

# 表皮細胞接着因子のバイオイメーシング法の開発

慶應義塾大学医学部皮膚科学教室

天谷 雅行

## 目的・背景

デスモグレイン (Dsg) は、デスモソームの構成する膜貫通蛋白である。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、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ソ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。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、細胞が活着し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変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複製し、それを機能プローブとして用いることで、活着し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できるようになった。

本研究の目的は、デスモソ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。

## 結果・考察

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とともに、天疱瘡における抗デスモグレイン 3 (Dsg3) IgG 自己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、全く新しい観点からデスモソーム関連蛋白の機能解析を行った。GFP 融合ケラチン 14 をアデノウイルス発現系を用いて正常ヒト表皮角化細胞(NHEK 細胞)に遺伝子導入したところ、導入したケラチン線維は角化細胞内で網状の構造を示すと共に、培養液中の Ca 濃度を上昇させることで接着面への insertion が見られることが明らかとなった。また角化細胞に抗 Dsg3 IgG 抗体を反応させたところ、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、経時的固定後の観察ならびにデルタヴィジョンを用いたリアルタイムイメージング法の両方により明らかとなった。また角化細胞における接着障害能の異なる抗 Dsg3 IgG 抗体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 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。また本研究では達成できなかったものの、Dsg3、PG、DP 等のデスモソーム関連蛋白を蛍光色素により可視化することで、デスモソ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。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。

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。