

皮膚角化層形成にともなう 上皮細胞のダイナミズムを制御する分子メカニズム

岐阜大学大学院医学系研究科生命機能分子設計分野

大沢 匡毅

The skin epidermis serves as a protective barrier that shelters the body from environmental insults and dehydration. Defects in skin barrier result in various forms of skin inflammatory diseases including psoriasis and atopic dermatitis, the most common diseases in the human population. Therefore, understanding molecular basis of skin barrier formation has important implications for establishing effective therapeutic strategies for such skin disorders.

One of the key aspects of terminal differentiation of epidermal keratinocytes is dynamic cellular remodeling, in which various filamentous proteins and lipids are cross-linked to form rigid bundles and cell organelles including nucleus and mitochondria are eliminated to induce cell death. Although each of these processes has been extensively studied, the molecular mechanism that coordinates these events to achieve the dramatic cellular remodeling is poorly understood. One candidate mechanism that enables such quick remodeling might be autophagy, a process that promotes cellular self-cannibalization. Autophagy is an intracellular bulk degradation system that delivers cytoplasmic organelles and proteins to the lysosome, where they are degraded to be quickly eliminated from the cell. Accumulating evidence indicates that autophagy has been implicated in wide range of the cellular remodeling that occurs during organogenesis, thereby enabling cells to rapidly differentiate or change their fate in order to acquire new functions. Therefore, we hypothesize that the induction of autophagy may play an important role in promoting epidermal terminal differentiation. In this study, we aim at obtaining an experimental proof for the involvement of autophagy in the regulation of epidermal terminal differentiation and barrier formation. Our study will uncover a novel role of autophagy in regulating epidermal barrier formation and provide new insights into development of novel therapeutic strategies for skin disorders.

1. 緒言

皮膚は生体内の環境と外界とを隔てるバリアとして働く。このような皮膚上皮のバリア機能は、皮膚上皮の最上層に存在する角質層によって維持されている。従来の研究によって、角質層の機能異常による皮膚のバリア機能の低下がさまざまな皮膚病の原因となっていることが示されている¹⁾。角質層は、細胞骨格の再編成、脱核、ミトコンドリアや細胞内小器官の除去、細胞死など、上皮細胞がダイナミックなリモデリングを果たすことによって形成される²⁾。しかし、このような細胞のダイナミズムがどのような分子的機構によって制御されているのかについては明らかにされていない。近年の研究から、細胞内小器官のクリアランスにオートファジーが中心的な役割を果たしていることが示されている³⁾。そこで、我々は、皮膚上皮の角質化の過程においても細胞のリモデリングにオートファジーが何らかの役割を果たしているという仮説を考えた。

我々は、従来の研究で、皮膚上皮細胞の増殖分化の制御にNotchシグナルが中心的な役割を果たしていることを示した⁴⁾。Notchシグナルを皮膚上皮細胞特異的にノック

アウトしたマウスを作成したところ、角化層形成が著しく低下していることを認めた。この結果からNotchシグナルの活性化が角化層の形成に対し必須な作用を持つことが判明した⁴⁾。我々は、Notchシグナル経路の下流で角化層の形成を制御する分子を検索し、オートファジー制御因子Bnip3に注目するに至った。遺伝子発現解析実験によりBnip3の発現がNotchシグナルの支配下で制御されていることが確認され、また、組織学的解析により皮膚の顆粒層細胞にBnip3の発現が局在していることが示された。さらに、培養ケラチノサイトを用いてBnip3の分子機能解析を行い、Bnip3がケラチノサイトのオートファジーを誘導するとともに細胞分化を促進する作用を持つことを明らかにした⁵⁾。しかし、Bnip3ノックアウトマウスでは皮膚上皮の角質化が正常に起こることから、生体内のケラチノサイトではBnip3の作用を補完する何らかの分子が存在していることが考えられた。

