

# 新たな皮膚タイトジャンクションバリア・角質層バリア機能評価方法の開発

慶應義塾大学医学部皮膚科学教室・総合医科学研究センター

久保 亮治

Skin is the structure that covers our body and protects it from not only the entry of pathogens or allergens but also from the leakage of water, solutes or nutrients. These outside-in and inside-out skin barrier functions are dependent on the epidermis, a stratified epithelial cellular sheet. Terminally differentiated cornified cellular sheets called stratum corneum (SC) constitute the outermost epidermal barrier in mammals. Beneath the SC, apical paracellular spaces of epidermal cells are sealed with tight junctions (TJs) that might limit paracellular leakage of water and electrolytes to maintain fluid homeostasis. Here we analyzed the barrier functions of the SC and TJs.

## 緒言

皮膚は、我々の身体の外表を覆う構造物である。その最も重要な機能が、外界と生体の境界をなすバリアとしての機能である。外界からの刺激・侵略に対するバリアとして、物理的な外的刺激によるダメージを防ぎ、紫外線によるダメージを防ぎ、病原微生物の繁殖・侵入を防ぎ、アレルゲンの侵入を防ぐ。侵入者に対しては、自然免疫のシステムにより対抗するとともに、抗原提示細胞が侵入者を捕捉して獲得免疫のシステムに抗原提示を行う。また1つは、身体内部のホメオスタシスを保つためのバリアでもある。水・イオン・蛋白の漏出を防ぎ、熱を保持するかまたは余分な熱を放出し、体内のホメオスタシスを保つ。皮膚の構造を詳細に調べていくことで、これらのバリア機能を実現するために進化してきたメカニズムが徐々に明らかとなってきている。

陸生脊椎動物において、皮膚の基本構造はほぼ共通している。皮膚はまず、表皮・真皮・皮下組織の3つに大きく分けられる(図1)。皮下組織は脂肪織によるクッションの役割と熱保持、栄養保持に関わる。真皮は頑丈なコラーゲンからなる層で、物理的な刺激から身体を守るとともに、その内部には毛嚢・脂腺・汗腺・血管・リンパ管など様々な構造を含有している。また、真皮樹状細胞と呼ばれる抗原取得細胞が真皮には存在している。最外層の表皮はケラチノサイト(表皮細胞)により構成される重層上皮組織であり、表面から順に、角質層・顆粒層・有棘層・基底層に分けられている。最も表面の角質層は、角化脱核した角質細胞(corneocyte)とその細胞間を埋める角質細胞間脂質

によって構成されるバリア構造である。全身を覆う角質層を持つのは、両生類の成体・爬虫類・鳥類・哺乳類であり、すなわち陸上の空気環境に生きる脊椎動物である<sup>1)</sup>。角質バリアは空気環境と液性環境の間を隔てるバリアであり、内側の細胞を乾燥や外力による障害から守っている。

角質層の内側の顆粒層は、非常に扁平化したケラチノサイトが複数積み重なってできた層である。顆粒層の細胞を表面から順にSG1, SG2, SG3細胞とそれぞれ名付けると、SG2細胞の細胞間にのみタイトジャンクションが存在して細胞間を通る物質移動を制限するバリアを形成しており、表皮の細胞外液性環境をタイトジャンクションバリアの外側(角質層とタイトジャンクションバリアに挟まれたSG1細胞を取り囲む細胞外液性環境)と内側(SG2細胞以下の顆粒層、有棘層、基底層の細胞を取り囲む細胞外環境)の2つのコンパートメントに分割している<sup>2-4)</sup>。顆粒層の下の有棘層は、デスモソームの発達したケラチノサイトが重層する層であり、ランゲルハンス細胞と呼ばれる表皮内樹状細胞がこの有棘層に散在している。最後の基底層は、基底膜直上に存在する一層の細胞層であり、哺乳類の表皮においては唯一細胞分裂が観察される層である。基底膜から外れた細胞は、細胞分裂を停止して分化を続け、有棘層、顆粒層を経て、最終的に角質細胞へと分化する(図1)。以上のように、我々の皮膚には、角質層とタイトジャンクションという2つのバリアが存在している。

