

タイトジャンクションが角層形成に及ぼす影響の解明

岐阜大学大学院医学系研究科皮膚科学

岩田 浩明

The tight junction (TJ) is an intercellular junction complex that seals adjacent epithelial cells and plays a crucial role in epithelial barrier function. TJs consist of several proteins, including those of the transmembrane claudin family, occludin and the scaffold zonula occludens (ZO) family. The distribution of TJs is distinct among stratified squamous epithelia, such as between skin and oral buccal mucosa. However, how TJs are associated with stratum corneum have not been elucidated. We show that epithelial turnover and proliferation dictate TJ distribution in the squamous epithelia. Human samples and mouse pharmacological models revealed that slower epithelial turnover/proliferation led to the confinement of TJs in the uppermost part of squamous epithelia. In contrast, TJs were dispersedly distributed in faster cell turnover/proliferation conditions. Cell culture experiments and mathematical modeling corroborated the TJ arrangements. These findings demonstrate that TJ formation is dependent on epithelial cell dynamics. the confinement of ZO-1 within a single layer of squamous epithelia is indicative of slow epithelial proliferation and turnover rates. Our findings do not fully elucidate the functional significance of ZO-1 distribution, but our study does suggest that ZO-1 reflects the proliferation and turnover of epithelia. Our study implicates that TJ expression can be a therapeutic output of diseased epithelia.

1. 緒 言

皮膚（重層扁平上皮）は、基底層から角層へと角化する過程でバリア構造を形成する。物理的な皮膚バリアには、角層バリアとタイトジャンクション (TJ) バリアの二つが存在する¹⁾。明確に機序を分けることは困難だが、主に角層はOut-inバリア（外的刺激を防御）、顆粒層TJは主にIn-outバリア（水分保持）として重要である²⁾。正常な角層は規則正しい網かご構造 (Basket weave) を形成するが、表皮の炎症はコンパクト角層となる^{3, 4)}。コンパクト角層は一見強固に思えるが、柔軟性に乏しく亀裂が多数生じて結果的にバリア機能は低下する。

皮膚は重層扁平上皮であり、TJは顆粒層に局限して形成される^{1, 2)}。常に上方への角化が生じる重層扁平上皮において、特定の部位にTJを維持することは常にTJも代謝されていることが明らかになっている。皮膚と異なり、粘膜では上皮のターンオーバー速度が数倍早いことが知られている⁵⁾。粘膜では角層形成がされないが、TJの形成に関する知見はほとんどない。われわれは、粘膜では皮膚と異なり複数層にわたりTJ構成タンパクの一つであるZO-1の発現が認められることを報告してきたが⁶⁾、なぜ皮膚と異なる発現となりバリア機能は保持されているかなど不明な点が残されたままである。

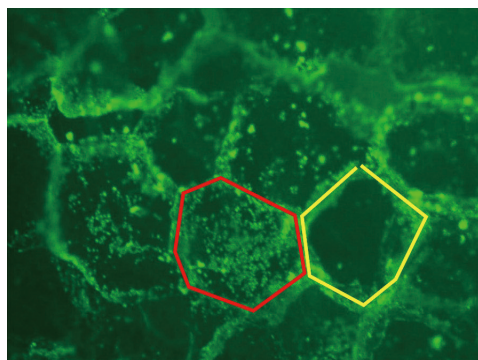


図1 テープストリッピングで採取した角層の
コルネオデスモソーム (CDS) の染色

Basket weave角層は細胞接着構造であるコルネオデスモソーム (CDS) が規則的な六角形構造を形成する⁷⁾。そしてCDSはカリクレインにより分解され角層が脱落する。一方、コンパクト角層ではCDSは六角形を維持するが全体に分布する (図1)。Basket weave角層で辺縁にCDSが残存する理由は長らく不明であった。しかし、TJ様構造が角層の細胞辺縁に存在し、カリクレインによるCDSの分解を防ぐためと考えられている^{4, 7)}。

本研究では、上皮のターンオーバー速度がTJ形成に及ぼす影響を解明するとともに、TJがBasket weave角層の形成・維持に必要な不可欠な存在であるという仮説を検証することを目的とする。

2. 方 法

2. 1.