以上の成果を踏まえ、本研究では、Bnip3の類縁分子であるNix (Bnip3l) に注目し³⁾、NixがBnip3と協調的に働くことによってケラチノサイトのオートファジー誘導や細胞分化が制御されているという仮説を立て、ケラチノサイトに対するNixの分子機能を明らかにすることを目標に研究を進めた。

2. 実験

2.1. マウス皮膚切片および培養ケラチノサイトの免疫組織染色

子宮から取り出したマウス胎児をPBSで洗浄後、氷上



Molecular mechanisms of epidermal cornification during skin development

Masatake Osawa

Department of Regeneration and Applied Biomedical Sciences, Graduate School of Medicine, Gifu University

で冷やした4% PFA 溶液に浸し、800wの電子レンジで1分間マイクロウェーブ処理をした後に氷上で30分間放置し固定を行った。マウスの胎児または新生児から採取した皮膚片についても同様な方法によって固定を行った。固定した胎児または皮膚片はOTCコンパウンドに包埋し液体窒素中で凍結させ凍結ブロックを作成した。

クリオスタットにより厚さ10 μ mの切片を作成した。凍結切片を4% PFA 溶液に浸し0 $^{\circ}$ Cで10分間固定を行った。固定後、切片をPBS+1% SDS 溶液に浸し室温で10分放置し抗原賦活化処理を行った。その後、切片をPBS+0.05% Tween-20によって5回洗浄することにより浸透化処理を行った。浸透化した切片をPBS+5% Skim milk+0.05% Tween-20 (ブロッキング液) に浸し4 $^{\circ}$ Cで一晩ブロッキングを行った。ブロッキングを行った切片に対し、1次抗体を含むブロッキング液を添加し室温で1時間反応をさせた後に、Alexa 488またはAlexa 555をコンジュゲートとした2次抗体と反応させた。抗体染色を終えた切片は、PBS+0.05% Tween-20によって3回洗浄した後、DAPIを含むAnti-fade gold (In Vitrogen社)封入剤を添加しカバーガラスで封入した。

封入後のサンプルはコンフォーカル顕微鏡によって観察を行った。

2. 2. マウスケラチノサイトの初代培養および3次元重層化皮膚上皮構築培養

胎生15日目のマウス胎児から皮膚を採取し、PBS+1mM EDTA 溶液の表面上に浮かせ37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。実体顕微鏡下でピンセットを用いて表皮と真皮を分離した後、表皮をTrypLE Express (Gibco社) 上にのせ、37 $^{\circ}$ Cで20分間インキュベートした。その後、ペトリディッシュの底面に表皮を擦りつけ細胞を解離させた。解離した細胞をCnT-57 培地 (CELLnTECH社) に懸濁し、遠心分離によって細胞を回収した。細胞を4 \times 10⁴個/cm²になるように播種し培養を行った。ケラチノサイトの3次元重層化培養は、3D Keratinocyte Starter Kit (CELLnTECH社) のプロトコールを改変して行った。Milliporeカルチャーインサートの培養膜上に1型コラーゲンを加えゲルを形成させた。1 \times 10⁶個/mLの培養ケラ

チノサイトの懸濁液を予めコラーゲンゲルを形成させたカルチャーインサート上に添加し、CnT-PR 培地を加え細胞がコンフルエントになるまで培養を行った。その後、インサート内の培地を除去し、細胞を空気曝露させた。インサート外にCnT-PR-3Dを添加し、CO₂ インキュベーター内で14日間培養を行い、皮膚上皮の積層化を誘導させた。

2. 3. 培養ケラチノサイトの分化誘導

初代培養ケラチノサイトにTryLE Express (Gibco社) を加え、細胞をディッシュから剥離させた後に、0.5 mM CaCl₂ を添加したCnT-02 培地 (CELLnTECH社) に細胞を懸濁し、非付着性ペトリディッシュ上に播種し浮遊細胞培養を行った。分化誘導後、継時的に細胞を回収し、qRT-PCR アッセイおよびウエスタンブロッティングによりケラチノサイトの各種マーカー分子の発現変化を解析した。