表皮タイトジャンクションバリアの存在は長年にわたって見逃されてきた。申請者は哺乳類表皮タイトジャンクションバリアを世界で初めて3次元可視化することに成功し、表皮内抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞が表皮タイトジャンクションバリアを保ったままタイトジャンクションバリア外の抗原を取得する機能を持つことを発見した<sup>3)</sup>。すなわち、角質層という静的な構造物によるバリアが破れても、タイトジャンクションという動的なバリアにより外来物質の侵入を防ぎ、同時にランゲルハンス細胞が外来物質を能動的に取り込み免疫系に提示していると考えられる(図1)。しかし、表皮タイトジャンクションバリア機能の



Development of new methods to analyze stratum corneum barrier and tight junction barrier in the epidermis

Akiharu Kubo

Department of Dermatology, Keio University School of Medicine Center for Integrated Medical Research, Keio University School of Medicine

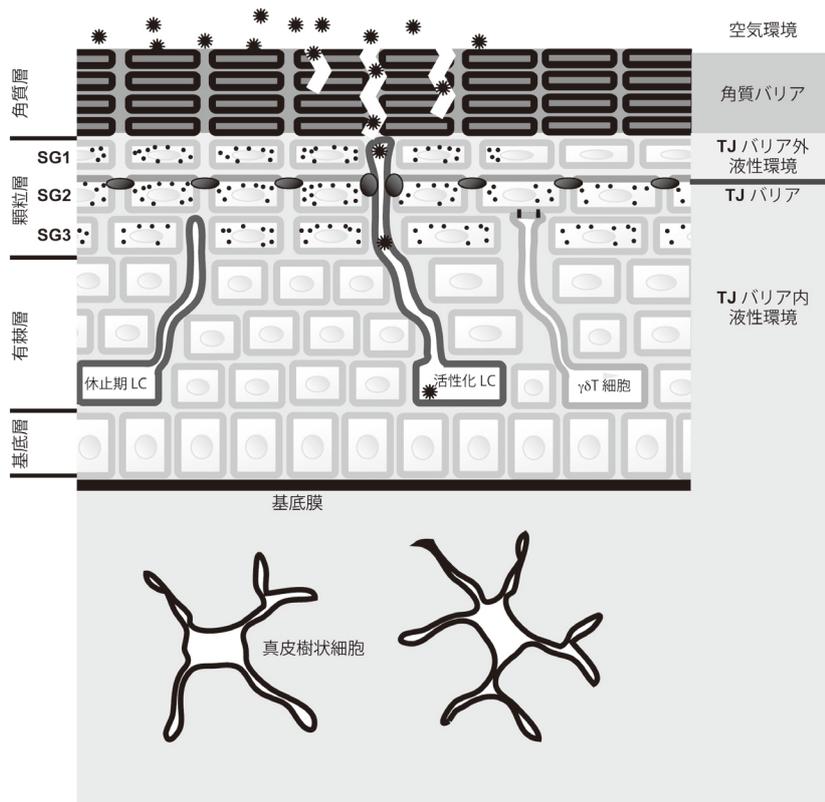


図1 皮膚表皮が持つバリア機構

詳細は、未だ不明な点が数多く残されている。本研究は、これまで曖昧に「皮膚のバリア」として捉えられてきた外来物質侵入阻止機構を、角質層とタイトジャンクションという2つのバリアとランゲルハンス細胞によって構成されるシステムとして捉えなおし、新しい表皮タイトジャンクションバリアの透過性評価方法、および角質層バリアの評価方法を開発することで、2つのバリアの性質の違いを明らかにし、皮膚バリア機構への理解を深めることを目的とした。

実験

1. 角質バリアの評価

角質への物質浸透を正確に可視化する方法の開発をおこない、同方法を用いて、野生型マウス皮膚とフィラグリン欠損マウス皮膚において、角質への物質透過性に変化がないかを調べた。

角質への物質浸透性を切片上で可視化する時に最も問題となるのは、透過性評価に用いた物質が拡散により本来存在する場所から移動してしまうことである。蛋白質と反応して共有結合を生じるような物質を透過性評価に用いる場合は問題ないが、通常の水溶性物質を透過性評価に用いた場合、たとえ皮膚をホルマリン固定したとしても、アルデヒド結合を生じる残基が物質中に含まれていなければ、その物質は皮膚中にフリーの状態が存在することとなる。す

ると、切片作成・染色・切片封入の各段階において、その物質は洗い流されて大部分は消失し、残ったものも拡散によって大きくその存在位置を変えていると考えられる。しかし、従来の研究では、この問題はほとんど無視されており、おそらくは残存しているごく一部の分子の局在を持って、角質への透過性を評価しているものと考えられた。

