

角層コルネオデスモゾーム分解過程の免疫電顕的解析

旭川医科大学医学部皮膚科

山本 明美

The epidermal stratum corneum provides a critical permeability barrier between the body and the environment. Our skin establishes a basket-weave like appearance in the cornified layers. The cells there are attached only at the cell periphery by corneodesmosomes which are modified desmosomes. These corneodesmosomes spare wide spaces at the central (non-peripheral) area for the lipid layers to form a continuous permeability barrier. To establish this structure while maintaining steady state thickness of the stratum corneum, degradation process of corneodesmosomes must be under strict control. Uncontrolled activation of proteases involved in this process could lead to severe skin phenotypes such as those seen in Netherton syndrome, a severe autosomal recessive disease caused by gene mutations in *SPINK5* which encodes a protease inhibitor LEKTI. Our understanding of the mechanisms which control the degradation of corneodesmosomes is limited. For example, it is unknown why corneodesmosomes persist only at the cell periphery in fully developed corneocytes. To explore this, we analyzed the precise distribution of two major components of the extracellular part of corneodesmosomes, corneodesmosin (CDSN), and desmoglein 1 (DSG1) in normal adult human epidermis. Distributions of corneodesmosomal components were analyzed using montage pictures of post-embedding immunoelectron microscopy performed on the back skin samples. The upper and lower cell surface of corneocytes from the first to the fifth layers were divided into the central half and the peripheral half, and colloidal gold particles associated with corneodesmosomes were counted and distribution densities per membrane length were calculated. Marked decrease in label densities was noted on the central areas of the upper cell surface from the second deepest layer for CDSN and DSG1. Central labeling was virtually lost by the fifth layer, whereas peripheral labeling densities were relatively high up to the fifth layer. The present study clearly demonstrated that the degradation of two major corneodesmosomal components, CDSN, and DSG1 is initiated from the central areas of corneocytes soon after the cells move into the cornified layer. This suggests that the molecular basis for the selective degradation resides in the deepest layer of the stratum corneum.

1. 緒言

皮膚の最表層である表皮角層は生体と環境の間の物理的なバリアを形成する¹⁾。角層の構造を従来はEliasが提唱したレンガとモルタルのモデルによって説明されてきた²⁾。ここでは角層細胞はレンガに、モルタルは細胞間脂質に相当する。つまりかつては、このモルタルにたとえられた細胞間脂質が細胞間の接着をつかさどっているとされていたのである。しかし最近では細胞同士の接着は主にコルネオデスモゾームによっていることが分かってきており^{3,4)}、細胞間接着における脂質が占める作用はあったとしてもわずかなものであろうとされている。

このコルネオデスモゾームとは角化細胞が顆粒細胞から角層細胞になるときにデスモゾームが構造変化したものである。その構成成分は顆粒細胞のデスモゾーム構成要素に加えて、細胞内の層板顆粒から提供されるコルネオデスモシン (CDSN) が新たに細胞外部分に加わっているという

特徴がある。また、微細構造的には細胞内部分ではケラチン線維が付着するアタッチメントプラークが消失し、細胞全周に形成される辺縁帯と一体化している。さらに細胞外部分はdense midline構造が失われ、全体的に電子密度の高い板状の形態を示す。分布様式では、角層下層では細胞全周に分布しているが、上層のよく分化した正常の角層細胞では辺縁部分にしか認められない。このことが顕著に現れているのが、ホルマリン固定パラフィン包埋標本で観察される角層の網状構造である。すなわちアルコール脱水、キシレン透徹処理中に細胞間に充填されていた脂質は抜けてしまうが、辺縁の接着構造であるコルネオデスモゾームは残るため、角層の全体構造が網の目状を呈するのである。逆に言うと、この辺縁の接着部位に囲まれた中央部分を水分バリアをつかさどる層状の細胞間脂質が埋めていることになる^{5,6)}。