2. 4. siRNAを用いた遺伝子ノックダウン

初代培養ケラチノサイトに対し、Lipofectamine RNAi MAX (In Vitrogen社) を用いてsiRNAのトランスフェクションを行った。トランスフェクションに用いたsiRNAは以下の通りである。

Nix-si#1: GCCATGCAGTTACATCTCTTT
Nix-si#2: GCCTAGACATACATGAAACTT
Nix-si#3: GTCCATCAGTGAGCTTGTACA
Scrambled: GTTCGTAACCATGCCTCTATT

3. 結果

3. 1. マウス皮膚上皮発生期におけるNixの発現パターン

皮膚上皮は胎児期14.5~15.5日目に基底層の細胞が積層化を開始することによって始まり、胎児期18.5日目頃に角化層形成が起こり皮膚上皮の発生が完了する。皮膚上皮発生過程におけるNixの発現パターンを調べるために、胎児期15.5日目以降の皮膚切片を作成し、抗Nix抗体を用いて免疫組織染色を行った。その結果、皮膚上皮におけるNixの発現は胎児期16.5日目以降から認められるようになり、その発現は顆粒細胞層に局限していることが判明した(図1)。顆粒層は角化層へと最終分化を起こす過程にあ

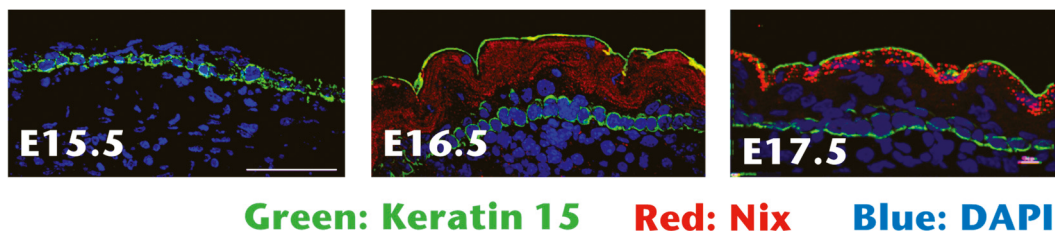


図1 マウス胎児皮膚上皮におけるNixの発現パターン
胎生15.5日目、16.5日目、および17.5日目から採取した皮膚切片を抗Nix抗体および抗ケラチン15抗体を用いて免疫組織蛍光染色を行い、コンフォーカル顕微鏡によって観察した。Nixの発現は胎生16.5日目より認められるようになり、その発現は皮膚上皮の顆粒層に局在していることがわかった。

る細胞であることから、Nixが最終分化に何らかの作用を果たしていることが考えられた。

3. 2. 培養ケラチノサイトを用いたNixの分子機能解析

ケラチノサイトをカルシウムイオン存在下で浮遊培養を行うと、ケラチノサイトは速やかに最終分化を起し、脱核まで至る⁶⁾。このようなケラチノサイトの分化誘導培養系を用いて、Nixの分子機能解析を行った。

はじめに、ケラチノサイトの分化とNixとの発現の関連性を調べるために、浮遊培養開始前のケラチノサイトと24時間の浮遊培養を行ったケラチノサイトをそれぞれ回収し、ケラチノサイトの分化マーカーである*Krt1*と*Krt10*の遺伝子発現量およびNixの遺伝子発現量をqRT-PCR法によって比較定量を行った。その結果、*Krt1*と*Krt10*同様に、Nixの遺伝子発現量が細胞分化誘導刺激により著明に上昇することを認めた(図2)。一方、Nixの類縁分子である*Bnip3*については分化誘導刺激の前後においてその発現量に有意な差が認められなかった。我々は、従来の報告で*Bnip3*がケラチノサイトの分化に重要な働きをしていることを示したが、この結果より、浮遊培養による分化刺激に