正常口腔粘膜と正常皮膚におけるTJの形成の違いを顕微鏡的観察を行う。



The association with tight junction and stratum corneum formation

Hiroaki Iwata

Gifu University Graduate School of Medicine, Department of Dermatology

2. 2.

TJの形成にターンオーバー速度の影響を評価する。

正常口腔粘膜、口腔扁平苔癬、正常皮膚、乾癬病変部と4つの組織におけるTJ形成を上皮のターンオーバー速度の違いに着目して評価する。

2. 3. 正常ヒトおよびマウス皮膚、炎症皮膚の詳細なTJおよび角層観察

TJ関連タンパクの発現量、分布を免疫染色にて超解像度技術を用いて縦断面・水平面を詳細観察する。マウスは耳介皮膚が比較的Basket weave構造を明瞭に観察できるため、同部位で正常とイミキモド乾癬モデルマウスのTJと角層の構造およびタンパク発現を詳細に観察する。

2. 4. 培養細胞条件によるTJ形成条件の確立と変異細胞の樹立

三次元培養ではコンパクト角層になるため、培養条件を検討してBasket weave角層が形成される条件を確立する。正常と異常の違いをRNASeqで網羅解析を行いBasket weave角層形成に重要な遺伝子の候補を探索する。

3. 結 果

電子顕微鏡観察では、Basketweave角層(図2 左)とコンパクト角層(図2 右)は弱拡大では角層の重なりが異なる

ように観察されていることが分かる。しかし、それぞれ拡大を上げて観察すると上下の接点となる部位は多くはコルネオデスモソームと思われる構造が観察される。

4種類の条件の上皮では、ターンオーバー速度が異なることが知られており、基底細胞の分裂細胞数の違いに起因する(図3)。基底細胞の分裂細胞数をKi-67染色で比較すると、正常粘膜と乾癬皮膚で分裂細胞数が多く、正常皮膚と口腔扁平苔癬の組織で少ないことが観察される。この分裂細胞数の違いが上皮のターンオーバー速度の違い、さらに上皮の厚みの違いに関与していることが示唆される。

粘膜におけるTJをZO-1に着目して評価すると、皮膚とは異なりZO-1の重層化が観察される。同様の所見は、乾癬病変部皮膚でも同様の変化が観察することができる(図4、5)。ZO-1の分布について、蛍光強度を基準に定量化すると正常粘膜と乾癬病変部では上皮の外側1/2-1/3に発現するが、正常皮膚と口腔扁平苔癬では1/5程度に留まる違いが明らかになった。

4. 考 察

角層バリアはコンパクトであればより強固なイメージがある。実際に、電子顕微鏡での観察結果ではコルネオデスモソームの結合がより多く残存している可能性がある。しかし、Basket weave角層と比べて角層間脂質が減少するため保湿機能の低下につながり、さらに物理的刺激に対す