さて、角層の厚さを一定に保ちながらこの構造をとるためには、コルネオデスモゾームの分解過程が精密に制御されている必要がある。その制御機構の重要性は、この分解過程が遅延すると老化した皮膚や冬期の乾燥肌にみられるような角層の肥厚をきたし⁷⁾、逆に異常に亢進すると重篤な魚鱗癬を生じるNetherton症候群(常染色体劣性遺伝性疾患で、カリクレインなどの角層剥離に働く酵素を阻害するLEKTIをコードする遺伝子*SPINK5*の変異によって生じる)をきたすことから明らかである⁸⁾。しかしこの制



Immunoelectron microscopic analysis of stratum corneum corneodesmosomal degradation process

Akemi Ishida-Yamamoto

Department of Dermatology, Asahikawa Medical College

御機構の詳細はまだ不明な点が多い。例えばなぜ分化した角層細胞では辺縁にのみコルネオデスモゾームが残っているのかその理由は全く知られていない。本研究ではコルネオデスモゾーム分解過程を明らかにするために、その主たる細胞外成分であるCDSNとデスモグレイン1 (DSG1)⁹⁻¹³⁾の局在について、免疫電顕法を用いて角層の最深部5層について検討した。

2. 実験

2-1. 材料

正常ヒト背部の皮膚を2% paraformaldehyde/PBS pH 7.4にて4℃で1時間固定したのち、凍結固定、凍結置換し、Lowicryl HM20樹脂 (Chemische Werke Lowi, Waldkraiburg, Germany) に包埋したものを皮膚の垂直方向に薄切し、包埋後法の免疫電顕用の標本とした^{14, 15)}。すなわち手術材料から得られた皮膚を細切し、氷温の15% glycerol/PBSに1時間漬けた後、Reichert KF80 凍結固定装置 (Leica, Wien, Austria) を用いて-190℃の液体プロパンで固定した。その後、Reichert AFS automatic freeze-substitution system (Leica) を用いて-60℃のメタノールにより凍結置換した。Lowicryl樹脂への置換と紫外線による重合は製品説明書に従って行った。樹脂に埋め込まれた皮膚からウルトラミクロトームによって皮膚面に対して垂直方向になるように超薄切片を作成し、Formbar (LADD Research Industries, Williston, VT) の支持膜を張ったニッケルグリッドメッシュにマウントした。

2-2. 免疫染色

上記の超薄切片を1% bovine serum albumin (BSA), 5% normal goat serum (NGS), 0.1% fish gelatin/PBSで室温にて15分間、前反応させた。その後1% BSA, 1% NGS, 0.1% fish gelatin/PBS中で希釈した次の1次抗体と4℃で一晩反応させた。免疫電顕に用いた1次抗体はCDSNの中央部分に対するウサギポリクローナル抗体¹²⁾ (250倍希釈) および、DSG1の細胞外ドメインに対するマウスモノクローナル抗体 (Dsg-1-P23, Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg, Germany) (製品原液を薄めず使用) である。反応後、同希釈液で室温にて5分2回洗浄、1% BSA, 1% NGS, 0.1% fish gelatin/Tris-HCl buffered saline (pH 8.2) にて室温にて5分2回洗浄した。その後、後者にて希釈した次の2次抗体と37℃、1時間反応させた。2次抗体は5-nm gold-conjugated goat anti-rabbit IgG (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK), および5-nm gold-conjugated goat anti-mouse IgG (Amersham Bioscience) を10倍希釈で使用した。その後、希釈液で5分2回洗浄、脱イオン水で5分3回洗浄した。酢酸ウランにて電子染色を施して電子顕微鏡観察した。陰性コントロ

ールとしては1次抗体を除いて反応させたものを用いた。

2-3. 画像処理、計測

免疫電顕写真は倍率20,000倍で撮影し、取り込んだ画像をAdobe Photoshop ver. 6.0 (Adobe Systems, San Jose, CA) を用いてモンタージュ写真を合成した。角層細胞の最深部の1層目から5層目までの細胞のうち、切片上の細胞の幅をImage-Pro Plus ver. 4.0 imaging software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) によって計測し、10μm以上の細胞を解析対象とした。それぞれの細胞の表面を上下にわけ、それぞれの外周の長さを同ソフトを用いて測定し、これを中央2分の1と辺縁2分の1にわけて、各領域におけるコルネオデスモゾーム上の免疫標識の密度を計測した (図1, 2)。各層あたり、6ないし7個の細胞を解析した。

