

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791054

研究課題名（和文） 表皮創傷治癒におけるカリクレイン8の機能解析

研究課題名（英文） Analysis of the function of Kallikrein 8 in skin wound healing.

研究代表者

岸部 麻里（KISHIBE MARI）

旭川医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：90431410

研究成果の概要（和文）：創傷治癒におけるカリクレイン8（KLK8）の機能解析は、臨床的応用も視野に入れた研究である。野生型マウスと Klk8 ノックアウトマウスに、全層皮膚欠損創を作成して両者を比較した。その結果、Klk8 は、創傷早期に KLK6 を誘導することで表皮角化細胞の増殖を促進し、創傷後期には PAR2 の誘導に影響して、角化細胞の分化誘導に関与することを明らかにした。Klk8 はケラチノサイトの増殖と分化の調整を行っている可能性があると考えた。

研究成果の概要（英文）：Kallikrein-related peptidase 8 (KLK8) is believed to be involved in the maintenance of skin homeostasis and pathogenesis of inflammatory skin diseases. Although previous studies have shown that KLK8 is expressed around incisional wounds, the exact role of KLK8 in wound healing remains obscure. In the present study, we compared wound healing in wild type (WT) and Klk8 gene-disrupted (Klk8^{-/-}) mouse skin. Wound healing in Klk8^{-/-} mice was hampered with defective keratinocyte proliferation, differentiation and migration in the early stages of wound healing. Compared with the prominent induction of Klk6 and PAR2 mRNA and protein in WT mice after wounding, a much lower increase was observed in Klk8^{-/-} skin. After skin wounding in WT mice, increased Klk6 was detected from the upper stratum spinosum to the stratum corneum. Moreover, in WT mice, Klk6 protein was processed. PAR2 was diffusely expressed in the cytoplasm of the stratum spinosum at days 7 post-wounding in WT. These results suggest that Klk8 is involved in the proliferation and migration of keratinocytes through the upregulation and activation of Klk6 in the early stages of wound healing, and possibly in keratinocyte differentiation associated with the upregulation and activation of PAR2 in the late stages of wound healing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：皮膚生理学

1. 研究開始当初の背景

Kallikrein related peptidase (KLK と略す) は合計 15 個の遺伝子ファミリーから構成され、そのうち少なくとも 8 つが表皮に発現するとされている。KLK はカスケードを形成して互いに活性化することで機能することが知られている。なかでも、KLK5 と KLK7 はコルネオデスモゾーム構成蛋白を分解することで落屑に関わるほか、抗菌活性の形成にも関与すること知られている。その一方で、機能が明らかにされていない KLK も存在する。KLK8 は、表皮に発現するトリプシントypesのセリンプロテアーゼで最も発現量が多いとされている。アトピー性皮膚炎や乾癬などの炎症性皮膚疾患で発現が増強しているほか、マウス皮膚では TPA 塗布や創傷により発現が誘導されることが報告されているが、詳細な機能は明らかにされていない。

2. 研究の目的

KLK8 の機能を明らかにすることを目的に、野生型 (WT) とノックアウトマウス ($Klk8^{-/-}$) の創傷治癒の差について比較検討した。

3. 研究の方法

WT マウス、 $Klk8^{-/-}$ マウスの背部皮膚に 8mm パンチを用いて、皮膚全層欠損創を作製し、開放創とした。完全に上皮化するまで、連日創最大径を計測、創傷後 1, 3, 5, 7 日の創部辺縁の皮膚を採取し、RT-PCR、組織染色、免疫染色を施行した。