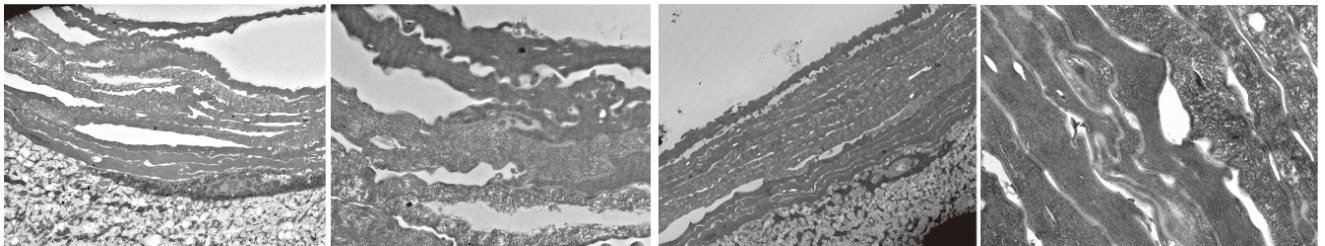


図2 Basketweave 角層(左)とコンパクト角層(右)の電子顕微鏡像

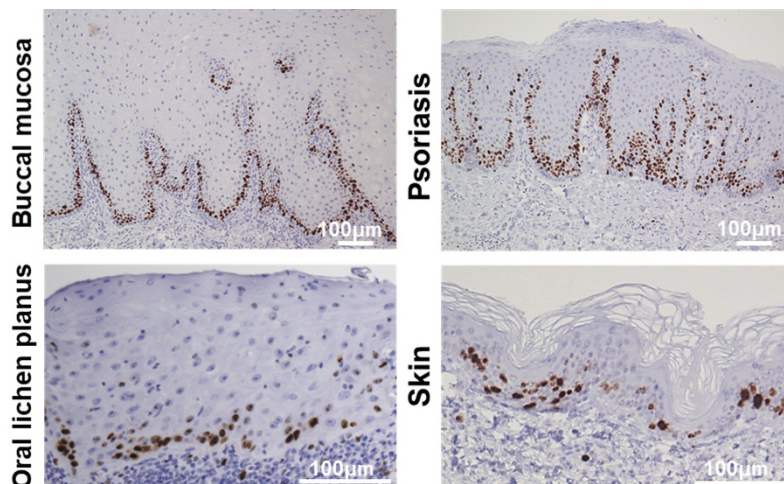


図3 正常粘膜、口腔扁平苔癬、正常皮膚、乾癬組織におけるKi-67染色

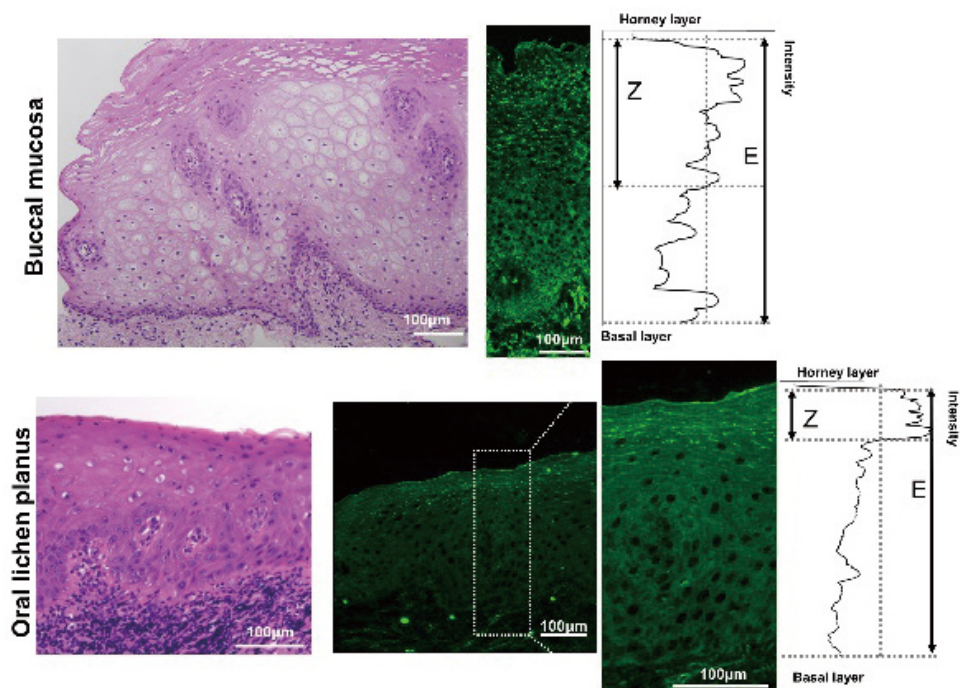


図 4 粘膜における ZO-1 の分布

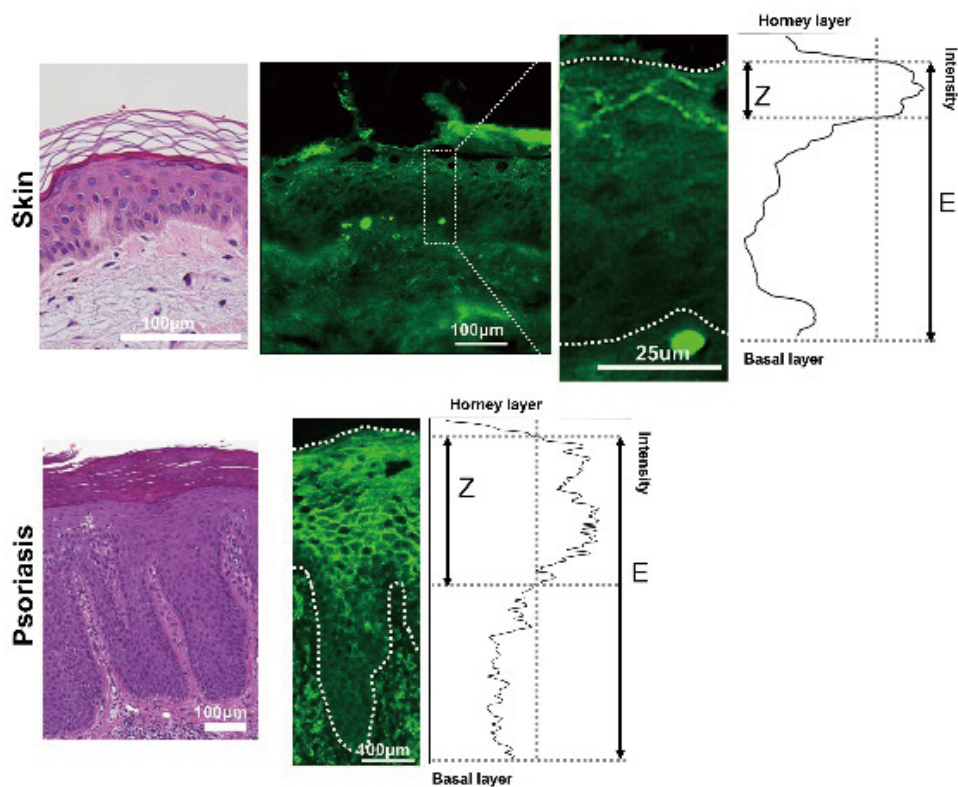


図 5 皮膚における ZO-1 の分布

る柔軟性が乏しくなることが考えられる。

皮膚と粘膜で上皮最外層の構造は大きく異なる。皮膚には角層が形成されるが、粘膜では通常角層は認めない。今回の研究では、その理由の一つとして表皮のターンオーバー速度の違いにあると考えた。TJ の構成成分の一つ

ZO-1 の分布で評価したところ、ターンオーバー速度が相対的に速い条件（正常粘膜と乾癬病変部）では ZO-1 が重層化して観察されるが、ターンオーバー速度が相対的に遅い条件（口腔扁平苔癬と正常皮膚）では、ZO-1 は限局性に発現していることが分かる。この結果は、直接的ではな

いが細胞増殖速度の促進がTJの分布に影響を及ぼしていることが示唆された。TJはバリア機能として重要であり、皮膚では顆粒層2層目に限局して形成される^{2, 8)}。粘膜や乾癬病変部ではTJが顆粒層に限局して形成されることはないため、バリア機能が正常に機能しているか疑問が生じる。この点に関しては、われわれは先行研究で物質の透過性を角層側から表皮内、真皮側から角層側に向かう両方向のバリア機能を評価した⁶⁾。正常な皮膚とは異なり、粘膜では基底層側の数層をトレーサーは貫通するが、角層へ向かうにつれて、トレーサーは徐々に減衰していくことが観察された(図6)。このことより、皮膚における顆粒層における限局的なバリア機能とは異なり、粘膜においてTJのバリア機能は複数層で維持されていると考えられた。粘膜同様に細胞増殖が亢進している皮膚疾患の代表である乾癬でも同様の所見が得られたことは、乾癬皮膚においても正常皮膚と同等とは言えないが一定程度バリア機能は保持されていることが推察された。本研究は今後、三次元培養皮膚を用いることで、増殖因子やインヒビターを添加することで表皮ターンオーバー速度をコントロールするモデルが作成できる可能性があると考えている。