3. 結果

角層内のコルネオデスモゾーム上にはCDSN、DSG1ともにその標識が認められた (図1)。陰性コントロールでは標識は認められなかった。角層の深部第1層目から5層目までを対象とし、細胞表面を上面、下面に分け、それぞれを中央と辺縁に2分割し、コルネオデスモゾーム上のCDSN、DSG1の標識の細胞表面の長さあたりの密度を計測した。その結果、両者とも2層目の上面中央部分から顕著に減少しはじめ、5層目までには殆ど消失することが分かった (図2, 3)。辺縁では両者とも密度の減少はゆるやかであった。

4. 考察

コルネオデスモゾームの分解過程は辺縁部分と中央部分で明らかに異なることが分かり、その複雑な制御機構が示唆された。今回解析した二つのコルネオデスモゾーム成分の分布密度は、ともに角層2層目の上面中央から急速に減少していき、辺縁では密度の減少はゆるやかであった。

角層細胞間の脂質層による水分バリア機能が適切に発揮されるためには、脂質層が広がるべき部分においてコルネオデスモゾームがタイミングよく消失している必要がある。同時に角層の構造も保たれていなくてはならない。コルネオデスモゾームの成分を分解する酵素としてはカリクレインファミリーに属するKLK5 (stratum corneum tryptic enzyme) やKLK7 (stratum corneum chymotryptic enzyme) などが知られている¹³⁾。この働きを調節する因子としては、これら剥離酵素のLEKTIをはじめとするインヒビター、相対湿度、硫酸コレステロール、遊離脂肪酸、pH、Ca²⁺濃度、酸化などがある^{9, 16-22)}。本研究では二つの主要なコルネオデスモゾーム成分であるCDSNとDSG1が角層の2層目という非常に早い段階で細胞表面の中央部分

