

角質層バリア形成および金属アレルギー発症における スプラバシンの機能解明

浜松医科大学皮膚科学講座

本田 哲也

Suprabasin (SBSN) is a secreted protein and a substrate for transglutaminase 2 and 3 activities. In the skin epidermis, SBSN is primarily expressed in the granular layer in both mice and humans. According to mouse studies, SBSN is suggested to play a role in the formation of the corneal barrier. Furthermore, *Sbsn*-deficient mice show increased allergic responses to nickel, indicating that SBSN plays protective roles in the establishment of metal allergy. However, the exact involvement and detailed mechanisms in humans remain largely unclear. To address these issues, we measured the amount of SBSN in the blood of nickel allergy patients. We also examined the involvement of SBSN in the skin corneal layer using a 3D-human skin equivalent model. The results indicate that SBSN concentration in the blood was significantly lower in nickel allergy patients than in non-nickel allergy patients. Knockdown of SBSN led to impaired corneal layer formation. Furthermore, SBSN knockdown keratinocytes showed increased IL-1beta production. These findings suggest that SBSN plays a physiological role in the formation of the skin corneal barrier and the development of nickel allergy.

1. 緒言

スプラバシンは、皮膚や上部消化管（口腔粘膜・食道）などの重層扁平上皮にて発現が認められる分泌タンパク質の一種である。皮膚では、顆粒層～角質層に主に発現が認められる（図1）。従来、その機能については、消化管領域の悪性腫瘍に関する解析が少数行われている程度で、皮膚での生理的機能はほとんど解明されていなかった。

我々の研究室では、アトピー性皮膚炎患者の皮膚角質層のプロテオーム解析から、スプラバシンがアトピー性皮膚炎病変部で有意に低下していることを世界に先駆けて発見した¹⁾（図2）。そして、アトピー性皮膚炎の中でも、金属アレルギーと関連の深い“内因性アトピー性皮膚炎”において、血中スプラバシン濃度が低く、血中ニッケル濃度が高いことを見出した^{2,3)}。これらの知見を元に、我々はスプラバシンノックアウトマウス（*Sbsn*^{-/-}マウス）を作成し、皮膚角質層バリア形成および金属（ニッケル）アレルギー発症におけるスプラバシンの機能解明を行った。*Sbsn*^{-/-}マウスでは、胎児期において角質層バリア機能低下が認められた。出生後は、顆粒層における顆粒の低形成、角質層の脆弱性が認められた。ニッケルに対する接触皮膚炎のマウスモデルを作成し、*Sbsn*^{-/-}マウスにて検討を行ったところ、*Sbsn*^{-/-}マウスは予想に反し野生型マウスに比して炎症反応が低下していた。ところが、経口ニッケル負荷状態では*Sbsn*^{-/-}マウスの血中ニッケル濃度は有意に高く、またニ

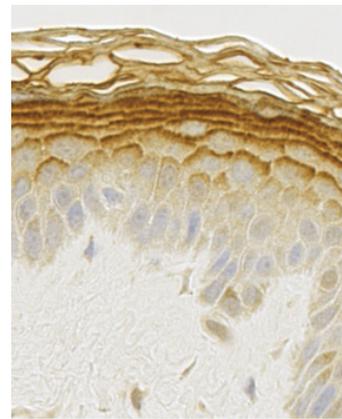


図1 皮膚スプラバシン

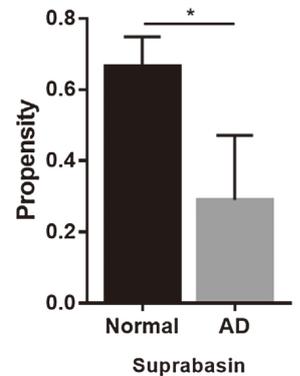


図2 皮膚でのスプラバシンの発現

ッケルへの免疫寛容が誘導されず、ニッケルに対する接触皮膚炎が増強されていた⁴⁾。以上の結果より、スプラバシンは皮膚角質層バリア形成および金属アレルギー病態制御に関わっている可能性が強く示唆された。しかしその詳細なメカニズム、人での妥当性は不明である。

以上の背景から、本研究では、「皮膚角質層バリア形成および金属アレルギー発症におけるスプラバシンの機能解明」を目的とした。化粧品を安全に使用する上で、皮膚角質層バリア形成機序、接触アレルギー反応発症機序理解は極めて重要な課題である。上述のようにスプラバシンは角質層バリア、接触アレルギーの両者の制御に深く関わっている可能性があり、スプラバシンの観点から解析を進めることで、角質層バリア形成とアレルギー病態を繋ぐ新たなメカニズム解明を目指す。

2. 方法

2. 1.