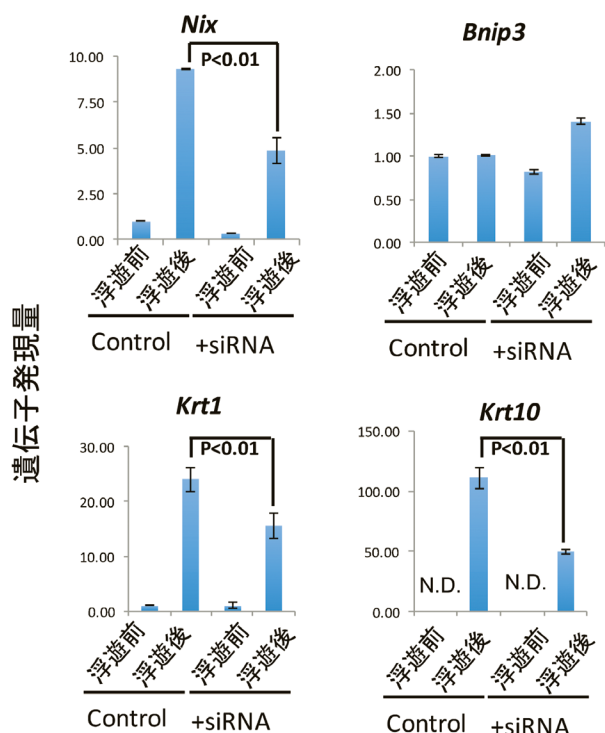


図2 ケラチノサイトの分化誘導開始前後における各種遺伝子の発現変化およびNix遺伝子ノックダウンが分化に及ぼす影響

浮遊培養による分化誘導前のケラチノサイトと、24時間分化誘導を行ったケラチノサイトからRNAを回収した後、qRT-PCR法によってそれぞれの遺伝子発現量を比較定量した。Nixに対するsiRNAをトランスフェクションしたケラチノサイトについても同様な定量を行った。

対してはNixの方がより鋭敏に反応することを示している。

従来の報告から、Nixはオートファジー(ミトファジー)を誘導することで細胞からミトコンドリアを除去する働きを持つことが示されている⁷⁾。このことから、浮遊培養によって誘導されるNixの発現上昇がケラチノサイトにおけるミトコンドリア除去に関与している可能性が考えられた。このような可能性を調べるために、浮遊培養による分化誘導刺激によりケラチノサイトにおいてオートファジーが起こるかどうかが検討を行った。浮遊培養12時間後のケラチノサイトをサイトスピンによって回収し、抗LC3抗体と抗Nix抗体を用いて細胞免疫染色を行った。その結果、浮遊培養後のケラチノサイトにおいてNixの発現が認められるとともに、細胞質にLC3陽性の顆粒が観察され、オートファゴソーム形成が起こっていることが示唆された。また、浮遊培養後のケラチノサイトを経時的に回収し、抗LC3抗体を用いてウエスタンブロッティングを行ったところ、オートファゴソーム形成を示すLC3B-IIのバンドが時間経過とともに増強することが明らかになり、ケラチノサイトにおいてオートファジーが誘導されていることが判明した(図3)。また、浮遊培養後のケラチノサイトを、抗LC3抗体および抗ミトコンドリア抗体(Tomm20)を用いて免疫染色を行ったところ、LC3陽性のオートファゴソームとミトコンドリアが共局在していることが観察され、浮遊培養後のケラチノサイト中でミトファジーが起こっていることが示唆された。また、より長期間の浮遊培養を行ったケラチノサイトの中には、脱核を完了しミトコンドリアを失っ

