

角化細胞終末分化関連蛋白の発現とその異常

(研究課題番号：08670940)



平成8年度～平成9年度科学研究費補助金 (基盤研究(C)(2))
—研究成果報告書—

平成10年2月

研究代表者 山本明美
(旭川医科大学医学部講師)

角化細胞終末分化関連蛋白の発現とその異常

(研究課題番号：08670940)

平成8年度～平成9年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）
研究成果報告書

平成10年2月

研究代表者 山本明美
(旭川医科大学医学部講師)

はしがき

角化細胞の複雑な分化過程で産生される、特徴的な構造蛋白、酵素蛋白としてインボルクリン、ロリクリン、プロフィラグリン、ケラチン、トリコヒアリン、SPRR、エラフィン、シスタチンA、transglutaminase (TGase) 1、TGase 2などがあり、それぞれの構造や遺伝子についての情報が集積されてきている。しかしこれらの分子の細胞内、組織内での相互作用や、細胞生物学的効果については、まだ十分に解明されていない。

われわれは過去10年以上にわたり角化細胞の電顕的、免疫電顕的研究により、角化関連蛋白の発現と局在を明らかにしてきた(Acta Derm Venereol; 1994, Arch Dermatol Res; 1993)。加えてわれわれは遺伝性皮膚疾患および角化異常症の原因、病態も分子生物学的研究と形態的研究を組み合わせることにより明らかにしてきた。すなわち単純型表皮水疱症および水疱型魚鱗癬様紅皮症がケラチン異常症であること(J Invest Dermatol; 1991, 1992, Nature 1992)、後者ではケラチンとフィラグリンの相互作用が異常であり、またロリクリン、インボルクリンやSPRRの分布も異常であること(Br J Dermatol; 1994, Arch Dermatol Res; 1995)、尋常性乾癬で辺縁帯の早期形成、インボルクリンの分布異常がみられること(J Invest Dermatol; 1995)などを報告してきた。

本課題研究においてわれわれはこれら過去の研究実績をふまえ、いくつかの主要な角化関連蛋白の局在、発現量の解析をおこない、角化細胞の終末分化のメカニズムを明らかにした。また、これまで原因不明であったふたつの遺伝性角化異常症の原因をも、世界にさきがけて明らかにすることができた。さらにTGase 1ノックアウトマウスの作成とそれにおける辺縁帯形成、バリア機能の解析により本酵素の表皮分化における重要性を明らかにした。

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：飯塚 一 (旭川医科大学医学部皮膚科教授)

高橋 英俊 (旭川医科大学医学部皮膚科講師)

山西 清文 (京都府立医科大学医学部皮膚科講師)

研究経費

平成8年度 1800千円

平成9年度 400千円

計 2200千円

研究発表

1. A. Ishida-Yamamoto, R.A.J. Eady, F.M. Watt, D.R. Roop, D. Hohl, H. Iizuka.
Immunoelectron microscopic analysis of cornified cell envelope formation in normal and psoriatic epidermis. *J Histochem Cytochem*, 44: 167-175, 1996
2. E. Maestrini, A.P. Monaco, J.A. McGrath, A. Ishida-Yamamoto, C. Camisa, A. Hovnanian, D.E. Weeks, M. Lathrop, J. Uitto, A.M. Christiano. A molecular defect in loricrin, the major component of the cornified cell envelope, underlies Vohwinkel's syndrome. *Nature Genetics*, 13: 70-77, 1996
3. H. Iizuka, A. Ishida-Yamamoto, H. Honda. Epidermal remodelling in psoriasis. *Br J Dermatol*, 135: 433-438, 1996
4. A. Ishida-Yamamoto, H. Iizuka. Eccrin syringofibroadenoma (Mascaro). An ultrastructural and immunohistochemical study. *Am J Dermatopathol*, 18: 207-211, 1996
5. 市川雅子、山本明美、飯塚 一. LR White樹脂を用いた金コロイド標識包埋後免疫電顕法。各種非上皮系マーカーの同定 *日本皮膚科学会雑誌*, 106: 877-884, 1996
6. A. Ishida-Yamamoto, T. Kartasova, S. Matsuo, T. Kuroki, H. Iizuka. Involucrin and SPRR are synthesized sequentially in differentiating cultured epidermal cells. *J Invest Dermatol*, 108: 12-16, 1997
7. K. Tamai, A. Ishida-Yamamoto, S. Matsuo, H. Iizuka, I. Hashimoto, A.M. Christiano, J. Uitto, J.A. McGrath. Compound heterozygosity for a nonsense mutation and a splice site mutation in the type VII collagen gene (COL7A1) in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Laboratory Investigation*, 76: 209-217, 1997
8. A. Ishida-Yamamoto, J.A. McGrath, H. Lam, H. Iizuka, R.A. Friedman, A.M. Christiano. 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
9. A. Ishida-Yamamoto, Y Hashimoto, M. Manabe, W.M. O'Guin, H. Iizuka. Distinctive expression of filaggrin and trichohyalin during various pathways of epithelial differentiation *Br J Dermatol* 137: 9-16, 1997
10. B.P. Korge, A. Ishida-Yamamoto, C. Punter, P.J.C. Dopping-Hepenstal, H. Iizuka, A. Stepenson, R.A.J. Eady. Loricrin mutation in Vohwinkel's keratoderma is unique to the variant with ichthyosis *J Invest Dermatol* 109: 604-610, 1997
11. H. Iizuka, A. Ishida-Yamamoto. 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
12. H. Iizuka, H. Honda, A. Ishida-Yamamoto. Epidermal Remodeling in psoriasis (II) *J Invest Dermatol* 109: 806-810, 1997