これまでの研究結果から、スプラバシンは金属アレルギーの中でも特にニッケルアレルギーとの関係が深い可能性



Functions of suprabasin in the formation of skin corneal barrier and development of metal allergy

Tetsuya Honda

Department of Dermatology, Hamamatsu University School of Medicine

が考えられた。その基礎データを取得するために、ニッケルアレルギー患者における血清スプラバシン濃度を定量し、ニッケルアレルギー、非アレルギー患者とで比較を行った。浜松医科大学皮膚科に通院中で金属アレルギー疑いのためパッチテストを施行した患者 31 名を対象とした。そのうち 10 名は特に明らかな皮膚症状を発症していなかったが、8 名は手湿疹、6 名は慢性湿疹、3 名が掌蹠膿疱症、2 名が扁平苔癬、1 名が環状紅斑、1 名が円形脱毛症を発症していた。内因性アトピー性皮膚炎患者は試験対象から除外した。パッチテストはパッチテストパネル（佐藤製薬株式会社）、5% nickel sulfate（鳥居薬品工業株式会社）を用いて施行した。パッチテストの判定は ICDRG 基準に基づき、貼付 3 日後、7 日後に行った。採血はパッチテスト前に施行し血清を採取し冷凍庫に保存した。血清スプラバシンの定量は、ELISA を用いて測定した（Cloud-Clone, SEH197Hu）以上の研究は浜松医科大学倫理委員会の承認のもと行われた（研究番号：20-138）。

2. 2.

後述のように、ニッケルアレルギー陽性の患者ではスプラバシンの血中濃度はニッケルアレルギー陰性（非金属アレルギー患者）患者より低値であることが判明した。この結果は、スプラバシンの発現が低いために皮膚や粘膜のバリア機能が低下し、ニッケル吸収が亢進している可能性を示唆する。それを検証するため、ニッケルアレルギー陽性、金属アレルギー陰性患者血清中のニッケル濃度を定量した（inductively coupled plasma mass spectrometry, Mitsubishi Chemical Analytech, Tokyo, Japan）。

2. 3.

皮膚角層バリア形成に関わるスプラバシンの機能を解析するため、ヒト 3 次元培養皮膚を用いてスプラバシンの shRNA によるノックダウンを行った。その後 3 次元培養皮膚の HE 染色、免疫組織学的解析と、皮膚バリア機能関連分子の RT-PCR 解析を行った。

2. 4.

金属アレルギーなど接触皮膚炎の反応にはインフラマソームの活性化が重要であることが報告されている。IL-1 beta はインフラマソーム活性化の代表的な指標である。

また、接触皮膚炎では種々の程度で IFN-gamma や IL-17A、IL-4/IL-13 などのサイトカインの関与が報告されている。そのため、ヒト培養表皮角化細胞を用いてスプラバシンのノックダウンを shRNA にて行い、ニッケル刺激、各種サイトカイン刺激による IL-1 beta 産生を ELISA で測定した。サイトカインは 50 μg/mL、ニッケルは 1.5 mM で 48 時間刺激した。

3. 結果

3. 1.

パッチテスト施行 31 名のうち、10 名がニッケルに陽性であった。1 名はコバルトに陽性、3 名がクロムに陽性、5 名が金に陽性であった。金属パッチテストに陰性の患者は 17 名であった。ニッケル陽性患者（10 名）と金属パッチテスト陰性患者（17 名）とで血清スプラバシン濃度を比較したところ、ニッケル陽性患者では金属パッチテスト陰性患者に比べ有意に低下していた⁵⁾ (P=0.032) (図 3)。両群において、性別、年齢、血清 IgE に有意差は認めなかった⁵⁾ (表 1)。

3. 2.

血中のニッケル濃度はニッケルアレルギー陽性患者のほうが、金属アレルギー陰性患者より低かった (図 4)。他の金属（クロム、コバルト、金）の血中濃度は両群で差を認めなかった。

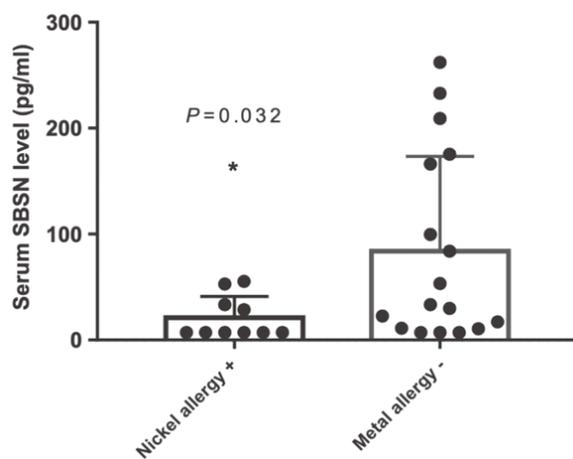


図 3 血中スプラバシン濃度

表 1 患者背景

	Patients	Sex(M/F)	Age (years, mean ± SD)	IgE (kU/L, mean ± SD)
Nickel allergy +	n=10	3/7	50.0 ± 14.4	159.5.5 ± 266.0 (n=6)
Metal allergy -	n=17	11/6	62.5 ± 21.3	369.2 ± 501.4 (n=11)
P value		0.12	0.07	0.42

3.3.

