皮膚バリアの分子基盤と皮膚疾患の関連性、 および臨床開発に向けた薬事戦略

大阪大学大学院薬学研究科 附属創薬センター 医薬品・医療機器規制科学プロジェクト*

橘 敬祐*・近藤昌夫*

Perspectives on tight junctions-related skin diseases and their pharmaceutical affairs

Organisms developed epithelium separating intra and outer body in the evolution from unicellular to multicellular organisms. Intercellular spaces are sealed by tight junctions (TJs) between the adjacent cells. TJs exhibit barrier-function to prevent leakage of solutes in the intercellular spaces and fence-function to maintain apical and basolateral localization of lipids and membrane proteins in the epithelium. Occludin, claudin family members, and tricellulin, which were identified by Dr. Tsukita's group, are key components for the TJ-functions. Disruption of the TJ-functions is frequently observed in pathological conditions, such as carcinogenesis, inflammation, and infections. In this review on the skin, we introduce the molecular structure of TJ-seals in the skin, and we also overview recent findings on the involvement of TJs in some skin diseases.

生物は単細胞生物から多細胞生物へと進化する過程において、生体内外を隔てる障壁として上皮組織を発達させてきた。単細胞生物では単なる脂質二重膜であった生体バリアは、ヒトでは粘膜上皮、重層上皮細胞等へと進化を遂げ、上皮は隣接する細胞間隙をシールする仕組み「タイトジャンクション(TJ)」を発達させている。1993年の月田承一郎先生らによるオクルディンの発見に端を発した上皮細胞バリアの生物学の進展と相まって、皮膚等における TJ の分子基盤に関する知見が集積しつつある。本稿では、皮膚に焦点を絞り、TJ の生理機能を概説するとともに皮膚疾患と TJ 機能との関連性等について紹介したい。

Keisuke Tachibana*・Masuo Kondoh*

Keywords: tight junction, epidermal barrier, skin diseases, regulatory science

1. イントロダクション

生物は単細胞生物から多細胞生物へと進化する過程において、生体内外を隔てるバリアとして上皮組織を発達させ、ヒトでは畳一畳分もの皮膚が生体内外を隔てる障壁として機能している。皮膚は表皮・真皮・皮下組織に大別され、重層上皮組織である表皮が皮膚バリアの中心的な役割を担っている。表皮表面には角化脱核した角質細胞等からなる角層があり、この角層が外界の空気環境と生体内部

の液性環境を隔てる一次バリアとして機能している(図1A)。角層直下には扁平化した角質細胞からなる3層の顆粒層が存在し、2層目で隣接する細胞間隙を tight junction(TJ)によりシールすることで二次バリア(TJバリア)を形成し、異物の生体内侵入を防いでいる。さらに、顆粒層の下に存在する有棘層には免疫担当細胞であるランゲルハンス細胞が分布しており、角層バリアおよび TJ バリアを突破してきた外来抗原等に対処する免疫防御網(三次バリア)を構築している。このように、皮膚は多次元バリアによって生体外異物の侵入を阻止しつつ、恒常性維持機能を発揮している。

1960年代には、TJ には2細胞間に存在する bicellular TJ(bTJ)と3細胞間に存在する tricellular TJ(tTJ)が同定されていたが、TJ の実態について

* Regulatory Science for Development of New Drugs, Medical Devices, and Regenerative Medicinal Products, Drug Innovation Center, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University
責任編集者：近藤昌夫
〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-6
TEL・FAX：06-6879-8195
E-mail：masuo@phs.osaka-u.ac.jp

図1 皮膚バリア(A)とタイトジャンクションを構成する膜タンパク質(B)

(A) 皮膚バリア：表皮は皮膚表面から角層(SC)、顆粒層(SG)、有棘層(Stratum spinosum)、基底膜(Stratum basale)の順で構成されており、角層と顆粒層に物理的バリアとして角層バリアと TJ バリアが存在している。なお、顆粒層は表皮側から順に SG1、SG2、SG3 の3層から構成されている。(文献14を一部改変)

(B) タイトジャンクションを構成する膜タンパク質：上皮細胞には2細胞の接点と3細胞の接点があり、それぞれ bicellular tight junction(bTJ)、tricellular tight junction(tTJ)によって細胞間隙をシールすることで物質の漏れを防いでいる。bTJ を構成する膜タンパク質として、occludin、cingulin、claudin family、tTJ を構成するタンパク質として tricellulin、angulin family が同定されている。