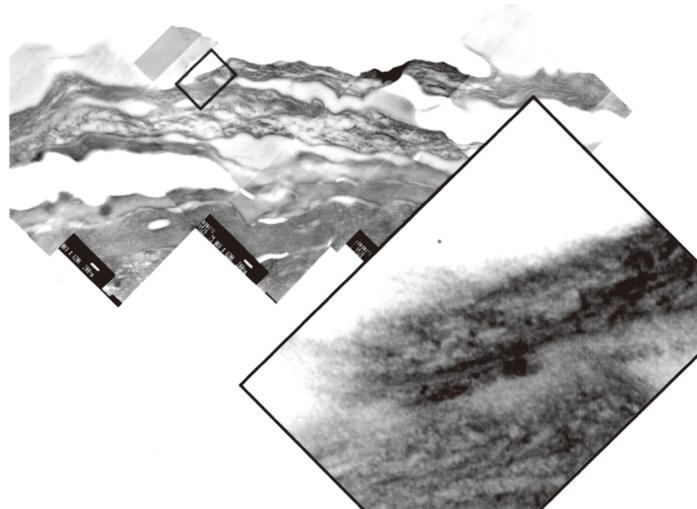


図1 CDSN 免疫電顕写真のモンタージュ画像。左上の四角で囲った部位を右下に拡大して示す。コルネオデスマゾームに一致した標識が見られる。

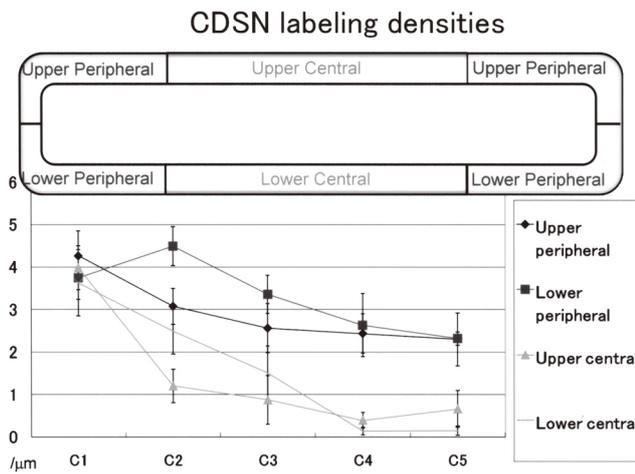


図2 CDSN 分布密度。角層の1から5層目 (C1からC5)の細胞表面をそれぞれ上の図で示す4部分にわけ、CDSNの標識密度を測定した。CDSNの標識は2層目の細胞上面中央部分から減少している。(平均値 ±SEM)

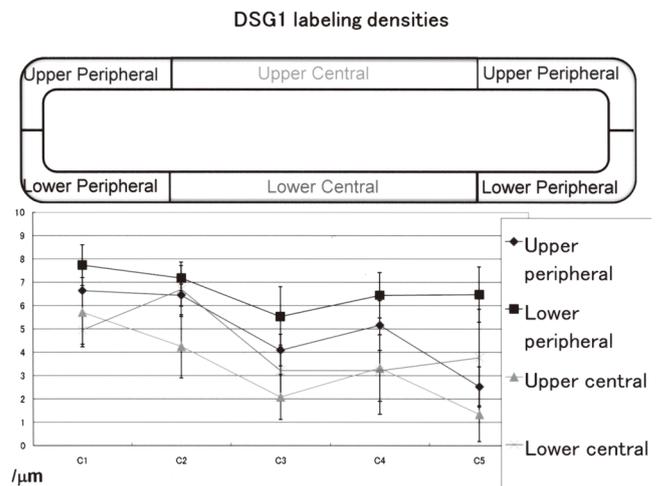


図3 DSG1 分布密度。角層の1から5層目 (C1からC5)の細胞表面をそれぞれ上の図で示す4部分にわけ、DSG1の標識密度を測定した。DSG1の標識は2層目の上面中央部分から減少しはじめる。(平均値 ±SEM)

から急速に消失していくことが明らかとなった。このことは角層の深部に、異なるコルネオデスマゾーム構成成分に共通する、局在部位に依存性の分解規定因子が内在することをうかがわせるものである。

今回の解析では電顕標本上の断面が幅10 μ m以上の細胞を対象としたが、免疫電顕標本の角層細胞の最大径は30 μ m程度であったので、今後はさらに対象を切片の断面幅20 μ m以上の細胞にしぼって、より細胞の中央断面の状態を明らかにしていく予定である。

5. 総括

角層の細胞間同志の接着構造はコルネオデスマゾームであり、この分解により角層は剥離する。コルネオデスマゾーム分解過程を明らかにするために、その主たる細

胞外成分であるCDSNとDSG1の局在を解析した。CDSN、DSG1の標識はともに2層目の上面中央部分から減少しはじめた。辺縁では両者とも密度の減少はゆるやかであった。コルネオデスマゾーム成分の分解過程が辺縁部分と中央部分で異なることが分かり、部位特異的な分解制御機構が角層深部に内在することが示唆された。

(参考文献)

- 1) Elias PM, : Stratum corneum defensive functions: an integrated view. J. Invest. Dermatol. 125, 183-200, 2005.
- 2) Elias PM, : Epidermal lipids, barrier function, and desquamation, J. Invest. Dermatol., 80 suppl, 44s-49s, 1983.
- 3) Raknerud N, : The ultrastructure of the interfollicular epidermis of the hairless (hr/hr) mouse. III. Desmosomal