浮遊培養後の経過時間

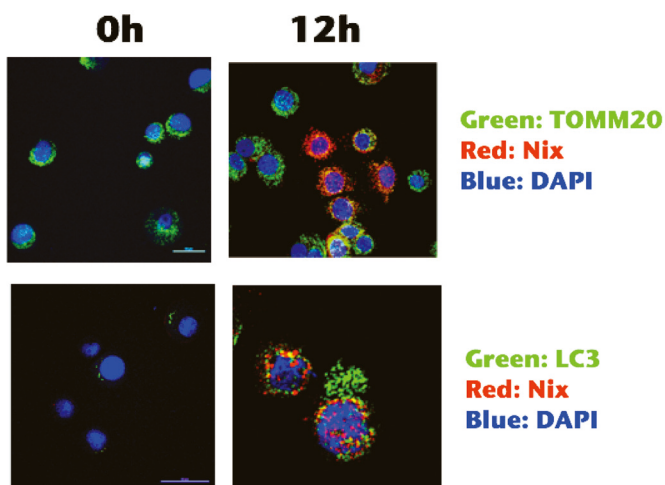


図3 ケラチノサイトの分化刺激によって起こるNixの発現誘導とオートファゴソーム形成

ケラチノサイトの浮遊培養を行い分化誘導刺激を行った。その後ケラチノサイトを回収し、抗ミトコンドリア抗体(Tomm20)、抗Nix抗体、および抗LC3抗体を用いて免疫染色を行った。

た細胞が認められ、これらはNixを強く発現していることがわかった(図4)。これらの結果から、ケラチノサイトの分化誘導に伴い、Nixの発現、ミトファジーの誘導、およびミトコンドリアの排除がシークエンシャルに起こることが明らかになった。

ケラチノサイトにおけるNixの機能を調べるために、siRNAを用いてNix遺伝子のノックダウンを行い、ケラチノサイトの分化やオートファジー誘導に対する影響を調べた。Nixに対する3つの異なるsiRNAを設計し、ノックダウン効率が90%以上であることを確認した。Nixに対するsiRNAをトランスフェクションした培養ケラチノサイトに対して浮遊培養によって分化刺激を与えた後、分化マーカー遺伝子の発現量をqRT-PCR法によって比較定量するとともに、抗LC3抗体を用いてウエスタンブロッティング法によりオートファゴソーム形成に対する影響を解析した。その結果、Nixのノックダウンにより、浮遊培養刺激誘導性のケラチノサイトの分化に遅延が起こるとともに、オートファゴソーム形成が低下することが認められた。これらの結果から、Nixがケラチノサイトの分化やオートファジーの誘導に重要な役割を果たしていることが示唆された(図5)。

3. 3. 皮膚3次元培養系を用いたNixの分子機能解析

以上の研究では、ケラチノサイトの浮遊培養系を研究ツールとして用いてNixの分子機能解析を行った。しかし、このような培養系は人為的であり、それによって得られた知見についても生理的現象を反映していない可能性が考え

られた。そこで、皮膚上皮形成の過程をより忠実に再現できる皮膚3次元培養系を用いて、ケラチノサイトに対するNixの分子機能について再検討を行った。

培養ケラチノサイトをコラーゲンゲルの上に播種し空気に暴露し積層化を誘導した。培養9日目には積層化が完了し、顆粒層および角化層が認められ、組織学的所見上は生体の皮膚上皮と同等な構造が観察された。このようにして作成した3次元構成皮膚の切片を、抗LC3抗体、抗ミトコンドリア抗体、および抗Nix抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、3次元構成皮膚においても、顆粒層および角化層からミトコンドリアが消失していることが観察されるとともにNixの発現とオートファゴソームの形成が認められ、生体の皮膚上皮と同様な現象が起こっていることがわかった(図6)。そこで、Nixの分子機能を調べるために、予めNixに対するsiRNAをトランスフェクションした培養ケラチノサイトを用いて皮膚3次元培養を行った。その結果、Nixに対するsiRNAによって処理を行ったケラチノサイトを用いた場合には、積層化が著しく阻害され、明瞭な皮膚上皮が形成されなかった(図6)。この結果より、Nixはケラチノサイトの分化や積層化構造の構築に必要な役割を果たしていることが示唆された。