は不明な状態がしばらく続いていた^{1,2)}。1993年京都大学 月田承一郎先生のグループによって、TJ に occludin が含まれていることが発見され、TJ が膜タンパク質によって構成されている可能性が示唆された³⁾。Occludin は分子量65,000の4回膜貫通タンパク質であり、細胞間隙に存在する2つの細胞外領域を介して TJ シールを形成していると予想されたものの、occludin を欠損させても TJ シールが構築されていたことから、真の TJ シール構成タンパク質の探索が進められ、1998年月田グループによって TJ シール機能を担う分子として claudin が同定された^{4,5)}。これまでにヒトでは claudin は27種類の分子が見出されており、発現やシール機能に特異性が認められている⁶⁾。その後、tTJ 構成タンパク質として2005年に tricellulin、2011年に angulin family が同定された⁷⁻⁹⁾(図1 B)。

Occludin の発見に端を発した上皮細胞バリアの生物学の進展により、皮膚における TJ バリアと免疫バリアの相互作用のメカニズム、皮膚 TJ バリア破綻と疾患との関連性等にかかる知見も集積しつつある。

本稿では、本邦発の上皮バリアの生物学に育まれた、皮膚 TJ バリアの分子基盤と皮膚疾患との関連

性にかかる知見について概説する。

2. 皮膚の TJ シールド

皮膚は表皮、真皮、皮下組織からなり、表皮が生体バリアとして中心的な役割を担っている。表皮は、表面から順に角層、顆粒層、有棘層、基底層によって構成されており(図1 A)、2001年までは角層が皮膚の物理的バリアを担っていると考えられていた¹⁰⁾。角層は皮膚の最表面に位置し、角化脱核した角質細胞が幾重にも重なり細胞の隙間をセラミド、コレステロール、脂質等で埋めることで物理的バリアを形成し、外部の空気環境と内部液性環境を隔けるとともに生体外異物の生体内への侵入防御機能を担っている。

2002年月田グループにより、claudin-1欠損マウスでは正常マウスに比して水分の蒸散が観察されること、claudin-1欠損マウスの皮下に色素を投与すると色素が角層まで漏出すること(正常マウスでは漏出が観察されない)、claudin-1欠損マウスでは顆粒層を構成する3層の上皮細胞のうち第2層に TJ が形成されていること、野生型マウスでは第2層の TJ 部分で色素の漏出が止まって

いることから、顆粒層に存在する TJ が表皮の物質透過障壁として機能していることが初めて見出された¹¹⁾。この発見により、「表皮バリア=角層」から「表皮バリア=角層+重層上皮バリア」へと表皮バリアの概念が大きく変化した^{11,12)}。なお、これまでに顆粒層の TJ には、bTJ 構成タンパク質である claudin-1、-4、-6、-7、-11、-12、-18、occludin 等のみならず、tTJ 構成タンパク質である tricellulin が含まれていることが知られている¹³⁾。

さて、周知のように表皮の細胞は新陳代謝しており、表皮が生体バリアとして機能するためには、顆粒層の新陳代謝に伴うバリア機能不全を回避することが不可欠であるものの、長年にわたりこの新陳代謝時のバリア機能維持機構は不明であった。最近、慶應義塾大学 久保亮治先生のグループにより、表皮の細胞がケルビン14面体構造を有し規則正しく立体的に配置されていること、細胞が入れ替わるときにその周囲で TJ が一時的に2重となり、新しい TJ が構築された後に古い TJ が消失することで細胞の入れ替わりに伴う TJ バリアの消失を回避する仕組みが明らかにされた¹⁴⁾。単層上皮では水平に細胞が配列し、水平面において bicellular contact と tricellular contact が存在しており、線状の bTJ と点状の tTJ が形成される。一方、重層上皮ではケルビン14面体の顆粒層内側のエッジ部分で tricellular contact、外側のエッジ部分で bicellular contact が存在し、それぞれ tTJ、bTJ シールを形成することで細胞の入れ替わりに伴う TJ シール形成不全を防いでいる。

このように、1993年の occludin の発見に端を発した本邦における上皮バリアの生物学の進展にはめざましいものがあり、わが国に肥沃な上皮細胞バリアの生物学の土壌が形成し、創薬シーズを育む礎が整備されつつある。次項以降で、創薬の萌芽について記載する。

