

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17303

研究課題名（和文）皮膚バリア機能障害におけるKLK6の役割の解明

研究課題名（英文）The role of kallikrein-related peptidase 6 in skin barrier dysfunction

研究代表者

飯沼 晋 (Inuma, Shin)

旭川医科大学・医学部・客員助教

研究者番号：70516533

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,900,000円

研究成果の概要（和文）：Kallikrein-related peptidase 6 (KLK6) は、皮膚の表皮において発現するセリンプロテアーゼの1つである。アトピー性皮膚炎の表皮ではKLK6の発現が上昇していることが知られているが、その役割は明らかになっていない。今回われわれは皮膚バリア障害マウスモデルの表皮においてKLK6の発現が上昇していることを明らかにした。さらにKLK6欠損マウスを用いた研究により、KLK6がアトピー性皮膚炎マウスモデルの皮膚炎の増悪に寄与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりKLK6がアトピー性皮膚炎マウスモデルの皮膚炎の増悪に寄与することが明らかになった。したがってヒトのアトピー性皮膚炎においても同様にKLK6が皮膚炎の増悪に関与する可能性が示唆された。今後この研究が進むことによって、新たなアトピー性皮膚炎の診断方法など臨床応用につながる可能性がある。またKLK6をターゲットとした新規治療が開発されることが期待される。さらにKLK6が高発現している乾癬などその他の皮膚疾患の病態解明にも貢献することができる。

研究成果の概要（英文）：Kallikrein-related peptidase 6 (KLK6) is a serine protease expressed in the epidermis of the skin. Although KLK6 is known to be highly expressed in the epidermis of atopic dermatitis, the role of KLK6 in atopic dermatitis remains unclear. This study showed that KLK6 is strongly expressed in the epidermis of a mouse skin barrier dysfunction model. Furthermore, we showed that KLK6 is important for the development of a mouse model of atopic dermatitis, suggesting that it may play a role in the pathology of human atopic dermatitis.

研究分野：皮膚科学

キーワード：アトピー性皮膚炎 皮膚バリア 角化細胞 セリンプロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

Kallikrein-related peptidases (KLKs) は、複数の遺伝子から構成される分泌型のセリンプロテアーゼファミリーである。表皮における KLKs の機能の代表的なものとして、角層の剥離が挙げられる。また角層の剥離以外にも、KLKs は、表皮角化細胞に発現する Protease-activated receptor 2 (PAR2) の活性化を介して、炎症や痒疹を誘導することが知られている。KLK6 もまた、表皮において発現するセリンプロテアーゼの 1 つとして知られているが、その機能については不明であった。アトピー性皮膚炎の表皮では KLK6 の発現が上昇していることが知られている。しかしながら KLK6 がアトピー性皮膚炎など皮膚バリア障害時においてどのような役割を果たすのかは明らかになっていない。過去の報告から KLK6 が表皮バリア機能異常と PAR2 活性化によってアトピー性皮膚炎を増悪させる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では KLK6 がアトピー性皮膚炎など皮膚バリア障害に与える影響とそのメカニズムについて KLK6 ノックアウトマウスを用いた研究により明らかにすることを目的とする。KLK6 の皮膚バリア障害における役割を解明することにより、アトピー性皮膚炎の新しい診断方法など臨床応用につながる可能性がある。また KLK6 を中心としたセリンプロテアーゼが新たなアトピー性皮膚炎などの治療ターゲットとなる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) KLK6 は皮膚バリア機能にどのような影響を与えるか？

KLKs は角層の剥離を介して皮膚バリア機能に影響を与えることが知られている。はじめに野生型マウスと KLK6 ノックアウトマウスで皮膚バリア機能の差異が見られるかを確認する。

KLK6 の表皮細胞の増殖および分化に与える影響

野生型マウスおよび KLK6 ノックアウトマウスの正常皮膚において組織学的な構造や細胞増殖および分化に差異があるか免疫染色を行い解析する。

皮膚バリア障害時の KLK6 を含む KLKs の発現検討

テープストリッピングは皮膚バリア障害を引き起こすことが知られている。野生型マウス皮膚にバリア障害を加えることで、KLK6 を含む KLKs の発現が変化するかを定量的 PCR、免疫染色を行い解析する。