4. 考 察

本研究では、ケラチノサイトの分化や角化細胞形成に対するNixの役割について検討を行った。これまでに、皮膚上皮におけるNixの発現について解析された例はない。そ

浮遊培養後の経過時間

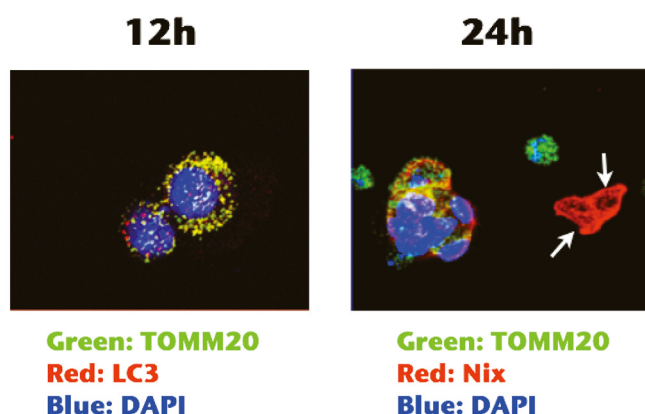


図4 ケラチノサイトの分化刺激によって起こるミトファジーとミトコンドリアの消失

ケラチノサイトの浮遊培養を行い分化誘導刺激を行った後、ケラチノサイトを回収し、抗ミトコンドリア抗体(Tomm20)、抗Nix抗体、および抗LC3抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。左写真: ミトコンドリアとオートファゴソームの共局在が認められることよりミトファジーが起こっていることがわかる。右写真: 分化誘導刺激24時間後には脱核ミトコンドリアを失った細胞が認められた。

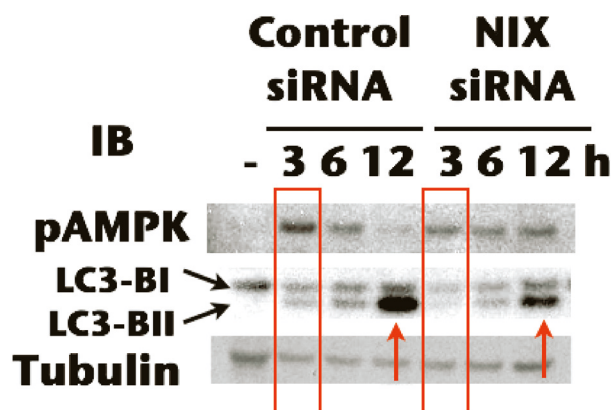


図5 ケラチノサイトの分化刺激によって起こるオートファジー誘導

ケラチノサイトの浮遊培養を行い分化誘導刺激を行った後、経時的にケラチノサイトを回収し、抗LC3抗体を用いてウエスタンブロッティング法によりオートファゴソーム形成に対する影響を解析した。オートファゴソーム形成が起こるとLC3のC末がリン脂質と共有結合を起こし、LC3-BIIの割合が増加する。

