

令和元年9月26日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25461667

研究課題名(和文)角質層保湿の分子機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of moisturization mechanism of stratum corneum

研究代表者

松井 毅 (Matsui, Takeshi)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・副チームリーダー

研究者番号：10452442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚表皮の角質層は、バリアー/保湿機能において重要な機能を果たしている。顆粒層SG1細胞は、自身の細胞死により角質層を形成する。顆粒層細胞を分離・培養・細胞死を誘導する系を初めて構築した。その結果、弱酸性・高Ca²⁺が、試験管内の角質化に重要であることが明らかとなった。また生体内における顆粒層SG1細胞の解析をするため、マウス顆粒層細胞におけるケラチンネットワークを可視化した。フィラグリン欠損マウスにおいては、顆粒層におけるケラチンネットワークに異常が認められた。以上のような顆粒層細胞生物学的解析は、今後角質層のバリアー/保湿機能形成の解析に重要な手法になると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、私達の体表面の皮膚バリアーや保湿を担う、死んだ細胞層の角質層がどのように形成されるかを、顆粒層細胞に着目して研究したものです。顆粒層細胞の分離法を確立し、培養液中で顆粒層細胞が細胞死を起こし、角質層へと変化する様子が観察できるようになりました。その結果、カルシウムイオンと弱酸性が、細胞死に伴う変化に重要な役割を果たしていることがわかり、皮膚のバリアーがどのように作られるのかに関して重要な知見が得られました。さらに、生きたマウスの顆粒層細胞を観察する手法も確立しました。このように顆粒層細胞を解析する様々な手法が構築できたことで、皮膚疾患の診断法や、治療薬の開発などへの応用が期待されます。

研究成果の概要(英文)：The stratum corneum (SC) is a crucial barrier of the epidermis formed by the cell death of uppermost stratum granulosum (SG1) cells. However, cell biological analysis of SG1-to-SC transition (cornification) has been difficult. We established isolation method of living polygonal SG1 cells from mouse back skin epidermis. We found that high [Ca²⁺] under weakly acidic pH induced a long transient intracellular [Ca²⁺] elevation followed by cell death and gradual degradation of DNA and keratohyalin granules. We next visualized keratin networks by expressing mCherry-keratin 1 in live mice epidermis by electroporation. mCherry-keratin 1 signals showed filament networks in SG1 cells. Filaggrin-deficient SG cells showed aberrant mCherry-keratin networks. These results suggest that the cell biological analysis of SG1 cells is a valuable tool for understanding cornification process at a single cell resolution.

研究分野：皮膚科学

キーワード：皮膚 表皮 角質層 バリア 細胞死 イメージング ケラチン

1. 研究開始当初の背景

皮膚表皮は、基底層、有棘層、顆粒層、角質層からなり、三層の顆粒層の最上層 SG1 細胞層が細胞死を起こして、死細胞である角質層を形成する。角質層は、保護・バリアー機能・保湿などの重要な機能を果たしている。SG1 に特異的に発現する皮膚顆粒層特異的プロテアーゼ SASPase を欠損させたマウスは、皮膚表皮顆粒層特異的蛋白質でありアトピー性皮膚炎関連遺伝子をコードする Profilaggrin の分解異常を伴う乾燥肌を呈することを明らかにしていた。すなわち、顆粒層 SG1 細胞が、角質層を形成する全ての材料を、細胞死により供給することから、SG1 の細胞生物学研究は、保湿やバリア機能の理解に繋がり、アトピー性皮膚炎や角化症の解明に重要である。

2. 研究の目的

顆粒層の最上層 SG1 細胞の分離/培養/分化系を新たに開発し、様々な蛍光蛋白質イメージングを、SG1 細胞に対して応用し、ライブイメージング解析を行い、細胞生物学的性質を明らかにする。そして、乾燥肌表皮を示す SASPase 欠損マウスや、角質層バリア異常を示す Filaggrin 欠損マウスの SG1 細胞解析にその方法を応用する。

3. 研究の方法

皮膚表皮最上層に存在する SG1 細胞層に特異的に GFP を発現するマウスを用いて、表皮顆粒層の最上層である SG1 細胞の分離、培養法の確立を行い、細胞死を *in vitro* で誘導する。細胞死過程の SG1 細胞を *in vitro*, *in vivo* で

