135: 433-438, 1996; Takahashi, Iizuka et al; *J Invest Dermatol* 108: 843-847, 1997)。さらにインボルクリンについてはprotein kinase C- α , η の関与が、シスタチンAについてはprotein kinase C- α の関与が証明された (Takahashi, Iizuka et al; *J Invest Dermatol* 110: 218-223, 1998, Takahashi, Iizuka et al; *J Biol Chem* 273: 17375-17380, 1998)。発現の低下しているロリクリンについてはmRNAレベルでの抑制が示された (Takahashi, Iizuka et al; *Br J Dermatol* 134: 1065-1069, 1996)。

本研究の過程でロリクリンのframeshift mutationに基づく角化異常がerythrokeratodermaにおいて発見され、Vohwinkel症候群の魚鱗癬型とならびloricrin keratodermaという概念が提唱された (Ishida-Yamamoto, Iizuka et al; *Am J Hum Genet* 61: 5891-589, 1997)。ロリクリンは顆粒層プラスの乾癬においてはフィラグリンと同様その発現が認められており、乾癬の角化様式は顆粒層プラス、マイナスで大きく異なっていることが明らかになりつつある。なお乾癬においてはロリクリンの変異は検出されていない。

近年、角化過程におけるアポトーシスの関与が注目されている。終末角化の早期発現は加速されたアポトーシスとして捉えることができるが、その際 Interleukin-1 β -converting enzyme と CPP32の関与が示唆された (Takahashi, Iizuka et al; *Biochem Biophys Res Commun* 236: 194-198, 1997)。加速された細胞死は、急速なターンオーバーと同値であり、個々の細胞にとっては、終末角化に至る持ち時間にほかならない。乾癬は通常、顆粒層の欠損で特徴づけられるが、現実の乾癬においては、かなりの確率で顆粒層プラスの乾癬が存在する (Iizuka, Ishida-Yamamoto et al; *Br J Dermatol* 135: 433-438, 1996)。顆粒層プラス、マイナスの両者はターンオーバー時間の差により発現されることがわれわれの解析により示され (Iizuka et al; *J Invest Dermatol* 109: 806-810, 1997)、乾癬の終末角化の発動時期について、インボルクリン、フィラグリン、ロリクリン、Sprr、その他の角化マーカーの極めて秩序だった発現システムの存在が想定される。