KLK6 の皮膚バリア機能に与える影響

野生型マウスおよび KLK6 ノックアウトマウス皮膚においてテープストリッピングにより皮膚バリア障害を惹起する。その後、経時的に皮膚を回収し、2 つのマウス間で皮膚バリア障害時の 2 次的な皮膚炎に組織学的な差異が見られるかを解析する。

(2) KLK6 はオキサゾロン誘発皮膚炎にどのような影響を与えるか？

アトピー性皮膚炎の表皮では KLK6 の発現が亢進していることが報告されている。野生型マウスと KLK6 ノックアウトマウスでアトピー性皮膚炎マウスモデルであるオキサゾロン誘発皮膚炎の差異が見られるかを確認する。

オキサゾロン誘発皮膚炎における KLK6 を含む KLKs の発現検討

野生型マウスでオキサゾロン誘発皮膚炎を惹起する。その後経時的に皮膚を回収し、KLK6 を含む KLKs の発現が変化するかを定量的 PCR、免疫染色を行い解析する。

KLK6 のオキサゾロン誘発皮膚炎に与える影響

野生型マウスおよび KLK6 ノックアウトマウスでオキサゾロン誘発皮膚炎を惹起する。経時的に皮膚を回収し 2 つのマウス間で皮膚炎に組織学的な差異が見られるかを解析する。

4. 研究成果

(1) KLK6 は皮膚バリア機能にどのような影響を与えるか？

KLK6 は正常皮膚において表皮細胞の増殖および分化に影響を与えない。

はじめに野生型マウスおよび KLK6 ノックアウトマウスの正常皮膚を HE 染色で観察したところ、表皮の厚さや角層の厚さなど組織構造に明らかな差異を認めなかった。また細胞増殖のマーカーである Ki67 の免疫染色を行い、表皮細胞の Ki67 陽性細胞数を定量したところ、野生型マウスおよび KLK6 ノックアウトマウスで明らかな差異を認めなかった。さらに表皮細胞の分化マーカーであるフィラグリン・インボルクリン・ロリクリンの免疫染色を行ったところ、両群で同様の染色パターンを示した。以上の結果から KLK6 は正常皮膚において表皮細胞の増殖および分化に影響を与えないことが明らかになった。

KLK6 の発現は皮膚バリア障害により誘導される。

次に野生型マウスの皮膚にテープストリッピングにより皮膚バリア障害を惹起した。表皮に発現する代表的な KLKs である KLK5、KLK6、KLK7、KLK8、KLK14 の発現を定量的 PCR で解析したところ、KLK6 の発現がテープストリッピング 24 時間後に約 13 倍に誘導されることが明らかになった。さらに KLK6 の免疫染色を行ったところ、KLK6 の発現がテープストリッピング 24 時間後に表皮上層に誘導されることが明らかになった(図 1)。以上の結果から KLK6 は皮膚バリア障害時に表皮上層に強く誘導されることが明らかになった。

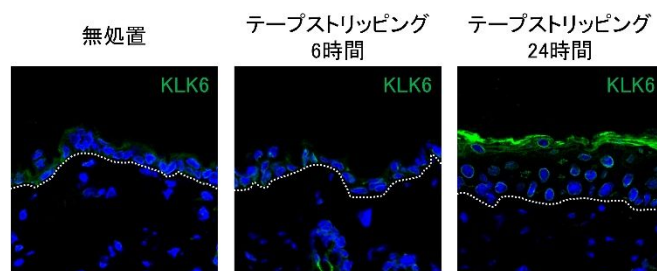


図1: KLK6の発現は皮膚バリア障害により誘導される

KLK6 は皮膚バリア障害時の表皮細胞の増殖に寄与する。

さらに野生型マウスおよび KLK6 ノックアウトマウスの皮膚にテープストリッピングにより皮膚バリア障害を惹起した。テープストリッピング 24 時間後に両群のマウスで表皮肥厚が見られた。次に KLK6 の免疫染色により、KLK6 ノックアウトマウスにおいて表皮上層の KLK6 の発現が消失していることを確認した。さらに Ki67 の免疫染色を行い、表皮細胞の Ki67 陽性細胞数を定量したところ、野生型マウスと比較して KLK6 ノックアウトマウスでは Ki67 陽性細胞が減少していることが明らかになった(図 2)。このことから KLK6 は皮膚バリア障害時の表皮細胞の増殖に寄与することが明らかになった。