イメージングすることで、角化のメカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

顆粒層は SG1 細胞層に特異的に EGFP を発現するヘアレスマウスの背中の表皮を用いて、EGFP の蛍光を指標に、SG1 細胞を分離する系を最適化した。分離した背中の皮膚に対して、リコンビナント Exofoliate toxin (Serine protease) を皮内に注射し、SG1/2 と角質層を含むシートを分離した。さらにトリプシン処理により、SG1/2 細胞を分離した。SG1/2 細胞は、多角形をしていたが、走査電子顕微鏡解析により、表面形状は通常の培養細胞とは異なり細かい鱗状のユニットにより覆われていた。

さらに SG1 細胞の性質を明らかにするために、SG1 を浮遊させた培地を、高カルシウムイオン (1.03mM Ca^{2+}) 存在下で様々な pH に変化させた。BioStation CT (NIKON) を用いたタイムラプス観察を行った結果、弱酸性 pH 培地において、細胞内に一過性の大きな Ca^{2+} イオン濃度の上昇が起き、細胞死が起きた。その後、SG1 細胞内のケラトヒアリン顆粒が、数時間かけて徐々に消失していくことが明らかとなった。このことは、細胞外が弱酸性になることが、SG1 細胞の角化様変化に重要であることを示唆している。

次に、乾燥肌を呈する SASPase 欠損マウスの皮膚から SG1 細胞分離したが、野生型マウス由来の SG1 細胞と比べて、大きな差は認められなかった。このことから、SASPase 欠損マウスでは、SG1 細胞ではなく、角質層から異常が起き、

乾燥肌となることが推察された。一方で、Filaggrin 欠損マウスから分離された SG1 細胞は、有意にケラトヒアリン顆粒が減少していたことから、顆粒層のケラチンネットワーク異常があることが明らかとなった。次に生きた顆粒層細胞におけるケラチンのネットワークを明らかにするために、表皮分化型ケラチンを可視化できる蛍光蛋白質プローブ (mCherry-keratin 1) を開発した。このプローブをマウス初代培養ケラチノサイトに一過性に発現させて、光学顕微鏡と電子顕微鏡を重ね合わせて解析した所、内在性のケラチン繊維構造には大きな影響を与えないことが確認できた(図 1)。

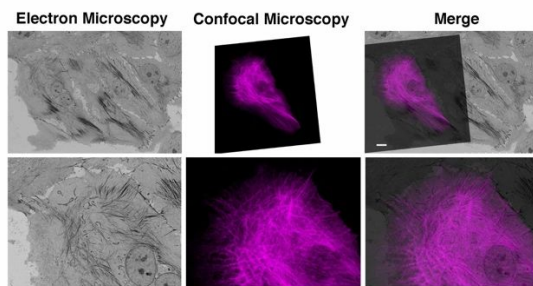


図 1：初代培養角化細胞に発現した mCherry-keratin 1 の共焦点顕微鏡画像とその走査電子顕微鏡像

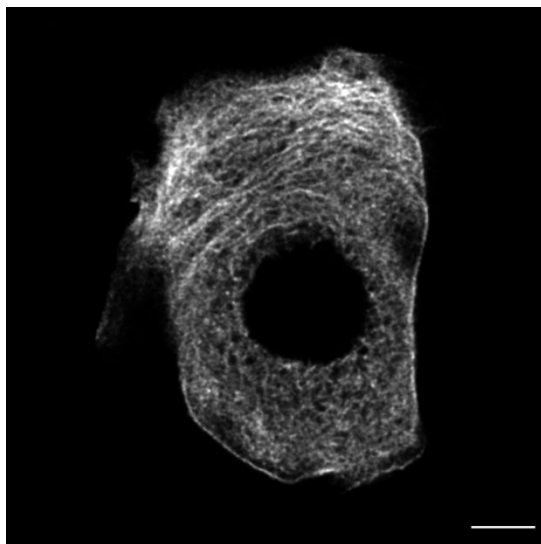


図 2：マウス皮膚表皮顆粒層に発現させた mCherry-keratin 1 Scale bar: 5 μ m

次に、mCherry-keratin 1 を CMV プロモーターの下流に挿入したプラスミドを、麻酔したヘアレスマウスの背中に皮内注射し、エレクトロポレーションにより表皮ケラチノサイトに発現させた。表皮顆粒層細胞にモザイクに発現した mCherry-keratin 1 は、ケラチンネットワークを形成し、ケラトヒアリン顆粒の間に太く束状のケラチン繊維が形成された。また特に細胞外縁にケラチン繊維が観察された。一方、Filaggrin KO マウスにおいては、mCherry-keratin 1 を発現させた所、ケラトヒアリン顆粒が減少しているのみならず、野生型に比べて断片化したネットワークを形成していることが明らかとなった。