3. アトピー性皮膚炎と TJ 機能

上述したように皮膚には角層と顆粒層に物理的バリアが存在し、通常、ハウスダストに曝露されても生体内に侵入することはないため、アレルギー反応

が生じることはない。アトピー性皮膚炎の患者では角層や顆粒層のバリア機能が低下しており、ハウスダスト等に対する免疫感受性が亢進している。例えば、アトピー性皮膚炎により Filaggrin (角層バリア) と TJ (顆粒層バリア) の2つの物理的バリアが消失すると黄色ブドウ球菌の感染が増加する¹⁵⁾。また、ハウスダスト由来のシステインプロテアーゼ (Der p1) は claudin-1 等を分解することで TJ バリア機能を低下させ、免疫応答を惹起することが知られている¹⁶⁾。

Claudin-1 欠損マウスでは顆粒層の TJ バリア機能が低下し、水分の蒸散や低分子の漏出が認められ、claudin-6 トランスジェニックマウスでも claudin-1 欠損マウスと同様の表現型を示していたが¹⁷⁾、claudin family の中で小児患者と成人患者で発現量が低下しているのは claudin-1、-8、-23 であることから、これらの claudin がアトピー性皮膚炎の病態に関与している可能性が高い¹⁸⁾。

すでに、claudin-1 については遺伝子多型とアトピー性皮膚炎の発症や重症度との関与が指摘されており、プロモーター領域の変異により claudin-1 発現量が低下しているヒトではアトピー性皮膚炎への罹患率が高い傾向にある^{19,20)}。さらに、2016年大阪大学 月田早智子先生のグループにより、アトピー性皮膚炎の病態における claudin-1 の関与について興味深い報告がなされた。Claudin-1 欠損マウスは生後24時間以内に死にいたることから、claudin-1 発現量が段階的に異なる遺伝子改変マウスを作製し、その表現型を調べたところ、遺伝子の発現量が半分以下になると皮膚バリア機能が低下し、バリア機能の低下に伴いマウス新生児で表皮の分化異常が生じていた²¹⁾。Claudin-1 発現量の低下に伴い、アトピー性皮膚炎様の形態変化が生じ、マクロファージや好中球等の浸潤に伴い炎症が生じており、小児期から思春期にかけて認められる自然経過に類似した加齢に伴う炎症の減弱が観察されたことから、claudin-1 発現制御という新たなアトピー性皮膚炎の治療戦略が提示されている。

4. 乾癬と TJ 機能

乾癬は角化細胞の増殖亢進とターン-オーバー時間の短縮を主病態とする皮膚の炎症性角化症であり、本病態においても TJ の異常が認められている。顆粒層の TJ には occludin、ZO-1、claudin-1、-4 等が発現しており、通常 occludin は顆粒層に限局しているが、乾癬では occludin、ZO-1 の局在が有棘層にまで広がっている^{22~24)}。この乾癬における TJ 構成タンパク質の局在性等の変動に IL-1 β や TNF- α といった炎症性サイトカインの関与が示唆されており、抗炎症療法が乾癬治療のゴールドスタンダードになっている²⁵⁾。また、皮膚特異的に keratin 76 を欠損させると claudin-1 の局在が変化していたことから、中間系フィラメント異常と乾癬の関連性についても検討が進んでおり、TJ シールの裏打ちしている構造を標的とした新たな創薬戦略の構築が期待される²⁶⁾。

5. 皮膚がん と TJ 機能

正常な皮膚では、occludin、ZO-1、claudin-4 は顆粒層の細胞間、claudin-1 は表皮全体に発現しているが、扁平上皮がんでは occludin、ZO-1、claudin-1、-4 ががん真珠に強く発現している²⁷⁾。角化を伴わないがん化領域では、ZO-1、occludin、claudin-4 の発現は低下しているとの報告がある一方で、皮膚の扁平上皮がんでは悪性化に伴い claudin-1 発現量の低下、claudin-2 発現量の増加も見出されている²⁸⁾。さらに、occludin の発現量が低下することで紫外線によるアポトーシス誘導に耐性となり、結果的にがんが生じる可能性も指摘されている²⁹⁾。今後、さらなる知見の集積により、TJ 構成タンパク質を標的とした皮膚がんの予防・治療法の創出が期待される。

6. まとめ

最後に、TJ を標的とした皮膚疾患治療薬開発に

おける薬事上の論点を述べる。TJ 構成タンパク質は全身の正常組織で発現していること、皮膚バリアを制御する場合外用剤として開発されるケースが想定されること、皮膚疾患の多くが皮膚バリア機能の破綻を伴うこと、外用剤が皮膚から吸収され肝臓での初回通過効果を経ずに全身を循環する可能性があることから、承認審査の過程において安全性の視点から ADMET (吸収、分布、代謝、排泄、毒性) が主要な論点となるケースが想定される。

