

表皮細胞接着因子のバイオイメーjing法の開発

慶應義塾大学医学部皮膚科学教室

天 谷 雅 行

In this study we attempted to develop a bioimaging analysis for epidermal cell-cell adhesion molecules, desmoglein (Dsg), as well as intermediate keratin cytoskeleton network. We used Dsg3, which is an autoimmune target antigen of pemphigus vulgaris, and keratin 14 and fused them with green fluorescence protein (GFP) or red fluorescence protein (RFP). When these chimeric molecules were introduced into cultured keratinocytes, we could observe time-lapse changes of Dsg3 and keratin as live images without killing or fixing cells. This approach has allowed us to overcome the limitations inherent in establishing a temporal sequence of events from fixed specimens, and to study the assembly and fate of desmosome precursors in living cells during junction assembly. We demonstrated the fate of Dsg3 and keratin after binding of AK23 pathogenic monoclonal IgG antibody. After binding of AK23 IgG, Dsg3 diminished on the cell surface and tended to be internalized into cytoplasm. The insertion of keratin filaments was also obscured and its retraction into cytoplasm was also observed. We are under way to generate transgenic mice with Dsg3-GFP to perform in vivo bioimaging analyses. These new technique for live image of epidermal cell adhesion molecules will provide a valuable tool to understand molecular mechanisms of normal skin, that will in turn contribute to cosmetic science.

1. 緒 言

本研究では、組換え蛍光蛋白質を用いて、表皮細胞間接着において重要な役割をするデスモゾーム関連蛋白のリアルタイムイメージング法を開発することである。細胞間接着に関与する蛋白の空間的情報（細胞内局在）及び時間的情報（経時変化）を解析し、全く新しい観点からデスモゾーム関連蛋白の機能解析を行うことである。正常な細胞間接着を保つことは、皮膚を健康に保つ基礎となっており、その分子基盤を解析するリアルタイムイメージング法は、化粧品学の進歩に大きく貢献するものと考えられる。

2. 実 験

デスモゾームは、全身の上皮組織、心筋、肝臓などに分布する主要な細胞間接着装置の一つであり、隣接する細胞同士を強固に接着させるとともに、ケラチンなどの中間径線維と結合することで各組織の形態を安定化させる役割をもつ。デスモゾームの構成蛋白には、膜貫通蛋白であるデスモグレイン (Dsg) およびデスモコリン (Dsc)、ならびに細胞内の裏打ち蛋白であるプラコグロビン (PG)、デスモプラキン (DP)、プラコフィリン (PKP) などの蛋白がある。これらの蛋白のうち、Dsg には Dsg1-Dsg4 の 4 種のアイソフォームが存在するが、その中でも Dsg1 および

Dsg3 は重層扁平上皮における角化細胞間の接着に重要な役割を示すと考えられている。

天疱瘡は、Dsg1 および Dsg3 に対する自己抗体が体内で産生された結果、重層扁平上皮のデスモゾーム同士の接着が障害されて表皮や口腔粘膜などに水疱やびらんを生じる自己免疫疾患である。自己抗体の標的となる Dsg の組織内分布と天疱瘡の表現形との関連についてはこれまでに詳細に解析されてきた。これに対し、自己抗体結合後にどのような機序で表皮細胞間の接着が障害され水疱が形成されるのかは未だ不明である。天疱瘡の病態を詳細に解明する上で、表皮細胞に自己抗体が結合する際、抗原蛋白を含め周囲のデスモゾーム関連蛋白がどのような挙動を示すかを、空間的情報（細胞内局在）ならびに時間的情報（経時的変動）の両面から解析することが現在求められている。

従来まで細胞内の蛋白質の局在を解析する方法としては、特異的な抗体を用いた免疫染色が主体であった。しかし、免疫染色は、ホルマリン、アセトンなどの種々の固定剤により組織、細胞を固定した後に蛋白の局在を検討するため、細胞が生きている状態での蛋白の局在を反映しているかは不明である。また、細胞を固定してしまうため同じ細胞内での蛋白の経時的变化を観察することは不可能であった。近年、蛍光蛋白質 (Green Fluorescence Protein, GFP など) を目的の蛋白と融合させた融合蛋白を作製し、それを機能プローブとして用いることで、生きた状態での細胞内局在を可視化する技術が可能となり、従来とは全く異なる視点で分子の細胞内動態を観察することができるようになった。

