

# 皮膚バリアシステムの自己組織化メカニズムの解明

京都大学ウイルス再生医科学研究所 組織恒常性システム分野

小田 裕香子

## 1. はじめに

### 【緒言】

上皮組織は外部環境と体内を隔てるバリアとして機能する。このバリア機能はタイトジャンクション(TJ)と呼ばれる細胞間接着装置によって担われる。TJの構成因子である Claudin ファミリーのノックアウトマウスは、胎生致死や脱水、難聴などの病態を示すことから、TJは生体内におけるバリア機能に必須の役割を果たしているといえる。一方で、TJがどのようにして形成されるかについては未だにほとんど不明である。

申請者はこれまでに、上皮細胞における TJ および TCJ の構築基盤とその機能を明らかにしてきた (Masuda and Oda et al., *J. Cell. Sci.* 2011, Oda et al., *J. Cell. Sci.* 2014, Oda et al., in preparation)。その研究過程で、TJの形成メカニズムの解明が必要であると感じていた。とりわけ、バリアとして生理的に重要な皮膚においては重層構造の中の極めて限定された細胞層にのみ TJ が存在することが知られ、時空間的に複雑な TJ 形成メカニズムが備わっていると予想された。そこで私は皮膚に着目し、TJ バリア形成機構の解明を目指した。すなわち、皮膚バリア獲得の仕組みを解明することで、上皮バリア形成メカニズムの包括的な理解につながるのではないかと考えた。

### 【目的】

本研究の準備段階において私は、外因性因子によって TJ が形成されるのではないかとという着想を得、驚くべきことに上皮組織由来の分泌液中に TJ 形成を誘導する因子が含まれていることを見出した。すなわち、ヒト皮膚由来 A431 細胞 (TJ 構成因子は細胞膜全体に発現しているが TJ を形成していない細胞) を、マウス上皮組織由来の分泌液で処理すると、1 時間後には Claudin-1 が細胞間接着部位に濃縮して TJ を形成することを見出した。この観察事実は、上皮細胞がバリア形成に必要な因子を分泌することを示唆する。これは、これまでにない全く新しい概念であり、皮膚を含む上皮組織にはバリアシステムの自己組織化能が備わっているという可能性を示唆している。そこで本研究では、皮膚重層化にともなうバリア獲得メカニズムの解明を切り口に上皮バリアの形成機構の理解を目指した。

### 【背景】

TJ の形成機構に関して、1970 年代にトリプシンを細胞に処理すると TJ が形成されることが複数のグループから報告されている (Orci et al., *Science* 1973, Shimono et al., *J. Ultrastruct. Res.* 1977, Polak-Charcon et al., *Exp. Cell Res.* 1978)。また、近年、セリンプロテアーゼのノックアウトマウスでは TJ が形成されないことが報告された (List et al., *Oncogene* 2002, Leyvraz et al., *J. Cell Biol.* 2005)。これらの報告は、プロテアーゼを含んだシグナル経路が TJ 形成を誘導することを示唆する。また、TJ の裏打ちタンパク質である ZO-1/ZO-2 が TJ の形成場所を制御することが報告されているものの (Umeda et al., *Cell* 2006)、TJ 形成をトリガーするものは一体何か、またその分子機構については全く不明である。TJ バリア形成機構を解明し、これを制御することが可能になれば、バリア形成不全が原因となる様々な病態へのアプローチも可能になる。

### 【序論】

皮膚のバリア機能は、角質層ならびに顆粒層のタイトジャンクション (TJ) によって担われることが知られる。皮膚 TJ の構成因子である Claudin-1 のノックアウトマウスは、脱水により生後致死となることから、TJ は皮膚バリアに必須であると考えられている (Furuse et al., *J. Cell Biol.* 2002)。一方、マウス発生過程において、皮膚は単層構造から段階的な分化過程を経て、有棘層、顆粒層、角質層からなる重層構造が形成される。最終分化した皮膚においては、TJ は顆粒層三層のうちの間層のみに存在すること