13. A. Ishida-Yamamoto, H. Takahashi, H. Iizuka. Loricrin and Human skin diseases: molecular basis of loricrin keratodermas. *Histology and Histopathology*, in press
14. A. Ishida-Yamamoto, H. Iizuka. Structural organization of cornified cell envelopes and alterations in inherited skin disorders. *Exp Dermatol*, in press
15. H. Takahashi, K. Asano, A. Manabe, M. Kinouchi, A. Ishida-Yamamoto, H. Iizuka. The α and η isoforms of protein kinase C stimulate transcription of human involucrin gene. *J Invest Dermatol*, in press
16. T. Tamura, H. Takahashi, A. Ishida-Yamamoto, Y. Hashimoto, H. Iizuka. Functional alteration of guanine nucleotide binding proteins (Gs and Gi) in psoriatic epidermis. *J Dermatol Sci*, in press
17. H. Tanaka, A. Ishida-Yamamoto, T. Hashimoto, K. Hiramoto, T. Harada, Y. Kawachi, H. Shimizu, T. Tanaka, K. Kishiyama, B. Hofner, H. Takahashi, H. Iizuka, L. Bruckner-Tuderman. A Novel Variant of Acquired Epidermolysis Bullosa with Autoantibodies against the Central Triple-Helical Domain of Type VII Collagen. *Laboratory Investigation*, in press
18. M. Matsuki, F. Yamashita, A. Ishida-Yamamoto, K. Yamada, C. Kinoshita, S. Fushiki, E. Ueda, Y. Morishima, K. Tabata, H. Yasuno, M. Hashida, H. Iizuka, M. Ikawa, M. Okabe, G. Kondoh, T. Kinoshita, J. Takeda, K. Yamanishi. Defective stratum corneum and early neonatal death in mice lacking the gene for transglutaminase 1 (keratinocyte transglutaminase). *Proc Natl Acad Sci USA*, in press
19. 山本明美 ケラトヒアリンとトリコヒアリンの違いは. *日本皮膚科学会雑誌* 106: 1766-1767, 1996
20. 山本明美 ケラチノサイト系の疾患. (2)表皮角化細胞の電顕病理. *細胞* 28: 131-135, 1996
21. 山本明美 遺伝病としての皮膚疾患—その対応— 1 角化症 2 水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症、葉状魚鱗癬、Erythrokeratoderma、Sjogren-Larsson症候群. *皮膚科の臨床* 39: 特37; 1027-1033, 1997
22. 山本明美 皮膚疾患の病態 新しい角化異常：ロリクリンとVohwinkel症候群. *臨床皮膚科* 51:増5; 71-75, 1997
23. 山本明美 単純型先天性表皮水疱症. *細胞* 29: 527-529, 1997
24. 山本明美 角化の最新情報. *皮膚科診療プラクティス 皮膚病理を読む* 文光堂, in press