本研究では、デスモゾーム関連蛋白のリアルタイムイメージング法を開発し、細胞間接着におけるそれぞれの蛋白の挙動をリアルタイムで解析すると共に、天疱瘡の自己抗



Development of bioimaging analysis for epidermal cell adhesion molecules

Amagai Masayuki

Department of Dermatology, Keio University School of Medicine

体が結合してから水疱形成に至るまでの分子メカニズムに関する基礎的知見を得ることにある。デスモソーム関連蛋白ならびに表皮角化細胞の中間径線維であるケラチンに蛍光蛋白質を融合した発現ベクターを作製し、それぞれを培養角化細胞に導入して融合蛋白の発現を試みた。続いて細胞接着における発現蛋白の細胞内動態を経時的固定後の観察ならびにリアルタイムイメージング法により解析した。さらに培養角化細胞に抗Dsg3 IgG 抗体を反応させ、抗体とDsg3 とが結合した後の発現蛋白の細胞内動態を経時的固定後の観察ならびにリアルタイムイメージング法により試みた。

3. 結果

1) 蛍光蛋白質融合ケラチン 14 (K14) およびケラチン 5 (K5) の発現

ヒト K14 および K5 翻訳領域全長の cDNA を PCR 法により増幅し、これを Clontech 社の蛍光蛋白質発現ベクター pEGFP-C1 (緑) に挿入して 2 種類の発現ベクター (pEGFP-K14, pEGFP-K5) を作製した。またヒト K14 の cDNA については、同じく Clontech 社の GFP 変異蛋白質発現ベクターである pEYFP-C1 (黄)、pECFP-C1 (シアン) にも挿入して 2 種類の発現ベクター (pEYFP-K14, pECFP-K14) を作製した。

作製した 4 種類の発現ベクターについて、デスモソームを発現しない細胞株である CHO 細胞にそれぞれ FuGENE (Roche Applied Science) を用いて遺伝子導入したところ、発現した蛋白は細胞内で核周囲に凝集して認められ、正常なケラチンと同様の網状の構築を形成することはなかった。そこで 4 種類のベクターを培養ヒト表皮細胞株である KU8 細胞に遺伝子導入したところ、発現した蛋白は細胞内で網状の構築を形成するとともに、一部では隣接する細胞にむかってネットワーク状に伸張する像が認められ、この部位におけるデスモソームの裏打ち蛋白との結合が示唆された。これらの発現蛋白のうち EGFP-K14 については、安定形質導入 KU8 細胞株をネオマイシンで選択し、細胞間接着におけるケラチンの細胞内動態の解析に用いた。

2) 蛍光蛋白質融合 Dsg3 の発現

ヒト Dsg3 翻訳領域全長の cDNA を pEGFP-N1 に挿入して発現ベクター pEGFP-hDsg3 を作製した。作製した発現ベクターを KU8 細胞ならびに培養マウスケラチノサイト細胞株 Pam212 細胞に遺伝子導入したが、2 種類の細胞において融合蛋白の発現は全く認められなかった。

続いてマウス Dsg3 翻訳領域全長の cDNA を pEGFP-N1、pEYFP-N1、pECFP-N1、ならびに赤色変異蛋白質発現ベクターである pDsRed (Clontech 社) に挿入し、これらを KU8 細胞ならびに Pam212 細胞に遺伝子導入した。その