スプラバシンのノックダウンにより、表皮全体の厚さ、角質層の厚さはコントロールに比べ低下した(図5A)。顆粒層も低下していた(図5B)。またフィラグリンやロリクリンなどの分化マーカーはスプラバシンノックダウンにより低下していた(図5C, D)。

3.4.

IL-4/IL-13 刺激およびIL-17A 刺激下において、IL-1 beta 産生が誘導される傾向が認められた。さらに同条件

下において、スプラバシンのノックダウン群においてIL-1 beta 産生がより高くなる傾向が認められた。

4. 考察

従来、内因性アトピー性皮膚炎患者は金属アレルギーを多く伴い、また血清スプラバシンが低下していることが報告されていたが、その低下がアトピー性皮膚炎に伴ったものなのか、金属アレルギーに伴ったものかどうかは明らかではなかった。今回の結果は、症例数は少ないものの、金属アレルギー自体が血清スプラバシン低下と関連している

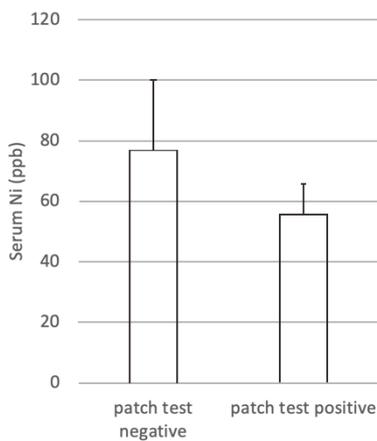


図4 血中ニッケル濃度

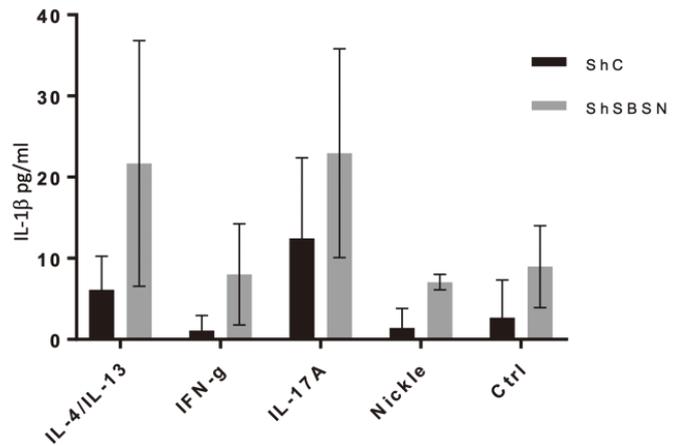


図6 培養表皮角化細胞からのIL-1 beta 産生

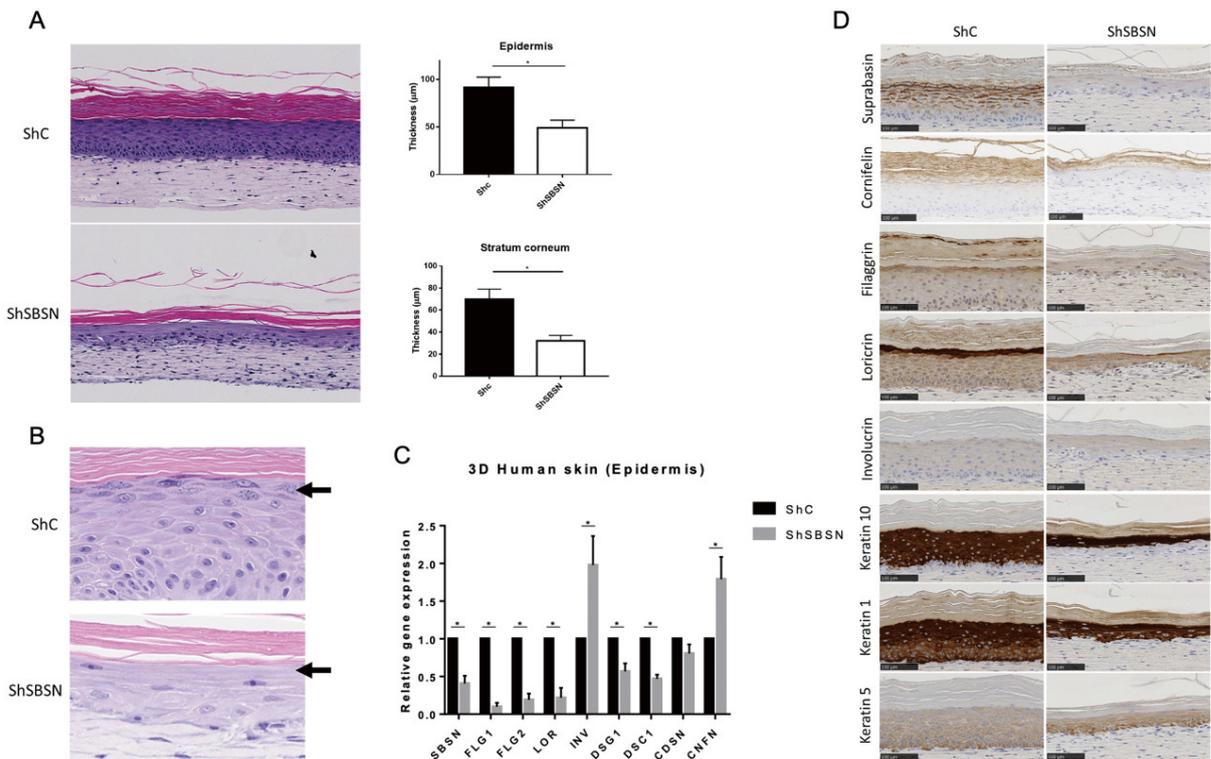


図5 (A) 三次元培養皮膚 HE 染色と表皮・角層厚定量 (B) HE 染色 (C) 各種分化マーカーのRT-PCRと(D) 免疫染色

ことを強く示唆するものと考えられた。この理由は現時点では明らかではないが、スプラバシンは皮膚や腸管で発現していることから、金属アレルギー患者では皮膚や腸管でのスプラバシン発現が低下しバリア機能が障害され、金属に感作されやすくなった可能性を考えた。

一方で、血中のニッケル濃度は予想に反し、ニッケルアレルギー陽性群で低下していた。この原因は不明であるが、今回測定したニッケル濃度は通常の10倍以上の値が検出されており、何らかの理由によりサンプルにニッケルがコンタミネーションしていた可能性を考えている。そのため現時点ではニッケル濃度について結論は出せず、今後の検討課題である。

角層バリア形成におけるスプラバシンの機能であるが、スプラバシンのノックダウンにより表皮の分化マーカーは著明に低下し、組織学的にも顆粒層の消失や角層の形成不全など、角層バリア形成不全が認められた。あくまで人工的な系であるが、スプラバシンが表皮の分化促進、角層バリア形成促進に関わっている可能性が示唆される。さらに、スプラバシンノックダウンにともない、IL-1betaの発現は高くなる傾向が認められた。スプラバシンが低下することでIL-1beta発現が亢進すれば、金属アレルギーによる感作、惹起反応が亢進することが予想される。ニッケルアレルギー患者では表皮のスプラバシンが低下し、結果としてニッケルへの感作や惹起反応が促進している可能性が示唆される。