が知られる。しかしながら、皮膚がTJのバリアをいつどのように獲得するのか、また、多層構造をなす表皮中の限られた一層にのみTJが形成されるメカニズムは全く不明である。

本研究の準備段階において、マウス発生過程における皮膚構築に着目し上皮重層化とバリア形成を時空間的に観察していたところ、外因性因子によってTJが形成されるのではないかとこの着想を得た。そこで、培養皮膚細胞A431を用い、羊水・羊膜を始めとする様々なマウス組織由来分泌液を培養液中に添加すると、TJ形成が誘導されることを見出した。さらに、様々な上皮細胞・内皮細胞を用いた解析を通じ、この現象は皮膚細胞に限定した反応ではなく、上皮細胞・内皮細胞に普遍的な現象であると考えられる結果を得た。さらに、本研究において私は、この因子はペプチドであることを突き止め、同定に成功した。

## 2. 方法

### ・マウス皮膚発生の観察

妊娠14.5日、妊娠16.5日のマウスより胎児を取り出した後、凍結切片を作成し、蛍光抗体法にて染色を行った。

### ・腹膜培養上清の取得及び精製

マウス1匹よりサンプリングした腹膜を1ml HBSS中にて一晚培養し、その培養上清を98度で10分加熱した。遠心後の上清を「腹膜培養上清」とした。腹膜培養上清8mlをQカラムにアプライし、pH gradientにて溶出を行った。さらに活性のある画分をconAカラムにアプライし、精製を行った。この精製物についてMS解析を行ったところ、細胞外分泌・細胞膜タンパク質については2種類同定した。このうち、多く同定されたタンパク質X（特許申請の都合上、Xとする）に着目し、腹膜培養上清を抗X抗体で免疫沈降すると活性が見られたため、この免疫沈降物をC18カラムにアプライし、ペプチドの分離を行った。C18カラムで得られたピークのMS解析を行い、ペプチド配列を同定した。

### ・ paracellular flux

細胞をtranswellに播種し5日後、腹膜培養上清や合成ペプチドを3時間処理した。4kDaのFITC-dextranをアピカル側に添加し、1時間後基底側に漏れ出て来た蛍光量をプレートリーダーにて測定した。

### ・ TJ形成活性の画像定量化プログラム

細胞をclaudin抗体及びalpha-catenin抗体で免疫染色を行った。alpha-catenin染色像より細胞境界の膜成分を抽出し、その膜成分上のClaudinの面積x蛍光強度を算出した。「Claudinの面積x蛍光強度/膜成分面積」をTJ形成活性として数値化した。

## 3. 結果、研究成果

### 1) TJ形成誘導液性因子の発見

私は、マウス皮膚発生過程において、Claudin-1発現時期（E14.5）がTJ形成時期（E16.5）に先立つこと、TJが存在する顆粒層の前分化段階である基底層・有棘層においてもClaudin-1が存在することを見出した。これは、E14.5で細胞膜全体に局在していたClaudin-1が、E16.5までに細胞間接着部位に濃縮することによりTJが形成されることを示している。この観察事実は、TJ構成因子の発現制御ではなく、何らかのトリガーによりバリア形成のスイッチが入ることを示唆している。このトリガーが羊水や羊膜からのシグナルである可能性を考え検討を行ったところ、羊水中及び羊膜培養上清中にTJ形成誘導可能な液性因子が存在することを見出した。

### 2) TJ形成誘導因子の同定

次に様々なマウス組織の培養上清を用い、TJ形成誘導が可能かどうか検討を行ったところ、羊膜のみならず大半のマウス組織培養上清にTJ形成誘導因子が存在することがわかった。そこで、その中からシンプルな組織として腹膜を選択し、腹膜培養上清からTJ形成誘導因子の精製を行った。まず腹膜の分泌液に熱処理を行ったところ、熱処理後もTJ形成誘導活性は保持されていた。また、様々なポアサイズの透析膜を用いた実験結果より、目的因子は1kDa~3.5kDa程度であることがわかった。これらの結果より、TJ形成誘導因子はペプチドである可能性が高いと考えられた。陰イオン交換カラム・レクチンカラム・