今回われわれは、この問題を解決するために、皮膚切片作成に川本法を導入した。本方法は鶴見大学歯学部RI研究センターの川本忠文博士が開発した、切片支持用粘着フィルムを用いた切片作成方法で、水溶性物質の組織内分布を保持したまま切片を作成することができる方法である<sup>5)</sup>。カルセイン(Bis [N,Nbis (carboxymethyl) aminomethyl] fluorescein ; Sigma-Aldrich) 飽和水溶液、またはリポソーム (Presome CSII-101 (Nippon Fine Chemical, Osaka, Japan)) に封入したカルセイン溶液を、6-8週野生型マウスおよびフィラグリン欠損マウスの尻尾皮膚に3時間塗布した後、尻尾を切りだして凍結し、専用の凍結包埋剤 (SCEM) を用いて包埋、凍結した。切片支持用粘着フィルム (Cryofilm type 2C (9)) を用いてクライオスタットにて切片を作成してそのままフリーズドライした後、紫外線照射により急速に硬化する切片封入剤 (SCMM-R1) を用いてスライドガラス/フィルム間に切片を封入し、蛍光顕微鏡により浸透度を観察した。

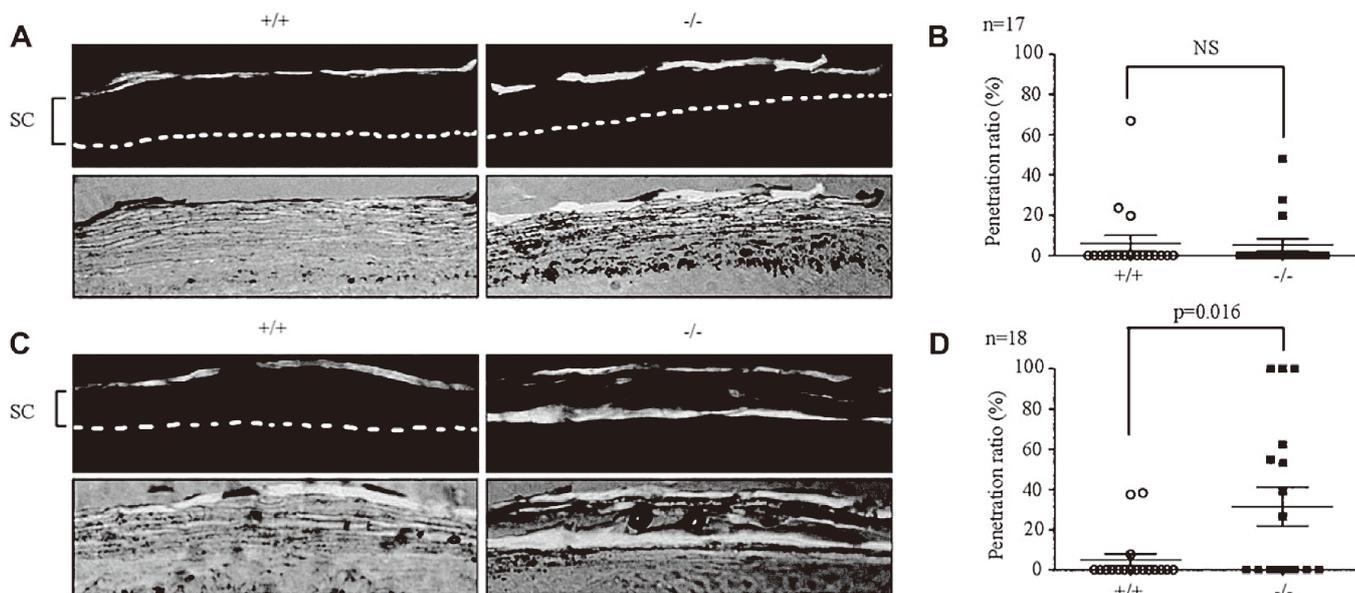


図2 野生型マウス (+/+) とフィラグリンノックアウトマウス (-/-) における角質透過性試験。(A) カルセイン水溶液塗布後3時間の角質浸透度。(C) リポソーム封入カルセイン溶液塗布後3時間の角質浸透度。(B, D) 各顕微鏡視野において、角質の50%以上の深さまでトレーサーが浸透している部分、角質全体に占める割合。(Kawasaki et al., JACI 2012<sup>7)</sup> より引用)