結果それぞれの融合蛋白が導入細胞の細胞質に発現して認められたものの、Dsg3 が本来発現する場所となる細胞膜表面での発現は認められなかった。

3) リアルタイムイメージング法による動態解析

過去に我々は、単独でマウス表皮に水疱を誘導する抗 Dsg3 マウスモノクローナル抗体 (AK23 mAb) を単離した。EGFP-K14 導入 KU8 細胞株を、ガラスベースディッシュでコンフルエントになるまで培養した後、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の AK23 mAb を反応させ、その後 AxioVision 社の Delta Vision 撮影装置を用いて EGFP-K14 の細胞内動態を 12 時間まで観察した。その結果、AK23 mAb 反応後 0.5 時間より EGFP-K14 のごく一部で接着面の細胞膜への insertion が消失し、ケラチン線維が細胞の中心へと retract している像が見られたが、ほとんどのケラチン線維は反応後 12 時間においてもそのまま膜に insertion した状態で認められ、keratin retraction は認められなかった。その理由として、株化された角化細胞が単層培養下で Dsg2 を発現するため、Dsg2 を裏打ちする部分で EGFP-K14 の retraction が認められなかった可能性が示唆された。そこで細胞培養下で Dsg2 を発現しない正常ヒト表皮角化細胞 (NHEK) を今後の実験に用いた。

4) NHEK 細胞における抗 Dsg3 IgG 抗体結合後の K14、Dsg3 の動態解析

pEGFP-K14 を FuGENE (Roche) を用いて NHEK 細胞に遺伝子導入し、GFP 融合 K14 の発現を試みたが、融合蛋白の発現は遺伝子導入後 72 時間まで認められなかった。そこで NHEK 細胞をガラスベースディッシュでコンフルエントになるまで培養し、その後培養液を高 Ca 培地 (1.2mM Ca 含培地) に変更してさらに 12 時間培養した。培養後の NHEK 細胞に対し、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の AK23 mAb を 0.5 ~ 24 時間反応した。固定後、ケラチン線維をウサギ抗ケラチン抗体ならびに緑色蛍光色素 (Alexor Fluor 488) で標識した抗ウサギ IgG 抗血清 (Molecular Probes 社) を用いて染色すると共に、膜状に結合した AK23 mAb を Alexor Fluor 546 標識抗マウス IgG 抗血清 (Molecular Probes 社) を用いて染色した。その結果ケラチン線維の retraction 像は、EGFP-K14 発現 KU8 細胞を使用したときよりも明瞭に観察された。しかしこの方法では、ケラチン線維が点状の蛍光として認められたこと、ならびに一部のケラチン線維では AK23 mAb 反応後 24 時間が経過しても細胞膜からの retraction が認められなかったことなどの問題を伴っていた。

後者については Ca シフトにより重層化した NHEK 細胞が Dsg1 を発現するため、Dsg1 を裏打ちする部分でケラチン線維の retraction が認められなかった可能性が考え

られた。そこで NHEK 細胞を AK23 mAb と反応する直前に、Dsg1 の細胞外を切断することでその接着機能を障害する黄色ブドウ球菌産生表皮剥脱毒素 (ETA) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を反応させ、その後 AK23 mAb 反応後のケラチン線維および AK23 mAb の細胞内動態を経時的に観察した。その結果、AK23 mAb 反応後 6 時間より、角化細胞同士の接着面においてケラチン線維の細胞膜からの retraction ならびに AK23 mAb の internalization が明瞭に観察された (図 1)。

以上の結果より、AK23 mAb との反応によってケラチンの retraction および Dsg3 の internalization が生じることが示唆された。しかしケラチン線維が点状の蛍光として認められる問題については解決が得られないため、アデノウイルス発現系を用いた EGFP-K14 cDNA の NHEK 細胞への遺伝子導入、ならびにその融合蛋白の発現を試みた。

