

## 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4月18日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791074

研究課題名（和文） Th2環境が表皮角化細胞産生カリクレインの発現および皮膚バリアに与える影響

研究課題名（英文） An effect of Th2 environment on kallikrein expression in keratinocytes and skin barrier

研究代表者

森実 真（MORIZANE SHIN）

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：80423333

研究成果の概要（和文）：

我々はTh2サイトカインであるIL-4とIL-13が培養正常表皮角化細胞におけるカリクレイン7の発現および機能を増強することを見出した。アトピー性皮膚炎患者の血清中のIL-4とカリクレイン7の濃度をELISAで測定し相関関係についてスピアマンの順位相関係数を用いて検証したところ、両者は有意に相関していた。

これらの結果からアトピー性皮膚炎においてTh2サイトカインがカリクレイン7の発現を誘導し、表皮バリア機能に影響を与えていることが示唆される。

研究成果の概要（英文）：

We found that Th2 cytokines, IL-4 and IL-13, increase kallikrein 7 expression and function in keratinocytes. Further, KLK7 protein level in the sera of atopic dermatitis patients significantly correlated with IL-4 amounts in the sera. Our finding describes a link between the Th2 environment and epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：アトピー性皮膚炎，カリクレイン，Th2サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎は慢性の湿疹病変を主体とするアレルギー性の皮膚疾患で、遺伝的素因に基づく多病因性の疾患であり、現時点で疾患そのものを完治させる治療法はないため対症療法で日常診療が行われている。

アトピー性皮膚炎の病態機序には大きく分けて二つの要素が関与している。一つは皮膚表層の表皮角化細胞層におけるバリア機能の低下と皮膚の乾燥であり、他方はTh2サイトカインを主体とする様々なサイトカイン・ケモ

カインによる全身性の炎症反応である。これらのサイトカインが表皮バリア機構に与える影響については詳細には報告されていない。

セリンプロテアーゼであるカリクレインは表皮角層の剥離を促すことが知られており、過剰なカリクレインの発現は表皮のバリア機能に影響を与える。我々は表皮角化細胞におけるカリクレインの制御機構について研究する過程でTh2サイトカインがカリクレイン7の発現を誘導することを見出した。

## 2. 研究の目的

本研究では表皮角化細胞における、Th2サイトカインによるセリン型プロテアーゼ・カリクレインの制御機構を解明すると共に、Th2サイトカインによるカリクレインの誘導がアトピー性皮膚炎の病態に及ぼしうる影響を調べることを目的としている。

## 3. 研究の方法

(1) IL-4 と IL-13 が正常表皮角化細胞でカリクレインを誘導する詳細なメカニズムについて研究を進める。正常表皮角化細胞をIL-4 と IL-13 で刺激した後、カリクレイン7の誘導のパターンを経時的に(0、0.5、1、3、6、12、24、48、72、96 時間後にサンプルを回収)リアルタイムPCR と ELISA を用いて解析する。

(2) Th2 サイトカインによって誘導されたカリクレイン7の上昇が、角化細胞のタンパク分解酵素活性を変動させうるかどうかを機能的解析で検証する。正常表皮角化細胞をIL-4 と IL-13 で刺激した後、培養上清を回収。Th2 サイトカインによるカリクレイン7の発現の増加に一致してキモトリプシン様セリンプロテアーゼ活性の増加がみられるかを特異的基質 (Suc-Ala-Ala-Phe-AMC) を用い

たプロテアーゼアッセイによって検証する。

(3) アトピー性皮膚炎患者における Th2 サイトカインとカリクレイン7との相関性について臨床サンプルを用いて検証する。患者血清中の IL-4 とカリクレイン7の濃度について ELISA で測定し相関関係について検証する。

## 4. 研究成果

(1) Th2 サイトカインがカリクレイン7を誘導する機構について、リアルタイムPCRによる mRNA レベルの解析では48時間後に最も強い発現誘導がみられた。ELISAによるタンパクレベルの解析では時間依存性に培養上清中のカリクレイン7の発現量が増加していた。

(2) 特異的基質を用いたプロテアーゼアッセイについて、IL-4 または IL-13 で刺激した角化細胞の培養上清では有意にキモトリプシン様セリンプロテアーゼ活性が増加していた。