本研究では、TJが角層形成に及ぼす影響までは解明が進んでいない。粘膜では角層は形成されず、乾癬病変部皮膚ではコンパクト角層となるが、このように正常皮膚と明らかに角層形成が異なる理由としてTJの形成が影響している可能性は十分考えられる。今後は、角層形成に及ぼす影響についてもさらに解明を進めていく予定である。

謝 辞

本研究成果の一部は、Cell Prolif. 56: e13441, 2023.⁹⁾にて報告した。本研究の遂行に当たり多大なご支援を頂きました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に深く御礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) Otani, T. & Furuse, M. Tight Junction Structure and Function Revisited. *Trends Cell Biol* **30**, 805-817(2020).
- 2) Yokouchi, M. *et al.* Epidermal tight junction barrier function is altered by skin inflammation, but not by filaggrin-deficient stratum corneum. *J Dermatol Sci* **77**, 28-36 (2015).
- 3) Goto, H., Tada, A., Ibe, A. & Kitajima, Y. Basket-

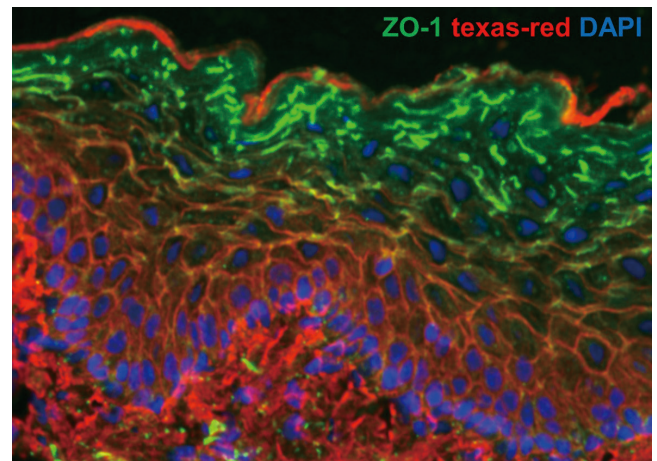


図6 マウス頬粘膜にビオチントレーサー(赤)を投与して、粘膜内の通過を観察。ZO-1(緑)で標識。

weave structure in the stratum corneum is an important factor for maintaining the physiological properties of human skin as studied using reconstructed human epidermis and tape stripping of human cheek skin. *Br J Dermatol* **182**, 364-372 (2020).

- 4) Kishibe, M. Physiological and pathological roles of kallikrein-related peptidases in the epidermis. *J Dermatol Sci* **95**, 50-55 (2019).
- 5) Lehman, J. S., Tollefson, M. M. & Gibson, L. E. Lichen planus. *International Journal of Dermatology* **48**, 682-694 (2009).
- 6) Imafuku, K. *et al.* Zonula occludens-1 demonstrates a unique appearance in buccal mucosa over several layers. *Cell Tissue Res* **384**, 691-702 (2021).
- 7) Igawa, S. *et al.* Incomplete KLK7 Secretion and Upregulated LEKTI Expression Underlie Hyperkeratotic Stratum Corneum in Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol* **137**, 449-456 (2017).
- 8) Yoshida, K. *et al.* Functional tight junction barrier localizes in the second layer of the stratum granulosum of human epidermis. *J Dermatol Sci* **71**, 89-99 (2013).
- 9) Imafuku, K. *et al.* Zonula occludens-1 distribution and barrier functions are affected by epithelial proliferation and turnover rates. *Cell Prolif* **56**, e13441 (2023).