結果と考察

1. 正常表皮における辺縁帯形成過程を免疫電顕法を用いて検討したところ、インボルクリンが先に架橋され、のちにロリクリンがデスモゾーム領域から徐々に架橋されることが示唆された (J Histochem Cytochem, 44: 167-175, 1996)。さらに角化異常症である尋常性乾癬表皮における辺縁帯が、顆粒層を欠く場合はインボルクリン主体となり、しかもより早期に形成されるのに対し、顆粒層を有する場合は正常に近くなることがわかった (同上)。乾癬表皮が顆粒層の有無により2つのパターンに分けられ、それぞれの増殖状態がことなることは形態計測からも明かとなった (Br J Dermatol 135: 433-438, 1996. J Invest Dermatol, 109: 806-810, 1997)。

また、培養ヒト角化細胞において、培養液のカルシウム濃度を上昇させることにより、インボルクリンとSPRRの発現を誘導し、それらの局在と微細構造の変化の関連を免疫電顕法、共焦点レーザー顕微鏡により解析し、両者が段階的に発現し、角層の辺縁帯に架橋されることをうらづける知見をえた (J Invest Dermatol, 108: 12-16, 1997)。

これらの研究成果から辺縁帯形成が極めて秩序だった機構に支配されていることがわかった。また乾癬の病態が細胞分化の不十分な時点で開始される辺縁帯形成によるバリア機能の不全によって説明される可能性がでてきた。今後、さらに乾癬角層の機能を多方面から解析する予定である。

2. 角化細胞の分化関連蛋白の発現機構の解析も行なった。その結果、プロフィラグリンとトリコヒアリンは共通する遺伝子構造をもちながら、全く独立した発現様式をしめすことが正常および乾癬表皮、舌上皮、培養角化細胞における観察から明らかになった (Br J Dermatol, 137: 9-16, 1997)。またインボルクリン遺伝子の発現がprotein kinase Cの α および η アイソフォームにより促進されることをin vitroの系で証明した (J Invest Dermatol, in press)。これらの仕事は表皮の正常、異常分化の機構解明の基礎的知見として重要なものであると考えている。

3. 我々はこれまで全く原因が不明であった、重症の遺伝性角化異常症であるVohwinkel症候群の原因がロリクリン遺伝の変異によるものであることを、2家系の形態的、および分子遺伝学的研究により証明し、報告した (Nature Genetics, 13: 70-77, 1996. J Invest Dermatol, 109: 604-610, 1997)。さらに本症と共通の臨床症状をしめす別の遺伝性角化異常症である進行性紅色角皮症の微細構造、免疫電顕所見を検討することにより同じくロリクリン蛋白の異常を検出し、遺伝子解析によりロリクリン遺伝子内に、Vohwinkel症候群の場合よりさらに上流の変異を同定した (Am J Hum Genet, 61: 581-589, 1997)。これらの研究成果から我々はロリクリンの遺伝子異常にもとづく角化異常症

をLoricrin Keratodermaと呼ぶことを提唱した (Histol & Histopath, in press. Exp Dermatol, in press)。すなわち我々は本研究により表皮分化関連蛋白ロリクリンの生理的重要性を明白にし、角化異常症の新しい臨床分類を提示することができた。

4。表皮の角質細胞の細胞膜裏うち構造である辺縁帯の形成を触媒する酵素と考えられてきたtransglutaminase (TGase) 1のノックアウトマウスを作成することにより本酵素の辺縁帯形成における重要性と、辺縁帯の形成障害がおよぼす辺縁帯前駆体蛋白の挙動、表皮の形態および機能への影響を検討した (PNAS, in press)。その結果、TGase 1の欠損により辺縁帯の形成は完全に損なわれ、この酵素の作用はTGase 2を含めて他の酵素では代償されないことが明かとなった。また、辺縁帯前駆体蛋白と考えられていたロリクリンやプロフィラグリンの細胞内分布、辺縁帯への架橋が障害され、皮膚のバリア機能は著しく低下し、マウスの生存は維持されえないことが判明した。この研究は一部の葉状魚鱗癬患者で認められているTGase 1遺伝子の変異が疾患原因であることを裏付ける基礎データとして重要であり、また原因が明かにされていない致死的な皮膚病の原因として本酵素の完全欠損がありうることを示唆するものである。