5) アデノウイルス発現系による EGFP-K14 の NHEK 細胞での発現

EGFP-K14 の cDNA を挿入した組換えアデノウイルスを、TAKARA 社の Adenovirus Expression Vector Kit

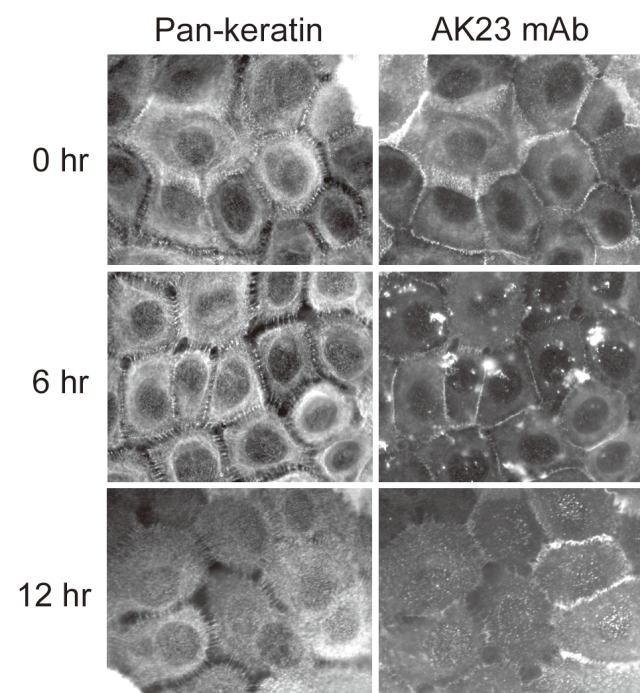


図 1 AK23 mAb 反応前後の NHEK 細胞におけるケラチン線維および AK23 mAb の細胞内動態。

AK23 mAb 反応前の NHEK 細胞では、ケラチン線維の染色が細胞質全体および接着面の細胞膜表面において点状に認められ (A)、また AK23 mAb の染色も接着面の細胞膜上に点状に配列して認められた (B)。AK23 mAb 反応 6 時間後より、ケラチン線維の膜表面からの retraction (C)、ならびに AK23 mAb の細胞質内への internalization (D) が認められ、これらの反応は AK23 mAb の反応後 12 時間後でより顕著となった。(E, F)。

を用いて作製した。すなわち pEGFP-K14 より EGFP-K14 の cDNA を制限酵素を用いて切断し、末端を平滑末端処理した後にコスミドベクター pAxcw に挿入した。作製した cDNA 挿入コスミドベクターを STRATAGENE 社の GIGAPACK III XL を用いて Lambda Phage にパッケージングし、コスミドベクターを増幅した。増幅したコスミドベクターを制限酵素処理済み DNA-TPC とともに 293 細胞に co-transfect し、出現した組換えアデノウイルスを回収した。ウイルス液を 4 回以上継代して高力価ウイルス液を作製し、これを NHEK 細胞に感染させて EGFP-K14 の発現の有無を観察した。その結果、感染後 24 時間より EGFP-K14 が NHEK 細胞質内で高率に発現し、かつ線維状の蛍光パターンとして観察された (図 2)。

低濃度のカルシウムの培養液中で角化細胞を培養すると、デスモゾーム蛋白は産生されるものの、デスモゾームは形成されない。しかし、培養液中のカルシウムの濃度を上昇させると、比較的短時間で、細胞と細胞が接着し、デスモゾームが形成されることが知られている。そこで培養液中の Ca 濃度を高濃度へシフトし、角化細胞表面にデスモゾームが形成されたときに EGFP-K14 の接着面に向かっての insertion に変化が見られるか解析した。まず NHEK 細胞を無 Ca 培地で培養したときには、EGFP-K14 が細胞質内に網状の構造を形成して認められたが、接着面に向かってネットワーク状に伸張する像は認められず、細胞膜への insertion は認められなかった。これに対し培養液を高 Ca 培地 (1.2mM Ca 含培地) に変更したときには、EGFP-K14 が接着面に向かって insertion する像が観察された (図 7)。さらに培養液を再び無 Ca 培地に変更したところ、EGFP-K14 が接着面に向かって insertion する像が再び認められなくなった。