5. 総括

血中スプラバシンの低下とニッケルアレルギー発症の関係が示唆された。また表皮におけるスプラバシンのノックダウンにより表皮角化細胞の分化、角層バリア形成が障害

され、またIL-1beta産生が亢進している結果からは、スプラバシンの生理的役割として、表皮角化細胞の分化促進、IL-1beta産生抑制を担っている可能性が示唆された。このメカニズムが破綻すると、ニッケルアレルギーが成立しやすくなる可能性がある。今後はさらにそれらの詳細な分子メカニズムを解析する必要があるが、表皮におけるスプラバシンの補充は角層バリア機能維持、金属アレルギー感作抑制につながる可能性が考えられた。

(Reference)

- 1) Sakabe, J. *et al.* Proteome analysis of stratum corneum from atopic dermatitis patients by hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometer. *J Allergy Clin Immunol* **134**, 957-960. e958 (2014).
- 2) Aoshima, M. *et al.* Decreased expression of suprabasin induces aberrant differentiation and apoptosis of epidermal keratinocytes: Possible role for atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* **95**, 107-112 (2019).
- 3) Yamaguchi, H., Hirasawa, N., Asakawa, S., Okita, K. & Tokura, Y. Intrinsic atopic dermatitis shows high serum nickel concentration. *Allergol Int* **64**, 282-284 (2015).
- 4) Nakazawa, S. *et al.* Suprabasin-null mice retain skin barrier function and show high contact hypersensitivity to nickel upon oral nickel loading. *Sci Rep* **10**, 14559 (2020).
- 5) Nakazawa, S. *et al.* Decreased serum level of suprabasin in patients with nickel allergy. *J Dermatol* **49**, e189-e190 (2022).