## 2. タイトジャンクションバリアの評価

In vivoにおける皮膚タイトジャンクションバリアの透過性を評価する方法としては、ランタン(分子量138 Da)の細胞間への浸透を電子顕微鏡により観察する方法と、蛋白質ビオチン化試薬(sulfo-NHS-LC-biotin(分子量556 Da))の浸透性を蛍光抗体染色法にて観察する方法の2つがあった。今回我々は、ケラチノサイトの表面抗原の1つであるデスマグレイン1に対するsingle-chain variable fragment(scFv:分子量約32 kDa)<sup>6)</sup>をトレーサーとして用いて、タイトジャンクションバリア機能を評価した。

## 結果

### 1. 角質バリア

川本法にて作成した皮膚切片上では、従来の方法で作成した皮膚切片に比べて、カルセインの蛍光が著明に強かった。これは、サンプル作成中に拡散によってカルセインが洗い流されることがなかったためと考えられた。カルセイン水溶液を用いた透過性試験では、野生型マウス、フィラグリン欠損マウスともに、角質の上層でカルセインの浸透は止まっており、2つのマウス間で明らかな差は認められなかった(図2 A, B)。一方、リポソームに封入したカルセインを用いた透過性試験では、野生型マウスではカルセイン水溶液と同様に角層の上層で浸透が堰き止められていたのに対し、フィラグリン欠損マウスでは角質の下層まで浸透している像が認められた(図2 C, D)。これは、脂溶性物質に対する角層のバリア機能が、フィラグリン欠損マウス皮膚において減弱していることを示唆している<sup>7)</sup>。

## 2. タイトジャンクションバリア

ケラチノサイトの表面抗原の1つであるデスマグレイン1に対するsingle-chain variable fragment(scFv)をトレーサーとして用いた。本scFvはヒトデスマグレイン1の細胞外ドメインと特異的に結合することが確認されている<sup>6)</sup>。まず、ヒト皮膚切片を用いてscFvを一次抗体として用いた免疫染色を行ったところ、デスマグレイン1の発現はタイトジャンクションバリアの内側の細胞にも、外側の細胞(顆粒層の最上層の細胞)にも認められた。次にscFvをヒト皮膚サンプルにex vivoで皮下注したのち組織培養し、scFvの拡散を観察した。24時間後までの観察において、scFvのシグナルは、ヒト皮膚のタイトジャンクションバリアの内側のケラチノサイト表面からは検出されたが、タイトジャンクションバリアの外側のケラチノサイト表面からは検出されなかった。すなわち、scFvは表皮タイトジャンクションバリアを通過できないと考えられた。

## 考察

### 1. 角質バリア

角質への物質浸透を正確に可視化する方法の開発をおこない、同方法を用いて、野生型マウス皮膚とフィラグリン欠損マウス皮膚において、角質への物質透過性に変化がないかを調べた。川本法を用いた切片作成により、従来の方法よりも正確に、水溶性物質の角質への浸透を可視化することが可能となった。また、本方法を用いることで、フィラグリン欠損マウスの角質バリア機能が低下していることを示すことができた。サンプル作成中の物質移動を最小限

に留めることができる本方法を用いることで、水溶性物質の角質透過性試験を正確に行うことが可能になると考えられた。

## 2. タイトジャンクションバリア

これまで、in vivoでのタイトジャンクションの透過性評価方法は、分子量500程度の小さな分子に対する閉鎖結合能の測定によっていた。本手法を用いることで、表皮タイトジャンクションバリアの、低分子に対するバリア機能と高分子に対するバリア機能を別々に、in vivoにおいて測定することが可能になると考えられた。

### (引用文献)

- 1) Schempp C, Emde M, Wölfle U: J Dtsch Dermatol Ges 7, 750-757, 2009
- 2) Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S: J Cell Biol 156, 1099-1111, 2002
- 3) Kubo A, Nagao K, Yokouchi M, Sasaki H, Amagai M: J Exp Med 206, 2937-2946, 2009
- 4) Kubo A, Nagao K, Amagai M: J Clin Invest 122, 440-447, 2012
- 5) Kawamoto T: Arch Histol Cytol 66, 123-143, 2003
- 6) Ishii K, Lin C, Siegel DL, Stanley JR: J Invest Dermatol 128, 939-948, 2008
- 7) Kawasaki H, Nagao K, Kubo A, Hata T, Shimizu A, Mizuno H, Yamada T, Amagai M: J Allergy Clin Immunol 129, 1538-1546.e1536, 2012
- 8) Yoshida K, Yokouchi M, Nagao K, Ishii K, Amagai M, Kubo A: J Dermatol Sci, in press