以上の結果より、アデノウイルス発現系を用いて発現させた EGFP-K14 は、NHEK 細胞において高率に発現する

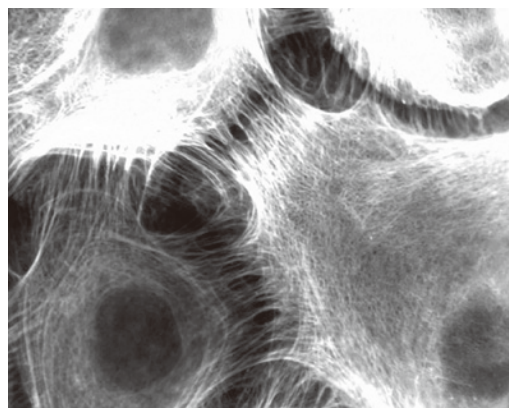


図 2 Adenovirus 発現系で NHEK 細胞に発現した EGFP-K14。

EGFP-K14 が NHEK 細胞の細胞質内で明瞭な線維状の蛍光パターンとして観察された。

とともに、正常なケラチンと同様、高Ca条件下ではデスモソームの形成に伴いデスモソームの裏打ち蛋白と結合する可能性が示唆された。

6) 水疱形成能の異なる抗Dsg3 IgG抗体結合後のK14、Dsg3の動態解析

過去に天疱瘡モデルマウスより単離した複数のAK mAbの中で、マウスへの投与により明らかな水疱形成を誘導するAK23 mAbと、水疱形成を誘導しないAK7 mAb、AK18 mAb、AK20 mAbについて、それぞれのNHEK細胞に対する接着障害活性の違いをDissociation assayを用いて解析した。さらにEGFP-K14を発現させたNHEK細胞にそれぞれのmAbを反応した後の、EGFP-K14およびDsg3の挙動について解析を行った。NHEK細胞をコンフルエントになるまで培養した後、培養液を高Ca培地へシフトして重層化し、そこにAK7 mAb、AK20 mAb、AK23 mAbを37℃、24時間反応した。

その後0.5 mg/mlのETAを37℃、2時間反応し、さらにDispase (Roche Diagnostics)を15分間反応してNHEK細胞をディッシュから剥離した。剥離後、角化細胞のシートに対しピペッティングで物理的刺激を加え、固定後断片化した角化細胞のシート数を計数した。その結果断片化したシート数は、AK23 mAb反応後に最も多く認められたのに対し、AK7 mAb、AK20 mAbを反応したときには断片化は顕著ではなかった。さらにNHEK細胞を異なる濃度のAK23 mAbと反応してDissociation assayを行ったところ、断片化したシート数はAK23 mAbが増加するにつれ用量依存性に増加した(図3)。

続いてアデノウイルス発現系によりEGFP-K14を発現させたNHEK細胞を、あらかじめ1 mg/mlのETAで処理した後、100 mg/mlのAlexor Fluor 546で標識したAK23 mAb、ならびに新生仔マウスへの投与で明らかな水疱形成を認めないAK18 mAbと反応させ、その後Axio社のDelta Visionを用いてEGFP-K14ならびにAK