C18カラムを用い精製し、京都大学薬学研究科 石濱泰教授との共同研究にて質量分析を行った。なお、精製の各フラクションのTJ形成活性の測定については、九州大学 内田誠一教授との共同研究により作成した画像定量化プログラムを用いた。質量分析で得られた候補ペプチドの絞り込み解析を行った結果、35アミノ酸からなるペプチド（特許申請の都合上、以後Xとする）の同定に成功した。

### 3) ペプチドXによるバリア形成

ヒト皮膚由来A431細胞に合成ペプチドXを添加すると、TJを形成することを見出した。FITC-dextranを用いた傍細胞透過性を測定したところ、機能的なバリアが形成されたと考えられた。この観察事実は、ペプチドによるバリア構築の誘導という全く新しい概念を提示するものである。

また、培養乳ガン細胞株MCF7に同様の処理を行っても、TJが形成されることがわかった。このことはTJを失ったガン細胞がTJ形成誘導因子によりTJを再獲得し、apical-basal極性を保った正常上皮様に変化することを示唆する。さらに、上皮細胞だけでなく、マウス血管内皮細胞株に対しても同様の処理を行ったところ、Cldn-5やVE-cadherinによる細胞間接着が強くなることがわかった。このことは、血管内皮細胞を介した血球細胞やガン細胞浸潤を制御している可能性を示すものである。

## 4. 考察、まとめ

本研究において、マウス腹膜培養上清中にTJ形成誘導因子が存在することを見出し、さらにその物質はペプチドであることを突き止めた。これらの「上皮・中皮組織由来の分泌液中にTJ形成を誘導する因子が存在すること」・「生理活性ペプチドによるバリア形成の誘導」はこれまでにない新しい発見である。

バリア破綻は炎症の原因・憎悪因子であることが知られる。すなわちTJ形成不全により、ウイルスや細菌などの病原体が上皮細胞層を透過しやすくなり、炎症が惹起・助長される。したがって、炎症時にはTJの速やかな再編成が必要である。ヒトにおいて、申請者が同定したマウスペプチドと相同性のある配列（ヒトペプチドYとする）が「全身性炎症症候群：SIRS」の患者血液に存在するバイオマーカーとして報告されている。このヒトペプチドYをA431細胞やMCF7細胞に添加処理してもTJ形成が誘導された。また、ヒトペプチドYコードするエクソンが、炎症惹起により転写誘導されることが報告されている。よって、これらのペプチドは炎症時に発現してTJ形成を誘導することで“抗炎症作用”を発揮している可能性があるのではないかと考えられる。

また、ヒト乳がん患者の乳管内分泌液に、このヒトペプチドYが存在することが報告されている。がんの進行と細胞接着の喪失は強い関わりがあることが知られるが、乳管内に存在するペプチドYは、がん化して細胞接着を失った乳腺上皮細胞を正常な上皮細胞に戻す作用がある可能性も考えられる。

## 5. 発表論文、参考文献

### 【雑誌論文】

Oda Y, Sugawara T, Fukata Y, Izumi Y, Otani T, Higashi T, Fukata M, Furuse M

The extracellular domain of angulin-1 and palmitoylation of its cytoplasmic region are required for angulin-1 assembly at tricellular contacts

Journal of Biological Chemistry 295(13), 4289-4302 (2020)

### 【知的財産】

名称: タイトジャンクション形成誘導剤

発明者: 小田裕香子、豊島文子、石濱泰

権利者: 京都大学

種類: 物の発明・用途発明

日本国出願年: 2019年(特願 2019-115248)

PCT 国際出願年: 2020年(PCT/JP2020/024154)