4. 研究成果

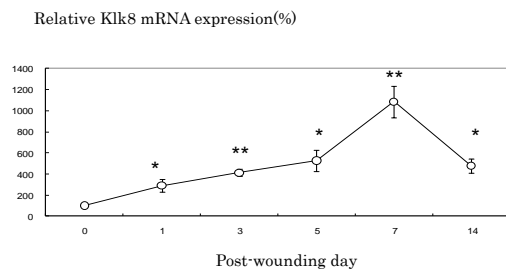
(1) 本研究の主な成果と今後の展望

本研究によって、 $Klk8$ は $Klk6$ などの他のプロテアーゼと関連しながら、表皮の増殖に関与し、創傷治癒を促進する可能性があることが示唆された。また、PAR2 の発現に関与することで表皮分化を促進する可能性も示唆された。以上から、 $Klk8$ が表皮の増殖と分化のバランスを調整することで、創傷治癒を促進する可能性があるものと推察する。なお、研究結果については、2)~6) に記載する。

ただし、 $Klk8$ による $Klk6$ および PAR2 の発現増強の機序が明らかになっておらず、今後さらなる検討を重ねる予定である。

(2) 創傷皮膚における $Klk8$ の発現変化

定量的 RT-PCR により解析した結果、WT マウスでは、創傷により $Klk8$ mRNA の発現が創傷後 1 日目から誘導され、7 日をピークに 14 日目まで有意な発現増加を認めた。免疫染色では、 $Klk8$ は、創傷後 7 日の再生表皮と創部辺縁の有棘層下層から角層にかけて発現が増強していた。以上から、創傷治癒において、表皮における $Klk8$ の発現が増加することがわかった。

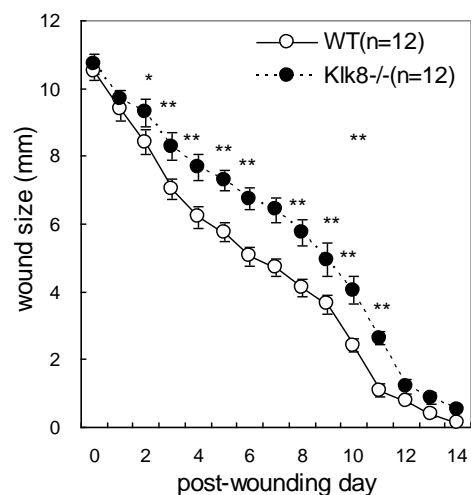


(3) $Klk8$ が創傷治癒に与える影響

創傷を加えてから再上皮化するまで創最大径の計測を行った。結果を下のグラフに示す。

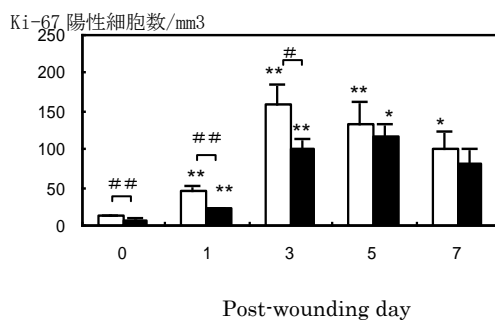
$Klk8^{-/-}$ マウスは創傷後 3 日~11 日にかけて、創最大径が有意に大きく、創閉鎖日数が有意に遅れた (WT 13.0 ± 1.2 日、 $Klk8^{-/-}$ 14.5 ± 1.0 日[#], $\# > 0.05$)。

以上から、 $Klk8^{-/-}$ マウスでは、創傷治癒が遅延することがわかった。



(4) 創傷治癒についての検討

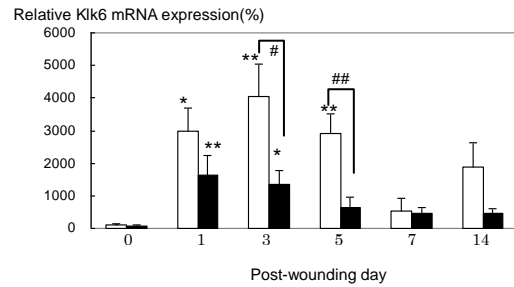
HE染色を用いて、WTとK1k8^{-/-}マウスの創傷治癒について検討した。再上皮化した表皮の厚さはWTマウスで創傷後3~5日に有意に肥厚していた。創傷後のケラチノサイトの増殖に差があるか、創部辺縁の表皮内Ki67陽性細胞数を比較したところ、WTマウスでは、創傷後1~3日にかけて、有意にKi67陽性細胞が増加していた(下グラフ:白棒=WT、黒棒=K1k8^{-/-})。WTマウスでは創傷後3日をピークに増加するのに比べ、K1k8^{-/-}マウスでは、ピークが5日と遅れが見られた。以上から、K1k8^{-/-}マウスでは創傷後のケラチノサイトの増殖が抑えられていると考えた。尚、血管数には差はみられなかった。炎症性サイトカインであるTNF α およびIL-1 β について定量的RT-PCRにて検討したところ、野生型マウスで創傷後1日目に有意に発現が増強していた。