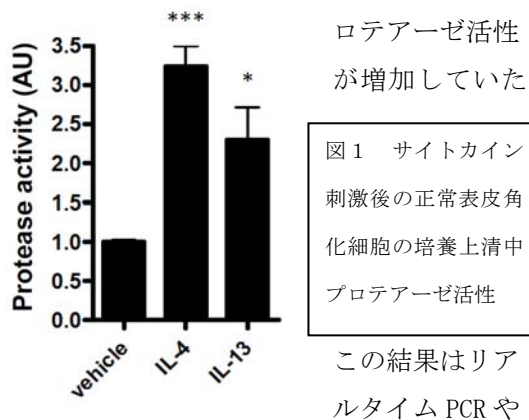


図1 サイトカイン刺激後の正常表皮角化細胞の培養上清中プロテアーゼ活性

この結果はリアルタイムPCRやELISAの結果に一致する所見である。

(3) アトピー性皮膚炎患者の血清中の IL-4 とカリクレイン7の濃度を ELISA で測定し相関関係についてスピアマンの順位相関係数を用いて検証したところ、両者は有意に相関していた(図2)。

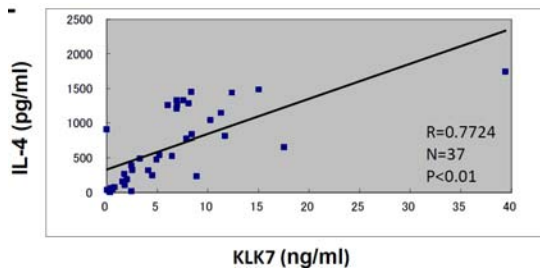


図2 アトピー性皮膚炎患者における血中 IL-4 および  
カリクレイン7の濃度

これらの結果からアトピー性皮膚炎において TH2 サイトカインがカリクレイン7の発現を誘導し、表皮バリア機能に影響を与えていることが示唆される。カリクレインと Th2 サイトカインの関連を報告するものはまだ無く、Th2 サイトカインの角化細胞におけるカリクレイン誘導機構を解析する点において本研究は独創的であり、学術的論文においても他に類を見ないものである。今後セリンプロテアーゼであるカリクレインの関与が明確に示されれば、この機構に作用しうるセリンプロテアーゼ特異的阻害剤などが、皮膚バリア障害に対する治療薬として認知され開発される可能性が非常に高い。

#### 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 森実真、角化細胞産生カリクレイン発現および皮膚バリア、皮膚の科学、査読無、10巻、2011、29-33

[学会発表] (計6件)

- ① 森実真、アトピー性皮膚炎の表皮角化細胞における組織カリクレイン7の発現、日本皮膚科学会愛媛地方会、第54回学術大会、2011年9月24日、松山全日空ホテル、松山

- ② 森実真、角化細胞産生カリクレイン発現および皮膚バリア、アトピー性皮膚炎治療研究会第16回シンポジウム、2011年2月5日、北九州国際会議場、小倉

- ③ 森実真、アトピー性皮膚炎における角化細胞産生カリクレイン7の発現制御機構、第40回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会、2010年12月10-12日、広島国際会議場、広島

- ④ Shin Morizane, Tissue kallikrein 7 expression and the protease activity in keratinocytes are enhanced by Th2 cytokines in atopic dermatitis、日本研究皮膚科学会第35回年次学術大会・総会、2010年12月3-5日、和歌山県民文化会館、和歌山

- ⑤ Shin Morizane, Th2 cytokines enhance tissue kallikrein 7 expression and the serine protease activity of keratinocytes in atopic dermatitis, The 40<sup>th</sup> annual meeting of the European Society for Dermatological Research, 9/8-11/2010, Helsinki, Finland.

- ⑥ Shin Morizane, Th2 cytokines enhance tissue kallikreins and serine protease activity of keratinocytes in atopic dermatitis, The 70<sup>th</sup> annual meeting of Society for Investigative Dermatology, 5/5-8/2010, Atlanta, U. S. A.

#### 6. 研究組織

- (1) 研究代表者

森実 真 (MORIZANE SHIN)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：80423333

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者