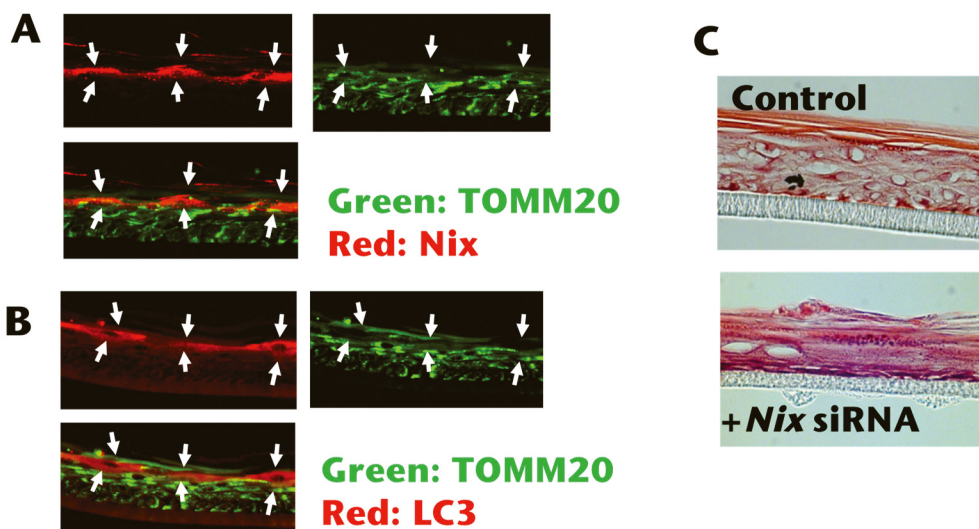


図6 A、B：皮膚3次元培養において認められるオートファジー誘導とミトコンドリアの除去、C：Nixのノックダウンが皮膚3次元培養に及ぼす影響
 A、B：ケラチノサイトの3次元培養によって作成された皮膚片を抗ミトコンドリア抗体(Tomm20)、抗Nix抗体、および抗LC3抗体を用いて免疫蛍光染色を行った。白矢印で挟んだ領域ではNixの発現およびオートファジーが認められミトコンドリアが存在しない。C：Nixのノックダウンしたケラチノサイトを用いた場合は積層化が起こらない。

ここで、本研究では、まず、免疫組織染色法を用いて皮膚上皮発生過程におけるNixの発現パターンを詳細に解析した。その結果、Nixが皮膚上皮の顆粒層に局限して発現していることが明らかになった。我々は従来の研究において、Nixの類縁分子であるBnip3も顆粒層に発現していることを報告している。これらの結果から、皮膚上皮顆粒層の細胞にはNixとBnip3が共に発現していることが示された。今後、これらの分子についてより詳細な機能解析を行うためには、遺伝子ノックアウトマウスを作成し、皮膚上皮における表現型について詳細に解析を行う必要がある。NixとBnip3は互いに重複する機能を持ち、それぞれを補完しあうことができる。皮膚上皮にNixとBnip3が共発現しているという結果から、遺伝子ノックアウトマウスを作成し分子機能解析を行う際には、これらの分子の補完作用を避けるために、双方の遺伝子を同時にノックアウトしたマウスを作成する必要性が考えられる。我々は、すでに双方の遺伝子を皮膚上皮特異的にノックアウトしたマウスの作成に着手している。

本研究では、培養ケラチノサイトを用いてNixの発現解析および分子機能解析を行った。その結果、ケラチノサイトの分化に伴いNixの発現が著明に上昇するとともにオートファゴソームの形成が誘導されることを見出した。また、Nix遺伝子の発現をsiRNAによってノックダウンしたところ、ケラチノサイトの分化とオートファゴソーム形成が遅延することが認められた。これらの結果より、Nixがケラチノサイトの分化や分化に伴うオートファジーの誘導に関

与していることが示唆された。また、我々は、従来の研究において、Bnip3の分子機能解析を行い、Nixと同様にBnip3についてもケラチノサイトの分化やオートファジー制御に関与していることを報告している⁵⁾。これらの研究結果より、NixとBnip3が相加的もしくは相乗的に作用することにより、ケラチノサイトが制御されている可能性が考えられる。実際に、NixとBnip3については、ともにオートファゴソームの膜上に存在するLC3/GABARAPタンパク質と結合することによりミトコンドリアを選択的にオートファゴソームへとリクルートする機能を持つことが示されており³⁾、ミトファジーを誘導するという点においてこれらの分子は同様な機能を有している。本研究において、我々は、皮膚上皮の顆粒層ではオートファジーが誘導されているとともにミトコンドリアが消失していることを見出した。これらのことから、ケラチノサイトにおいても、NixとBnip3が協調的に働くことによりミトコンドリアのクリアランスを行い、最終分化に伴うダイナミックな細胞のリモデリングを可能にしていることが考えられる。