一般的に、バリアの破綻に伴い本来細胞間隙に埋もれている TJ 構成タンパク質が細胞表面に露出するため、炎症部位と非炎症部位における TJ 構成タンパク質の局在性の違いにより薬剤の治療安全域を確保しうること、基本的な治療戦略は破綻しているバリア機能の回復にあることから、非臨床試験においてこれらの検証データを収集しておくことは臨床開発を円滑に進めるうえで重要となってくる。また、アトピー性皮膚炎等の臨床試験では既存治療法に上乘せした試験デザインとなる可能性が高く、薬価等を考慮しつつ適切な併用薬を選定し、動物実験において併用療法の相加・相乗効果について検証しておいた方が好ましいかもしれない。

今回は誌面の都合上、筆者らの研究成果については割愛させていただいているが、すでに筆者らは claudin-1、-2、-4、-5、occludin、angulin 制御技術確立しており、今後これらの TJ 制御技術基盤を活用したレギュラトリーサイエンス研究を推進することで、TJ を標的とした皮膚疾患にかかる創薬・臨床開発環境の整備につながっていくと期待される。

今年は、occludin は 25 歳、claudin は 20 歳と節目の年となる。それぞれ、MARVEL family、claudin family を形成し、新たに angulin family も誕生している。柚子は 18 年で実がつくという。本邦の上皮細胞バリアの生物学の土壌に育まれた本邦発の創薬イノベーションの基礎研究の樹にも、そろそろ臨床の実がなる頃であろう。その最初の果実は、皮膚疾患領域かもしれない。

文献

- 1) Farquhar M.G., *et al.*, *J. Cell Biol.*, **17**, 375-412 (1963)
- 2) Staehelin L.A., *et al.*, *Protoplasma*, **67**, 165-184 (1969)
- 3) Furuse M., *et al.*, *J. Cell Biol.*, **123**, 1777-1788 (1993)
- 4) Furuse M., *et al.*, *J. Cell Biol.*, **141**, 1539-1550 (1998)
- 5) Saitou M., *et al.*, *J. Cell Biol.*, **141**, 397-408 (1998)
- 6) Mineta K., *et al.*, *FEBS Lett.*, **585**, 606-612 (2012)
- 7) Ikenouchi J., *et al.*, *J. Cell Biol.*, **171**, 939-945 (2005)
- 8) Masuda S., *et al.*, *J. Cell Sci.*, **124**, 548-555 (2011)
- 9) Higashi T., *et al.*, *J. Cell Sci.*, **126**, 966-977 (2013)
- 10) Norlen K.L., *J. Invest. Dermatol.*, **117**, 830-836 (2001)
- 11) Furuse M., *et al.*, *J. Cell Biol.*, **156**, 1099-1111 (2002)
- 12) Tsukita S., *et al.*, *Curr. Opin Cell Biol.*, **14**, 531-536 (2002)
- 13) Brandner J.M., *et al.*, *Tissue Barriers*, **3**, e974451 (2015)
- 14) Yokouchi M., *et al.*, *eLife*, **5**, e19593 (2016)
- 15) Schlievert P.M., *et al.*, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **125**, 39-40 (2010)
- 16) Wan H., *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **104**, 123-133 (1999)
- 17) Turksen K., *et al.*, *Development*, **129**, 1775-1784 (2002)
- 18) Brunner P.M., *et al.*, *J. Allergy Clin. Immunol.*, in press.
- 19) De Benedetto A., *et al.*, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **127**, 773-786 (2011)
- 20) Yu H.S., *et al.*, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **135**, 827-830 (2015)
- 21) Tokumasu R., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E4061-E4068 (2016)
- 22) Yoshida Y., *et al.*, *Arch. Dermatol. Res.*, **293**, 239-244 (2001)
- 23) Pummi K., *et al.*, *J. Invest. Dermatol.*, **117**, 1050-1058 (2001)
- 24) Peltonen S., *et al.*, *Br. J. Dermatol.*, **156**, 466-472 (2007)
- 25) Kirschner N., *et al.*, *Am. J. Pathol.*, **175**, 1095-1106 (2009)
- 26) DiTommaso T., *et al.*, *PLoS Genet.*, **10**, e100470 (2014)
- 27) Morita K., *et al.*, *Br. J. Dermatol.*, **151**, 328-334 (2004)
- 28) Hintsala H.R., *et al.*, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **6**, 2855-2863 (2013)
- 29) Rachow S., *et al.*, *PLoS One*, **8**, e55116 (2013)