- transformation during keratinization. *J. Ultrastr. Res.* 52, 32-51, 1975.
- 4) Chapman SJ, Walsh A, : Desmosomes, corneosomes and desquamation. An ultrastructural study of adult pig epidermis. *Arch. Dermatol. Res.* 282, 304-310, 1990.
 - 5) Elias PM, Goerke J, Friend DS, : Mammalian epidermal barrier layer lipids: composition and influence on structure. *J. Invest. Dermatol.* 69, 535-546, 1977.
 - 6) Landmann L, : Epidermal permeability barrier: transformation of lamellar granule-disks into intercellular sheets by a membrane-fusion process, a freeze-fracture study. *J. Invest. Dermatol.* 87, 202-209, 1986.
 - 7) Simon M, Bernard D, Minondo A-M, et al.; Persistence of both peripheral and non-peripheral corneodesmosomes in the upper stratum corneum of winter xerosis skin versus only peripheral in normal skin, *J. Invest. Dermatol.*, 116, 23-30, 2001.
 - 8) Chavanas S, Bodemer C, Rochat A, et al. : Mutations in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nat. Genet.* 25, 141-142, 2000.
 - 9) Suzuki Y, Koyama J, Moro O, et al. : The role of two endogeneous proteases of the stratum corneum in degradation of desmoglein-1 and their reduced activity in the skin of ichthyotic patients. *Br. J. Dermatol.* 134, 460-464, 1996.
 - 10) Simon M, Montézin M, Guerrin M, et al. : Characterization and purification of human corneodesmosin, an epidermal basic glycoprotein associated with corneocyte-specific modified desmosomes. *J. Biol. Chem.* 272, 31770-31776, 1997.
 - 11) Caubet C, Jonca N, Brattsand M, et al. : Degradation of Corneodesmosome Proteins by Two Serine Proteases of the Kallikrein Family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. *J. Invest. Dermatol.* 122, 1235-1244, 2004.
 - 12) Descargues P, Deraison C, Prost C, et al. : Corneodesmosomal cadherins are preferential targets of stratum corneum trypsin- and chymotrypsin-like hyperactivity in Netherton syndrome. *J. Invest. Dermatol.* 126, 1622-1632, 2006.
 - 13) Borgono CA, Michael IP, Komatsu N, et al., : A Potential Role for Multiple Tissue Kallikrein Serine Proteases in Epidermal Desquamation. *J. Biol. Chem.* 282, 3640-3652, 2007.
 - 14) Ishida-Yamamoto A, Simon M, Kishibe M, et al., : Epidermal lamellar granules transport different cargoes as distinct aggregates. *J. Invest. Dermatol.* 122, 1137-1144, 2004.
 - 15) Ishida-Yamamoto A, : Immunoelectron microscopic analysis of cornified cell envelopes and antigen retrieval. *Methods Mol. Biol.* 289, 223-226, 2005.
 - 16) Lee SH, Elias PM, Proksch E, et al. : Calcium and potassium are important regulators of barrier homeostasis in murine epidermis. *J. Clin. Invest.* 89, 530-538, 1992.
 - 17) Sato J, Denda M, Nakanishi J, et al. : Cholesterol sulfate inhibits proteases that are involved in desquamation of stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.* 111, 189-193, 1998.
 - 18) Thiele JJ, Hsieh SN, Briviba K, et al. : Protein oxidation in human stratum corneum: susceptibility of keratins to oxidation in vitro and presence of a keratin oxidation gradient in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 113, 335-339, 1999.
 - 19) Watkinson A, Harding C, Moore A, et al. : Water modulation of stratum corneum chymotryptic enzyme activity and desquamation. *Arch. Dermatol. Res.* 293, 470-476, 2001.
 - 20) Hachem JP, Crumrine D, Fluhr J, et al: pH directly regulates epidermal permeability barrier homeostasis, and stratum corneum integrity/cohesion. *J. Invest. Dermatol.* 121, 345-353, 2003.
 - 21) Elias PM, Crumrine D, Rassner U, et al. : Basis for abnormal desquamation and permeability barrier dysfunction in RXLI. *J. Invest. Dermatol.* 122, 314-319, 2004.
 - 22) Deraison C, Bonnart C, Lopez F, et al. : LEKTI fragments specifically inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and control desquamation through a pH-dependent interaction. *Mol. Biol. Cell* 18, 3607-3619, 2007.