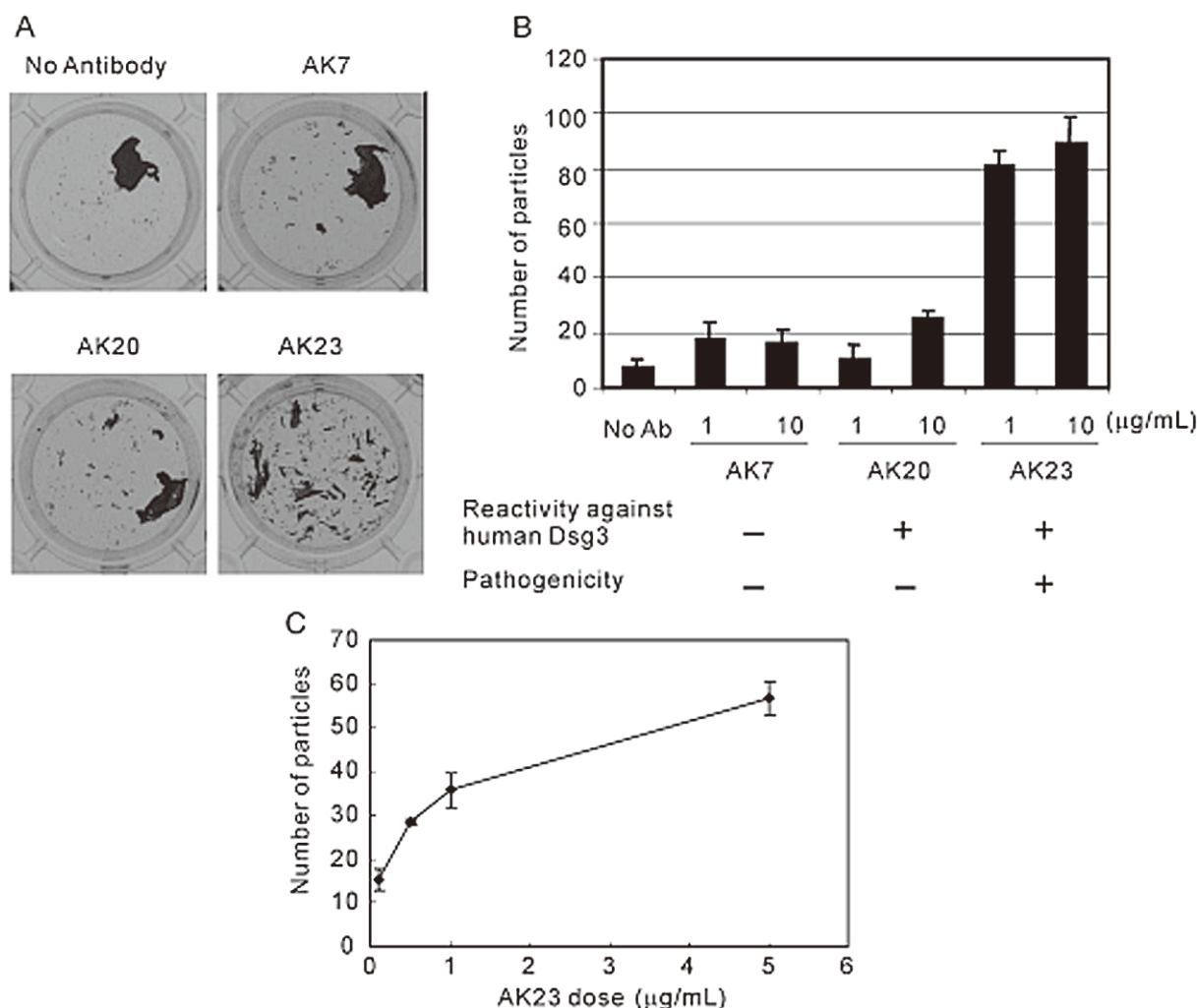


図3 Dissociation assayによるAK mAbの接着障害活性の比較。

断片化したシート数はNHEK細胞をAK23 mAbと反応したとき最も多く認められた(A, B)。またAK23 mAb反応後の断片化したシート数は、反応に用いたAK23 mAbの濃度を増加することで用量依存性に増加した。

mAb の細胞内動態の違いを 8 時間まで観察した。その結果 AK23 mAb を反応させた NHEK 細胞では、反応後 0.5 時間より EGFP-K14 の細胞内への retraction ならびに AK23 mAb の細胞内への internalization が認められたのに対し、AK18 mAb を反応させた細胞では、EGFP-K14 の retraction および AK18 mAb の internalization とともに反応後 8 時間まで明瞭ではなかった (図 4)。

7) EGFP-K14 トランスジェニックマウスの作製

アデノウイルス発現系にて導入に成功した EGFP-K14 の cDNA を、K5 プロモーター (13 kb) の下流に挿入した cDNA コンストラクト pGEM-K5pro-EGFP-K14 を作製した。この cDNA コンストラクトを、マウス角化細胞株 Pam212 細胞に前述の FuGENE (Roche Applied Science) を用いて遺伝子導入したところ、発現した蛋白は細胞内で網状の構築を形成するとともに、一部では隣接する細胞にむかってネットワーク状に伸張する像が認められた。