本研究により、分離した顆粒層細胞の解析により、細胞死と細胞内のケラトヒアリン顆粒の消失を伴うケラチン構造変化は、pH と Ca^{2+} 濃度により制御されることが明らかとなった。その基盤となる SG1 細胞におけるケラチンネットワークは、ケラチン結合タンパク質であるフィラグリンにより制御されていることが明らかとなった。このようなケラチンネットワークの構造変化は、角質層のバリア機能や保湿と密接な関わりがあることが予想される。顆粒層細胞の細胞生物学的解析は表皮バリア/保湿機能の解析に重要なツールとなると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 5 件)

Thyssen JP, Jakasa I, Riethmüller C, Schön MP, Braun A, Haftek M, Fallon PG, Wróblewski J, Jakubowski H, Eckhart L, Declercq W, Koppes S, Engebretsen KA, Bonefeld C, Irvine AD, Keita-Alassane S, Simon M, Kawasaki H, Kubo A, Amagai M, Matsui T, Kezic S, Filaggrin expression and processing deficiencies impair corneocyte surface texture and stiffness in mice, *J. Invest. Dermatol.* 2019 in press

Usui K, Kadono N, Furuichi Y, Shiraga K, Saitou T, Kawasaki H, Toyooka K, Tamura H, Kubo A, Amagai M, Matsui T, 3D in vivo imaging of the keratin filament network in the mouse stratum granulosum reveals profilaggrin-dependent regulation of keratin bundling. *J. Dermatol. Sci.* 94:346-349, 2019. doi: 10.1016/j.jdermsci.2019.04.006 (査読あり)

Hawkins RFW, Patenaude A, Dumas A, Jain R, Tesfagiorgis Y, Kerfoot S, Matsui T, Gunzer M, Pelletier M, Larochelle C, Poubelle PE, Vallieres L, ICAM1+ neutrophils promote chronic inflammation via ASPRV1 in B cell dependent autoimmune encephalomyelitis. *J. Clin. Invest. Insight*, e96882, 2017 doi: 10.1172/jci.insight.96882 (査読あり)

Matsui T and Amagai M: Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. *Int. Immunol.*, 27: 269-80, 2015. doi: 10.1093/intimm/dxv013 (査読なし)

Yano T, Matsui T, Tamura A, Uji M, Tsukita S: The association of microtubules with tight junctions is promoted by cingulin phosphorylation by AMPK. *J. Cell Biol.* 203:605-14, 2013. (査読あり)

〔学会発表〕(計 19 件)

招待講演：松井 毅、顆粒層細胞生物学から紐解く皮膚の適応進化機構、第 8 回 Tokyo Vertebrate Morphology Meeting、2018 年 8 月 4 日、東京慈恵会医科大学(東京都)

招待講演：松井 毅、顆粒層の細胞生物学的解析から明らかにする皮膚表皮の角質層バリア形成機構、第 39 回日本炎症・再生医学会、2018 年 7 月 12 日、京王プラザホテル(東京都)

招待講演：松井 毅、顆粒層細胞生物学から明らかにする皮膚表皮の適応進化機構、第 123 回日本解剖学会総会全国学術集会 シンポジウム 18 体表の進化生物学、2017 年 3 月 29 日、日本医科大学(東京都・武蔵野市)

口頭発表：白井 景子、松井 毅、古市 祐樹、葛野 菜々子、平林 愛、佐藤 繭子、豊岡 公德、天谷 雅行、Visualization of in vivo keratin networks in mouse stratum granulosum reveals dynamic