(5) 他の K1ks の発現変化についての検討

KLKはカスケードを形成して機能することから、表皮に発現する他のK1kについて定量的RT-PCRを施行した。K1k6 mRNAは創傷前は差はみられないが、創傷後1日から両者ともに発現が増加した(下グラフ:白棒=WT、黒棒=K1k8^{-/-})。しかし、K1k8^{-/-}マウスでは、WTマウスでみられるほど、強い発現誘導はみられなかった。K1k7 mRNAは、K1k6のような有意な差はみられなかった。以上から、K1k8は創傷後のK1k6の発現誘導に関わることが明らかにされた。

さらにウエスタンブロットでは、WTマウスのK1k6の分子量がK1k8^{-/-}マウスより約0.7kDa小さいことがわかった。この差は、プロセッシングの際に切断されるシグナル配列の分子量に相当することから、WTマウスではK1k6はよりプロセッシングされている可能性があると考えた。



(6) Protease-activated receptor 2 (PAR2) の発現検討

K1k6はPAR2を直接活性化することから、WTマウスとK1k8^{-/-}マウスで、PAR2の発現に差がみられるか検討した。

RT-PCRを施行したところ、両者ともにPAR2 mRNAの発現が誘導されたものの、K1k8^{-/-}マウスでの発現誘導は低く抑えられていた。PAR2の免疫染色では、創傷後1日目は両者ともに顆粒層に弱く発現していたが、創傷後3~7日にかけて、WTマウス表皮の有棘層から顆粒層にかけて、PAR2の発現が増強した。K1k8^{-/-}マウスではWTでみられるほど強い発現増強はみられなかった。また、WTマウスでは、有棘層下層の細胞質内にPAR2を認め、PAR2が活性化されている可能性を考えました。一方、K1k8^{-/-}マウスでは、このような所見はみられなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

1. Kishibe M, Bando Y, Tanaka T, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H, Yoshida S. Kallikrein-Related Peptidase 8-Dependent Skin Wound Healing is Associated with Upregulation of Kallikrein-Related Peptidase 6 and PAR2. *J Invest Dermatol.* 2012. 132(6)1717-24. 査読有.

doi: 10.1038/jid.2012.18

[学会発表] (計3件)

1. Kishibe M, Igawa S, Ishida-Yamamoto A, Iizuka H. Kallikrein-related peptidase 8 Is Involved In Skin Wound Healing Through Upregulation of K1k6 and Protease activated receptor. 36th Annual meeting of

the Japan Society of Investigative Dermatology, 2011.12.9-11, (Japan, Kyoto)

2. 岸部麻里、山本明美、飯塚 一、板東良雄、吉田成孝. 皮膚創傷治癒における Kallikrein-related peptidase-8 (KLK8) の機能解析. 第回日本皮膚科学会北海道地方会、2011.6.19, (日本、札幌)

3. Kishibe M, Bando Y, Ishida-Yamamoto A, Yoshida S, Iizuka H. Kallikrein 8 Is Involved In Skin Wound Healing. The 34th Annual Meeting of the Japan Society of Investigative Dermatology, 2009.12.4-6, (Japan, Fukuoka).

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸部 麻里 (KISHIBE MARI)

旭川医科大学・医学部・特任助教

研究者番号 : 9 0 4 3 1 4 1 0

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし