

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791180

研究課題名(和文) 表皮角化細胞の脱核メカニズム解明と不全角化性疾患における関連因子の動態解析

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of DNA degradation during keratinocyte terminal differentiation and analysis of associated factors in diseased skin with parakeratosis

研究代表者

田中 真実(山本真実)(YAMAMOTO-TANAKA, Mami)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：60421062

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：皮膚バリア形成において、表皮角化細胞の最終分化における脱核は非常に重要であるが、そのメカニズムは不明のままであった。本研究では、脱核のプロセスには表皮メソトリプシンによるプロフィラグリンN末端のプロセッシングを介した経路とカスパーゼ 14によるICAD/CADを介した経路が関与していることを初めて明らかにした。アトピー性皮膚炎や乾癬などの炎症性皮膚疾患では、これらのプロテアーゼの発現が不全角化部位に一致して著しく減少しており、皮膚バリア破綻と密接な関係が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Loss of the nucleus is a critical step during keratinocyte terminal differentiation. However, the mechanism of denucleation is still not fully understood. In this study, we showed that at least two pathways are involved in the denucleation process, that is, profilaggrin N-terminal fragment-dependent and caspase-14-mediated CAD-dependent DNA degradation pathways. Epidermal mesotrypsin liberated a 55-kDa N-terminal fragment of profilaggrin (FLG-N) and FLG-N was translocated into the nucleus. These cells became TUNEL positive. On the other hand, caspase-14 caused limited proteolysis of ICAD, followed by accumulation of caspase activated DNase (CAD), resulting in TUNEL-positive nuclei. Both mesotrypsin and caspase-14 were absent in the parakeratotic area of the skin with atopic dermatitis and psoriasis. These results indicate that multiple pathways are likely to be involved in keratinocyte DNA degradation and the maintenance of the barrier function of epidermis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：表皮角化細胞 カスパーゼ 14 メソトリプシン フィラグリン 不全角化

## 1. 研究開始当初の背景

表皮角化細胞の最終分化における脱核は、皮膚バリア形成に重要であるものの、そのメカニズムは未だ明らかになってはいない。これまでに、DNase1L2, DNase2 の関与が挙げられてきたが、これらのノックアウト(KO)マウスの表皮では異常を認めない。プロフィラグリン N 末端の核移行が最終分化の引きがねになると言われているが、フィラグリン KO マウスにおいても脱核への影響は見られない。また、フィラグリン分解に異常を示すカスパーゼ 14 KO マウスにおいても脱核に異常は認めない。そこで、研究代表者は脱核のプロセスには複数の経路が関与しているのではないかと考え、表皮が顆粒層から角層に移行する最終分化過程で特異的な現象である、カスパーゼ 14 の活性化及びプロフィラグリンの N 末端の核移行に注目した。

カスパーゼ 14 は、フィラグリン分解への関与が報告されており、研究代表者らも天然保湿因子産生への関与を報告しているが、その他の生理機能は明らかになっていない。共同研究者らは、これまでにヒト角層からカスパーゼ 14 を精製し、一次構造を明らかにしており、それをもとにカスパーゼ 14 の活性化体を認識する特異抗体(h14D146)を作製した。また、カスパーゼ 14 の恒常的活性化体(revC14)を作製することにも成功している。加えて、カスパーゼ 14 のモノクローナル抗体を作製し、4 つのクローンを確立した。これらを用いることで、カスパーゼ 14 の前駆体および活性化体の各々を測定できる 2 種類の ELISA 系を確立し、アトピー性皮膚炎においてカスパーゼ 14 の発現が低下していること、また不全角化部位に一致して顕著に低下していることを確認している。アポトーシスにおいては、カスパーゼが ICAD(Inhibitor of Caspase Activated DNase)を分解することで CAD が DNA 分解に作用することは周知の事実であるが、カスパーゼ 14 も ICAD を限定分解することを確認しており、カスパーゼ 14 が DNA 分解に関与している可能性を示唆していると考えられた。また、revC14 をケラチノサイトに発現させ分化誘導をかけると、revC14 発現細胞が TUNEL 陽性となることも確認している。

さらに、プロフィラグリンの N 末端の機能についても注目した。プロフィラグリンはプロセッシングを受け N 末端が遊離すると核内に移行し、ケラチノサイトの最終分化が誘導されると言われている。しかし、核内に移行する正確な部位や DNA 分解を誘導するか否かについては不明である。研究代表者らはプロセッシング酵素を見つけるために、N 末端ペプチドと相互作用をする物質検索を LC/MS/MS 分析法を用いて試み、トリプシノーゲン 3 (PRSS3)を候補として見出した。これまでに研究代表者らは、表皮では特異的なメソトリプシノーゲンが発現していることを報告し

ており、メソトリプシンがプロフィラグリン N 末端のプロセッシングに寄与する可能性が推測された。

これらの事から、表皮の最終分化における脱核には複数の経路が協調的に働いているのではないかとこの仮説に至った。

## 2. 研究の目的

本研究は、表皮の角化における脱核のメカニズムを解明し、乾癬やアトピー性皮膚炎を代表とする不全角化を伴う疾患の皮膚バリア破綻の原因究明を目的とする。さらには、不全角化によるバリア破綻が引き起こす炎症に対して、新たな治療法を見出す手がかりに繋げていきたいと考える。

## 3. 研究の方法

(1)カスパーゼ 14 の ICAD/CAD を介した経路の検討

蛍光蛋白を挿入した発現ベクターを構築し、revC14 発現によるケラチノサイトの形態を共焦点顕微鏡で継続的に観察する。

revC14 発現ベクターを培養細胞に導入する際、z-VAD-fmk 存在下では TUNEL 陽性細胞が減少するか検討する。また、ロイペプチン、アンチパイン、キモスタチン等のインヒビターによる影響も検討する。

培養細胞における revC14 発現細胞で、CAD が核内に凝集されるか、免疫染色で検証する。

Proximity ligation assay(PLA)により、ヒト皮膚組織サンプルを用いて in vivo でのカスパーゼ 14 と ICAD の相互作用を確認する。

(2)プロフィラグリンの N 末端を介した経路の検討

メソトリプシンがプロフィラグリン N 末端のプロセッシングを行うか検証する。メソトリプシン以外にも、KLK5、KLK7、Matriptase、SASPase の発現ベクターを作製し、培養細胞に導入、分化誘導 7 日後に回収。ウエスタンブロットにより、プロフィラグリンのプロセッシング有無とプロセッシングを受けた N 末端の大きさを検証する。

培養細胞にメソトリプシンを発現させることで、プロフィラグリン N 末端が核に凝集し、TUNEL 陽性となるかどうか検証する。

PLA により、ヒト皮膚組織サンプルを用いて、メソトリプシンとプロフィラグリンの相互作用を in vivo で確かめる。

プロフィラグリンは S100 様の A-domain、B-domain、truncated filaggrin repeat、10-12 のフィラグリン繰り返し配列、C 末端からなる。各部位別の発現ベクターを作製し、培養細胞に導入後、免疫染色にて発現細胞の形態を検証。TUNEL 陽性を示すか否かを検証

し、プロフィラグリン N 末端のどの部位が核内に移行し DNA 分解に寄与するのか検討する。また、蛍光蛋白を標識したベクターも作製し、共焦点顕微鏡にて継時的な形態変化を追う。

### (3) ICAD/CAD を介する経路とプロフィラグリン N 末端を介する経路の相互作用の検討

カスパーゼ 14 とメソトリプシンを siRNA で各々あるいは両者を同時に発現抑制した条件下で 3 次元皮膚モデルを作製し、角層における残存核の違いを検討する。

### (4) 不全角化を示す疾患でのカスパーゼ 14 およびメソトリプシン、フィラグリンの発現を検討

乾癬、アトピー性皮膚炎などの不全角化を認める疾患におけるカスパーゼ 14、メソトリプシン、フィラグリンの発現状況を免疫染色にて検証する。

## 4. 研究成果

### (1) プロフィラグリンの N 末端を介した経路の検討

プロフィラグリン N 末端は A-domain, B-domain, truncated filaggrin repeat を含むサイズで核内に移行する。

分化誘導後 7 日目の培養ケラチノサイトの核分画において、55 kDa のプロフィラグリン N 末端が確認できた。この大きさは A-domain から truncated filaggrin repeat まで含んだ 464 アミノ酸の大きさ (FLG-N) に匹敵する。これまでに A~B-domain が核移行するとの報告はあるものの、truncated filaggrin repeat まで核内に移行するという事は、初めて見つけた事実である。そこで、蛍光蛋白の Keima-Red で標識した FLG-N の発現ベクターを作製し、ケラチノサイトに導入したところ、およそ 7 時間後から徐々に核内に凝集されていき、細胞形態が変化していくのが共焦点顕微鏡にて観察された。また、HA タグで標識した FLG-N を発現させた細胞に一致して TUNEL 陽性となることが確認された。

さらに、各ドメインのどの部分が DNA 分解に寄与するか検証するために、A-domain のみ、A-domain+核移行シグナル(NLS)、B-domain、B-domain+truncated filaggrin repeat の 4 つのコンストラクトを作製し、ケラチノサイトに発現させた。その結果、A-domain+NLS のみ、TUNEL 陽性となり、A-domain が DNA 分解に寄与することが確認された。

プロフィラグリン N 末端はメソトリプシンによりプロセシングされる。また、この作用をカスパーゼ 14 が補助する。

プロフィラグリン N 末端と相互作用を示す分子を見つけるため、GST を融合させたリコ

ンビナント蛋白を作製し、5 種類の条件の異なるケラチノサイト抽出液と反応させた。これらのサンプルを LC/MS/MS 分析にて解析した結果、メソトリプシンとカスパーゼ 14 が候補因子として見つかった。

そこで、プロフィラグリン N 末端のプロセシング酵素を見出すために、メソトリプシン、カスパーゼ 14、KLK5、KLK7 の発現ベクターを作製し、ケラチノサイトに導入した。分化誘導後の抽出液を用いてウエスタンブロットを行った結果、メソトリプシンにより 55kDa のプロフィラグリン N 末端がプロセシングされることが確認できた。さらに、メソトリプシンとカスパーゼ 14 の共発現では、より強いバンドとして確認された。また、免疫染色においても、メソトリプシンを細胞に発現させるとプロフィラグリン N 末端が核に凝集され、TUNEL 陽性となることが確認できた。実際に、ヒト皮膚組織においても、PLA 法によりメソトリプシンとカスパーゼ 14、メソトリプシンとプロフィラグリンが顆粒層角層移行部で相互作用を示すことが確認できた。

プロフィラグリン N 末端の Arg に富んだ部分に変異を加えると、メソトリプシンによるプロセシングが阻害される。

FLG-N とフィラグリン・ドメインの間のリンカー部位には、Arg に富む領域が存在する。Arg<sup>455</sup>, Arg<sup>457</sup>, Arg<sup>461</sup>, Arg<sup>464</sup> を Leu に変異させた FLGmut を作製し、N 末端側と C 末端側に蛍光蛋白 Keima-Red (KR) を標識した発現ベクター (KR-FLG-N, KR-FLGmut, FLG-N-KR, FLGmut-KR) を作製した。KR-FLG-N, KR-FLGmut はケラチノサイトに発現させるとおよそ 90% は核内に移行し、TUNEL 陽性を示した。一方、C 末端側に蛍光標識した FLG-N-KR, FLGmut-KR では、細胞質内に留まっていた。これらにメソトリプシンを共発現させると、FLGmut-KR では変化を認めないものの、FLG-N-KR は核内に移行し、TUNEL 陽性となることが確認された。以上の結果から、メソトリプシンが FLG-N とフィラグリン・ドメインの間のリンカー部位に存在する Arg に作用し、FLG-N のプロセシングに関わっていることが明らかとなった。

### (2) カスパーゼ 14 の ICAD/CAD を介した経路の検討

カスパーゼ 14 単独でも培養ケラチノサイトにおいて DNA 分解がおこる。

カスパーゼ 14 の恒常的活性化体 (revC14) を作製し、CMV プロモーターおよびインボルクリンプロモーターでドライブした 2 種類の発現ベクターを作製した。これらを増殖期および分化したケラチノサイトに発現させると、分化誘導後のケラチノサイトでのみ発現細胞の約 9 割が TUNEL 陽性となることがわかった。また、カスパーゼのインヒ

ピターである、z-VAD-fmkにより、TUNEL陽性率が21.5%まで抑制された。ケラチノサイトには様々なプロテアーゼが発現しているが、ロイペプチン、キモスタチン、アンチパインなどの他のインヒビターを用いても、TUNEL陽性率に変化は認めなかった。このことから、カスパーゼ14がDNA分解に関与することが明らかとなった。

カスパーゼ14はICADを分解し、CADが遊離される。

角層抽出液から精製したカスパーゼ14とリコンビナントICADを反応させると、カスパーゼ14によりICADが時間依存的に限定分解されることがわかった。また、角層抽出液中でも、同様の大きさの分解産物の存在が確認できた。カスパーゼ14によりICADが分解されるとCADが遊離するか検証した結果、revC14をケラチノサイトに発現させると、CADは核内に凝集しTUNEL陽性となることが確認できた。また、ヒト皮膚組織においても、PLA法にてカスパーゼ14とICADが顆粒層で相互作用を示すことがわかった。

### (3) ICAD/CADを介する経路とプロフィラグリンN末端を介する経路の相互作用の検討

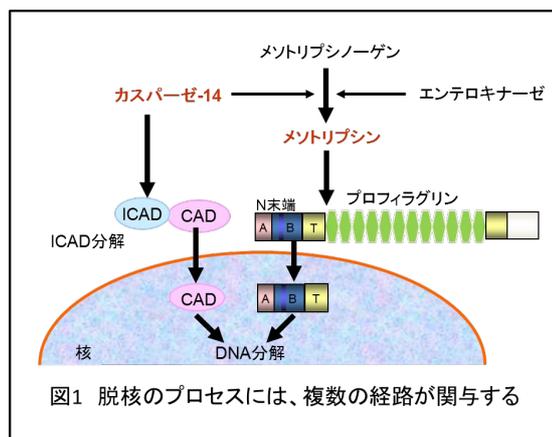
これまでの結果から、DNA分解にはカスパーゼ14によるICAD/CADを介した経路とプロフィラグリンN末端を介した経路の、少なくとも2つの関与が示唆された。そこで、次に、カスパーゼ14、メソトリプシンを各々または両者をsiRNAにてノックダウンすることによる影響を3次元皮膚モデルにて検証した。その結果、各々のノックダウンでも、角層に残存核が認められ、ダブルノックダウンした場合には、さらに有意に不全角化が認められた。

### (4) 不全角化を示す疾患でのカスパーゼ14およびメソトリプシン、フィラグリンの発現を検討

実際に不全角化を示すアトピー性皮膚炎および乾癬における病変部の皮膚組織を用いて、カスパーゼ14およびメソトリプシンの発現を免疫染色で検証した。正常表皮では、カスパーゼ14は有棘層から発現し、顆粒層角層移行部で活性化される。一方、メソトリプシンは顆粒層に強く発現を認める。ところが、アトピー性皮膚炎においても乾癬においても、病変部の不全角化部位に一致して、カスパーゼ14もメソトリプシンも著しく発現が減少していることがわかった。また、ICADが残っている部位では核も残存していることも確認できた。

以上の結果から、表皮の最終分化における脱核にはICAD/CADを介する経路とプロフィラグリンN末端を介する経路が少なくとも存

在し、両者が協調しながら作用していることが初めて示唆された(図1)。



また、研究代表者らは、不全角化のみならず、様々な要因によるバリア破綻が炎症を引き起こすメカニズムについても検討している。その中で、S100A8およびA9が炎症およびその慢性化に重要な働きをしているというデータが得られている。実際、乾癬やアトピー性皮膚炎では、表皮においてS100A8/A9の異常な発現亢進が認められる。これまでに、共同研究者らによりS100A8/A9はTNF $\alpha$ などの炎症性サイトカインの発現を誘導し、さらにこれらのサイトカインがS100A8/A9の発現を促すことが報告されている。S100A8およびS100A9を表皮特異的に過剰発現するトランスジェニックマウスを作製しており、さらに関連する因子の動態解析を進めている。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

- Yamamoto-Tanaka M, Makino T, Motoyama A, Miyai M, Tsuboi R, Hibino T: Multiple pathways are involved in DNA degradation during keratinocyte terminal differentiation. *Cell Death Dis* (2014) 5, e1181; doi:10.1038/cddis.2014.145 査読有
- Miyai M, Matsumoto Y, Yamanishi H, Yamamoto-Tanaka M, Tsuboi R, Hibino T: Keratinocyte-specific mesotrypsin contributes to desquamation process via kallikrein activation and LEKTI degradation. *J Invest Dermatol* (2014) 134: 1665-1674 査読有
- Sakabe JI, Yamamoto M, Hirakawa S, Motoyama A, Ohta I, Tatsuno K, Ito T, Kabashima K, Hibino T, Tokura Y: Kallikrein-related peptidase 5 functions in proteolytic processing of profilaggrin in cultured human keratinocytes. *J Biol Chem* (2013) 288: 17179-17189 査読有
- Hibino T, Sakaguchi M, Miyamoto S,

Yamamoto M, Motoyama A, Hosoi J, Shimokata T, Ito T, Tsuboi R, Huh NH: S100A9 is a novel ligand of EMMPRIN that promotes melanoma metastasis. *Cancer Res* (2013) 73: 172-183 査読有  
Yamamoto M, Miyai M, Matsumoto Y, Tsuboi R, Hibino T: Kallikrein-related peptidase-7 regulates caspase-14 maturation during keratinocyte terminal differentiation by generating an intermediate form. *J Biol Chem* (2012) 287: 32825-32834 査読有

〔学会発表〕(計15件)

田中(山本)真実, 牧野輝彦, 本山晃, 宮井雅史, 坪井良治, 日比野利彦: 表皮ケラチノサイトの最終分化における脱核には複数の経路が協調的に関係している, 第36回日本分子生物学会, 2013年12月5日, 神戸

Yamamoto-Tanaka M, Makino T, Motoyama A, Tsuboi R, Hibino T: Multiple pathways are involved in DNA degradation during keratinocyte terminal differentiation. 第27回表皮細胞研究会, 2013年11月23日, 山梨

田中(山本)真実, 阪口政清, 本山晃, 許南浩, 日比野利彦, 坪井良治: アトピー性皮膚炎における S100A8/A9 の役割 - 新規レセプターの発見とその機能. 第90回東京医科大学・東京薬科大学・免疫アレルギー研究会, 2013年11月5日, 東京

山本真実, 本山晃, 桃井隆, 坪井良治, 日比野利彦: S100A9-EMMPRIN と inflammasome はアトピー性皮膚炎の病態に関与する. 第112回日本皮膚科学会総会, 2013年6月15日, 横浜

Yamamoto M, Inoue K, Sawane M, Maeda T, Tsuboi R, Hibino T: Activation of inflammasome is related to S100A9 induction and is involved in chronic inflammation of the skin with atopic dermatitis. *International Investigative Dermatology*, May 9, 2013, Edinburgh, Scotland

Yamamoto M, Sakaguchi M, Motoyama M, Huh N, Tsuboi R, Hibino T: Identification of a novel receptor for S100A8 and its possible involvement in abnormal proliferation. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Okinawa, Dec 7-9, 2012, Japan

山本真実, 牧野輝彦, 本山晃, 坪井良治, 日比野利彦: 表皮角化細胞の脱核のプロセスには複数の経路が関与する. 第111回日本皮膚科学会総会, 2012年6月2日, 京都

Yamamoto M, Miyai M, Matsumoto Y, Tsuboi R, Hibino T: KLK7 participates in activation of caspase-14 during keratinocyte terminal differentiation. The 72nd Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology, May 10-11, 2012, Raleigh, North Carolina

〔図書〕(計1件)

Yamamoto-Tanaka M, Hibino T: Caspase-14 protocols. In; *Methods in Molecular Biology 1133*, edited by P. Bozhov and G. Salvesen. New York: Humana Press, 2014, p.89-100.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 真実(山本真実) (YAMAMOTO-TANAKA, Mami)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号: 60421062