cytoskeletal changes during cornification、Selected as Plenary Session III, 日本研究皮膚科学会 第42回年次学術大会・総会、高知市分化プラザかるぼーと、(高知県・高知市)
招待講演: Takeshi Matsui, Regulation of skin epidermal barrier formation by Ca^{2+} and pH, The Leibniz-AMED Workshop "Chronic Inflammation, Infection and Healthy Aging", 2017年9月10日, Ettar (Germany)
招待講演: 松井 毅、レトロトランスポゾンによる哺乳類皮膚の進化、第35回日本受精着床学会総会・学術講演会 シンポジウム4 レトロトランスポゾンと生殖・発生、2017年7月20日、米子コンベンションセンターBig Ship(鳥取県・米子市)
招待講演: 松井 毅、皮膚表皮バリアの形成機構、異分野融合ワークショップ 公開シンポジウム「刺激を与えて細胞を制御する: 化合物、紫外線からプラズマまで」、2017年3月6日、奈良先端科学技術大学院大学(奈良県・生駒市)
招待講演: 松井 毅、皮膚表皮顆粒層細胞動態から明らかにする陸上脊椎動物の気相環境への適応進化機構、第39回日本分子生物学会年会 シンポジウム 進化細胞生物学: 細胞動態の変化はどのように進化を駆動するか、2016年12月1日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
口頭発表: Takeshi Matsui, Initiation of cornification is regulated by Ca^{2+} and pH in isolated mouse stratum granulosum cells, 27th CDB Meeting [Body

Surface Tactics: Cellular crosstalk for the generation of super-biointerfaces, 2016年11月14日、理研CDB(兵庫県・神戸市)
招待講演: 松井 毅、陸上脊椎動物皮膚表皮の適応進化におけるレトロウイルス型プロテアーゼの役割、第一回読み手分子の構造と機能をつなぐ会、2016年9月13日、九州大学(福岡県・福岡市)
招待講演: 松井 毅、陸上脊椎動物の皮膚の適応進化とレトロウイルス型プロテアーゼ、国立遺伝学研究所研究集会「転移因子と宿主の相互作用による生命機能と進化」、2016年9月5日、国立遺伝学研究所(静岡県・三島市)
口頭発表: Takeshi Matsui, Ai Hirabayashi, Mayuko Satoh, Kiminori Toyooka, Masayuki Amagai, Initiation of cornification is regulated by Ca^{2+} and pH in isolated stratum granulosum cells, 45th Annual ESDR Meeting, Concurrent 10: Epidermal Structure & Function, 2015年9月12日、Rotterdam (Netherlands)
招待講演: 松井 毅、哺乳類皮膚表皮角質層の機能的進化 III 皮膚組織の形態と機能、第14回医学生物学電子顕微鏡シンポジウム、2014年12月20日、帝京平成大学幕張キャンパス(千葉県・千葉県)
招待講演: 松井 毅、レトロウイルス様配列による哺乳類皮膚表皮角質層の機能的進化、日本進化学会第16回大阪大会、2014年6月22日、高槻現代劇場(高槻市・大阪府)
招待講演: 松井 毅、陸上脊椎動物皮膚の適応進化機構、JT生命誌館

20周年シンポジウムシリーズ【第3、4合同】～系統関係、形態、生態をむすぶ新ゲノム時代の進化学～、

2014年4月26日、JT生命誌館（高槻市・大阪府）

招待講演：松井 毅、皮膚特異的レトロウイルス型プロテアーゼ

SASPaseの獲得と哺乳類皮膚表皮機能の進化、日本遺伝学会 第85回大会、2013年9月19日、慶應義塾大学日吉キャンパス（横浜市・神奈川県）

招待講演：松井 毅、皮膚特異的レトロウイルス型プロテアーゼ

SASPaseの獲得と哺乳類皮膚表皮機能の進化、国立遺伝学研究所 研究集会 新機能獲得の分子進化、2013年8月18日、国立遺伝学研究所（三島市・静岡県）

招待講演：松井 毅、皮膚特異的レトロウイルス型プロテアーゼ

SASPaseと哺乳類皮膚表皮の進化、第18回日本病態プロテアーゼ学会 学術集会、2013年8月17日、千里ライフサイエンスセンター（豊中市・大阪府）

招待講演：松井 毅、哺乳類皮膚表皮角質層の水分量を制御するプロテアーゼと皮膚表皮の進化、第1回メディショナルナノテク研究会、2013年6月28日、キャンパスプラザ京都（京都市・京都府）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 毅 (MATSUI TAKESHI)
国立研究開発法人理化学研究所・統合生命医科学研究センター・副チームリーダー
研究者番号：10452442

(2) 研究分担者

諸根 信弘 (MORONE NOBUHIRO)

京都大学 物質-細胞統合システム
拠点・客員教授
研究者番号：50399680

(3) 連携研究者

豊岡 公德 (TOYOOKA KIMINORI)
国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・上級研究員
研究者番号：10360596

(4) 連携研究者

藤原 敬宏 (TAKAHIRO FUJIWARA)
京都大学 物質-細胞統合システム
拠点・特定拠点准教授
研究者番号：80423060