4. 考 察

本研究は、従来不可能であったデスモゾーム関連蛋白の生細胞における分子動態を、リアルタイム解析という新しい観点から解析するものである。その成果は in vivo における細胞間接着機構を理解する上で新しい視点を導入するものであり、皮膚科学のみならず、細胞生物学を含めた基礎医学に対する多大な貢献が期待される。また本研究における解析の結果、天疱瘡の水疱形成のメカニズムが分子動態の観点から明らかにされることで、ステロイド、免疫抑制剤などの副作用の多い現行の治療法とは全く異なる新しい治療法の開発が可能となるかもしれない。

正常な細胞間接着を保つことは、皮膚を健康に保つ基礎となっており、その分子基盤を解析するリアルタイムイメージング法は、化粧品学の進歩に大きく貢献するものと考えられる。

5. 総 括

本研究では、表皮細胞間接着において重要な役割をするデスモゾーム関連蛋白のリアルタイムイメージング法を開発するとともに、抗 Dsg3 IgG 抗体反応後の細胞間接着におけるそれぞれの蛋白の空間的情報 (細胞内局在) 及び時間的情報 (経時変化) を解析し、デスモゾーム関連蛋白の機能解析を行った。その結果抗 Dsg3 IgG 抗体の反応後に、角化細胞同士の接着障害が見られると共に、Dsg3 の細胞内への internalization およびケラチン線維の細胞膜からの retraction が生じることが明らかとなった。またマウス表皮での水疱形成能の異なる AK mAb を角化細胞に反応させた際、Dsg3 とケラチンの挙動に違いが見られることを細胞レベルで明らかにした。本研究の成果は、天疱瘡における水疱形成機序を分子レベルで解明する上での新しい所見を得ただけでなく、表皮細胞間接着の分子機構についても新しい視点を導入するものと考えられた。また本研究では達成できなかったものの、Dsg3、PG、DP 等のデスモゾーム関連蛋白を蛍光色素により可視化することで、デスモゾームにおけるこれらの蛋白の動態をリアルタイムで解析することが可能となると考えられた。さらに本研究においてその開発に着手した EGFP-K14 トランスジェニックマウスは、in vivo における天疱瘡の分子病態メカニズムならびに細胞間接着の分子機構を理解する上で重要なツールとなると考えられた。

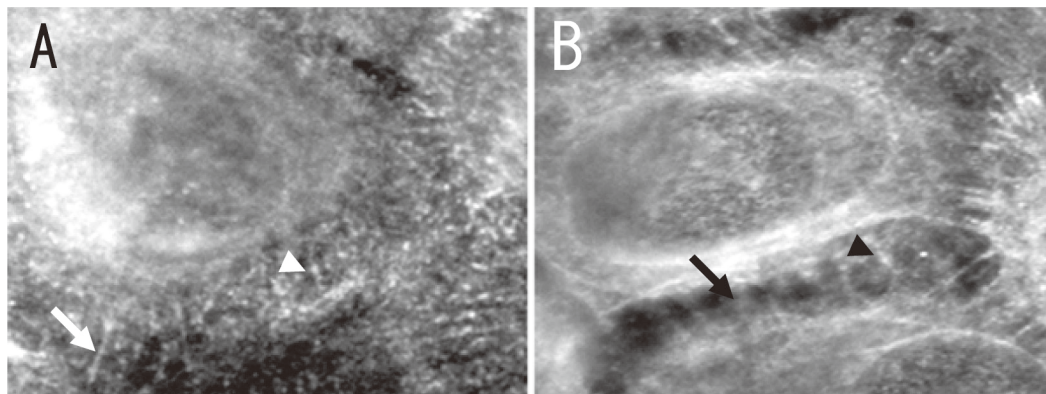


図 4 AK18 mAb(A) ならびに AK23 mAb(B) を反応させた NHEK 細胞における EGFP-K14 および Dsg3 の細胞内動態。

AK18 mAb を反応させた細胞では、AK23 mAb を反応させた細胞と比べ、EGFP-K14 (矢印) および AK mAb (矢頭) の細胞内への移動は明瞭ではなかった。