一方で、本研究では、NixとBnip3の発現制御機構や分子機能に相違点があることも認められた。Nix mRNAの発現はケラチノサイトの浮遊培養刺激により速やかに上昇することが認められたが、Bnip3の発現量は分化誘導刺激の前後で変化することがなく一定に保たれていた。また、Nixをノックダウンしたケラチノサイトを用いて皮膚の3次元培養を行った場合は積層化が著しく阻害されたが、Bnip3をノックダウンしたケラチノサイトを用いた場合は

このような著明な異常は観察されなかった。これらの結果から、両者の遺伝子の発現が異なる仕組みにより制御されている可能性が考えられ、また、両者の分子機能やその作用の仕方にも違いがあることが示唆される。実際に、Nixはミトコンドリア膜の脱分極を誘導することにより活性化酸素の産生を上昇させオートファジーを誘導する作用を持つことが示されているが⁸⁾、Bnip3は活性化酸素非依存性にオートファジーを誘導することが報告されており⁹⁾、両者はオートファジー誘導能を持つという点においては同様な機能を持つが、その作用メカニズムは異なることが推測される。近年、ケラチノサイトの分化を誘導するためにはミトコンドリアから産生される活性化酸素が必須な役割をもつことが報告された。本研究では、Nixがケラチノサイトの分化誘導に重要な役割を果たしていることが示されたが、このような分化誘導はNixによるミトコンドリアからの活性化酸素の産生制御を介して行われている可能性が考えられる。

本研究によって、皮膚上皮の角質化の過程にオートファジーが関与していることが示唆された。一般的に、ストレスにより肌の調子が悪くなるということが広く信じられている。オートファジーはさまざまなストレスの影響を受けることから¹⁰⁾、ストレスによってオートファジー活性が変化することを介して角化層の機能が変化する可能性が考えられる。本研究のさらなる発展によって、皮膚のオートファジー制御機構の分子的詳細が明らかにされれば、皮膚の健康を維持するための方策として、オートファジー制御を標的にした新たなアプローチ法を開拓できる可能性がある。

(引用文献)

- 1) Ramos-e-Silva M & Jacques C (2012) Epidermal barrier function and systemic diseases. *Clin Dermatol* 30 (3) :277-279.

- 2) Candi E, Schmidt R, & Melino G (2005) The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (4) : 328-340.
- 3) Ney PA (2015) Mitochondrial autophagy: Origins, significance, and role of BNIP3 and NIX. *Biochim Biophys Acta* 1853 (10 Pt B) : 2775-2783.
- 4) Moriyama M, *et al.* (2008) Multiple roles of Notch signaling in the regulation of epidermal development. *Dev Cell* 14(4):594-604.
- 5) Moriyama M, *et al.* (2014) BNIP3 plays crucial roles in the differentiation and maintenance of epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 134 (6) : 1627-1635.
- 6) Li L, Tennenbaum T, & Yuspa SH (1996) Suspension-induced murine keratinocyte differentiation is mediated by calcium. *J Invest Dermatol* 106 (2) : 254-260.
- 7) Sandoval H, *et al.* (2008) Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature* 454(7201):232-235.
- 8) Ding WX, *et al.* (2010) Nix is critical to two distinct phases of mitophagy, reactive oxygen species-mediated autophagy induction and Parkin-ubiquitin-p62-mediated mitochondrial priming. *J Biol Chem* 285 (36) : 27879-27890.
- 9) Quinsay MN, Thomas RL, Lee Y, & Gustafsson AB (2010) Bnip3-mediated mitochondrial autophagy is independent of the mitochondrial permeability transition pore. *Autophagy* 6 (7) : 855-862.
- 10) Huang Z, Zhou L, Chen Z, Nice EC, & Huang C (2016) Stress Management by Autophagy: Implications for Chemoresistance. *Int J Cancer*.