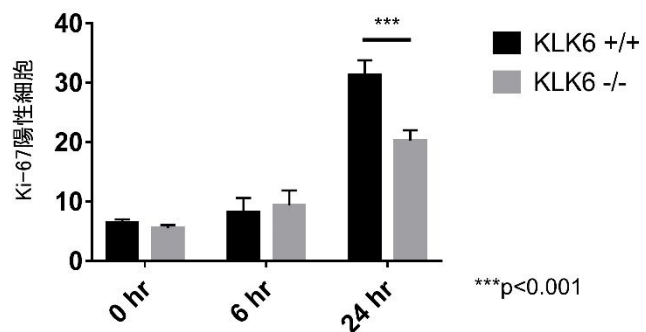


図2: KLK6は皮膚バリア障害時の表皮細胞の増殖に寄与する

(2) KLK6 はオキサゾロン誘発皮膚炎にどのような影響を与えるか？

オキサゾロン誘発皮膚炎では KLK6 の発現が増加している。

野生型マウスの耳介にオキサゾロン誘発皮膚炎を惹起した。オキサゾロン誘発皮膚炎では耳介に浮腫が見られ、表皮の厚さが肥厚していた。オキサゾロン皮膚炎において KLK6 の免疫染色を行ったところ、無処置時と比較して肥厚した表皮上層に KLK6 の発現が誘導されていた。また PAR2 の免疫染色を行ったところ、KLK6 と同様に表皮上層に PAR2 の発現が増加していた。以上の結果から KLK6 はオキサゾロン誘発皮膚炎の表皮上層に強く誘導されることが明らかになった。

KLK6 はオキサゾロン誘発皮膚炎において皮膚炎の増悪に寄与する。

次に野生型マウスおよび KLK6 ノックアウトマウスの皮膚にオキサゾロン誘発皮膚炎を惹起した。KLK6 ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較して耳介の浮腫が減少しており、組織学的に表皮肥厚が減少していた(図3)。このことから KLK6 はオキサゾロン誘発皮膚炎において皮膚炎の増悪に寄与することが明らかになった。したがってアトピー性皮膚炎においても同様に KLK6 が皮膚炎の増悪に関与する可能性が示唆された。

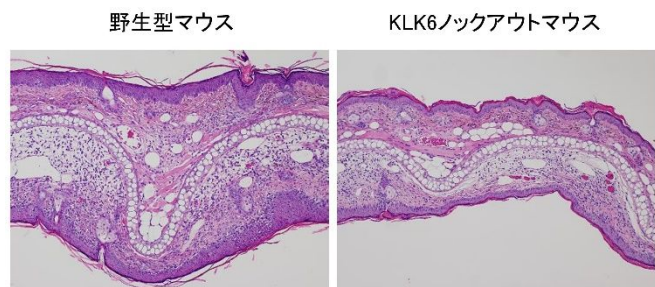


図3: KLK6ノックアウトマウスではオキサゾロン誘発皮膚炎が減少する

アトピー性皮膚炎における KLK6 の機能を図4にまとめた。アトピー性皮膚炎の病態形成における KLK6 の役割については、未だ不明な点も多く今後さらなる検討を要する。動物モデルを用いた研究により KLK6 の生体内での機能が徐々に解明され、KLK6 の生理的な機能だけでなく、皮膚疾患の病態への関与に注目が集まっている。今後、さらに研究が進むことによって、KLK6 をターゲットとした新規治療が開発されることが期待される。

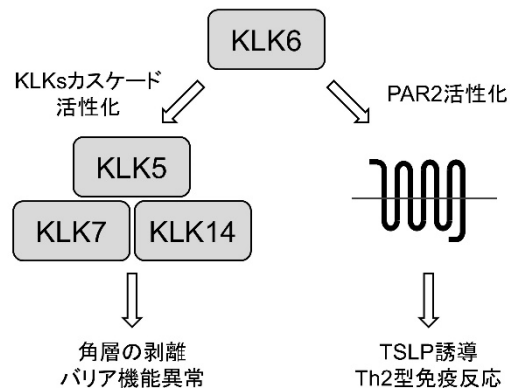


図4: アトピー性皮膚炎におけるKLK6の機能

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 飯沼 晋	4. 巻 40
2. 論文標題 Kallikrein-related peptidasesのアトピー性皮膚炎における役割	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 463-466
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 飯沼 晋	4. 巻 40
2. 論文標題 Kallikrein-related peptidase 6の皮膚バリア機能障害における役割の解明	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アレルギーの臨床	6. 最初と最後の頁 681-684
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------