

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 8 日現在

機関番号：13802

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659525

研究課題名(和文) フィラグリンモノマー形成に関わるカリクレイン5の重要性

研究課題名(英文) Significance of kallikrein-5 in the formation of filaggrin monomer

研究代表者

戸倉 新樹 (TOKURA, Yoshiki)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：00172156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：フィラグリンは皮膚バリアの構成蛋白である。前駆体であるプロフィラグリンは蛋白分解酵素によってリンカー部分が切れフィラグリンモノマーとなるが、そのプロセッシング過程は明らかではない。カリクレイン5(KLK5)は皮膚における主なセリンプロテアーゼである。我々はKLK5がプロフィラグリンのプロセッシング酵素であることを見出した。それを検討するために、リンカーを含む合成蛋白を作成し、KLK5の切断活性を確認した。さらにPLP法、免疫組織化学法、免疫電顕法でKLK5とプロフィラグリンは顆粒層で共存することが判明した。培養角化細胞においてKLK5をノックダウンしたところプロフィラグリン量が増加した。

研究成果の概要(英文)：Filaggrin contributes to the formation of the human skin barrier. Profilaggrin is cleaved by proteolytic enzymes and converted to functional filaggrin, but its processing mechanism remains not fully elucidated. Kallikrein-related peptidase 5 (KLK5) is a major serine protease found in the skin. We searched for profilaggrin-processing protease(s) by partial purification of epidermal extracts and found KLK5 as a possible candidate. We used HPLC coupled with mass spectrometry to show that KLK5 cleaves profilaggrin. KLK5 also cleaved fusion protein containing linker of profilaggrin. Furthermore, based on a proximity ligation assay, immunohistochemistry, and immunoelectron microscopy analysis, we reveal that KLK5 and profilaggrin co-localize in the stratum granulosum in human epidermis. KLK5 knockdown in normal cultured human epidermal keratinocytes resulted in higher levels of profilaggrin, indicating that KLK5 potentially functions in profilaggrin cleavage.

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：皮膚生理学 フィラグリン 角層 バリア カリクレイン 角化細胞

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎 (AD) の病態に寄与する重要な分子として、フィラグリンが注目されている。AD 患者の角層バリアでは、フィラグリン遺伝子変異により、フィラグリンが欠乏しているという発見が端緒になっている。フィラグリンは、皮膚表皮顆粒層にて、プロフィラグリン (460 kDa) として作出され、N 末端領域、不完全フィラグリン領域、フィラグリンリピート領域 (10-12 のフィラグリンモノマーがリンカーを介して数珠つなぎになっている) C 末端領域より構成される。作出されたプロフィラグリンは、自身を構成するアミノ酸の一つであるセリン残基がリン酸化されている。脱リン酸化後、プロフィラグリンに含まれるリンカー部分が、幾つかの酵素によりプロセッシングを受け、その結果、フィラグリンモノマー (37 kDa) が作られる。産生されたフィラグリンモノマーが、ケラチン線維を凝集することで、ケラチン線維束が形成され、角化細胞の扁平化が起こると考えられている。ケラチン線維の凝集という役目を終えたフィラグリンモノマーは、最初に、アルギニン残基がシトルリンに変換され、それまでに結合していたケラチンから遊離する。遊離したフィラグリンは、数種の酵素により特異的な分解を受け、最終的に天然保湿因子となる。このように、天然保湿因子の作出に関しては、その産生機序が検討されている。

2. 研究の目的

フィラグリンモノマーの産生機序に関しては十分に検討されていない。プロフィラグリンからフィラグリンモノマーへのプロセッシング酵素として、ヒトでは SASPase が知られていたが、他のプロテアーゼの存在も想定されたそこで我々は、ヒトのプロフィラグリンのプロセッシングに関与する酵素の同定を試みた。

3. 研究の方法

(1) LC/MS/MS 法によりプロフィラグリン分解関連酵素を検討し、結果で述べるようにカクレイン 5 (KLK5) を、同定した。

(2) KLK5 によるリコンビナントヒトプロフィラグリンタンパク (rhFLG) の分解とその阻害を検討した。

(3) 表皮角化細胞における KLK5 発現抑制時のプロフィラグリンのプロセッシングを評価した。

(4) 蛍光免疫組織化学染色法、proximity ligation assay (PLA) 法、免疫電子顕微鏡法を用いたプロフィラグリンおよびフィラグリンと KLK5 の細胞局在を検討した。

4. 研究成果

(1) LC/MS/MS 法により、プロフィラグリン分解関連酵素として、KLK5 が同定された。

(2) KLK5 は、rhFLG を分解した。しかし、rhFLG のリンカー領域に変異を挿入したものでは、分解されなかった。さらに KLK5 の中和抗体や阻害剤である AEBSF を 1 mM および 10 mM 用いた酵素活性阻害実験においても、リコンビナントタンパクの分解が抑制された。

(3) KLK5 shRNA を正常ヒト表皮角化初代培養細胞へ導入することで、KLK5 の発現が抑制された。scramble shRNA を導入した細胞では、プロフィラグリンが正常にプロセッシングされるのに対して、KLK5 の発現を抑制した細胞では、プロフィラグリンのプロセッシングに異常が見られた。

(4) 蛍光免疫組織化学染色法では、プロフィラグリンと KLK5 の共局在が表皮顆粒層において観察された。また、PLA 法を用いたさらなる解析では、プロフィラグリンと KLK5 が、40 nm 以内の距離に局在していることが表皮顆粒層にて確認できた。さらに詳細に局在を検討するために用いた免疫電子顕微鏡法においても、表皮顆粒層において、プロフィラグリンと KLK5 の共局在が細胞内において認められた。以上から、KLK5 はプロフィラグリンのプロセッシング酵素であることが明らかとなった。

今回我々は、生化学的解析および培養した表皮角化細胞を用いて、KLK5 が細胞内においてヒトのプロフィラグリンのプロセッシングに関与していることを示した。これまで KLK5 は、細胞間の接着に関わるコルネオデスモシン、デスモグレイン 1、デスモコリン 1 の分解を行うことで、表皮剥離に重要な役割を有する細胞外で働く酵素として認識されていた。今回、KLK5 に新たな機能が存在することを初めて見出した。従来、KLK5 が異常に亢進および活性化している遺伝子改変マウスで、野生型マウスに比してフィラグリンモノマーの産生が有意に高まることが副次的に示されていたのみであった。我々は、野生型または変異を挿入したリンカーを有する rhFLG の分解実験では、KLK5 がリンカー部分を特異的に切断することを示し、KLK5 の局在も明らかとした。近年、AD 患者において、フィラグリン遺伝子変異が同定された。フィラグリン遺伝子変異を有するヒトでは、フィラグリンモノマーの産生量が欠失または著しく低下し、皮膚表皮バリア機能の障害が生じ、外来抗原物質の透過性が高まることが示唆されている。プロフィラグリンのリンカー部分に変異が同定された例は、これまでに報告されていない。従って、プロフィラグリンが作られ、KLK5 が活性化していれば、フィラグリンモノマーが作出される。AD 患

者の中には、フィラグリン遺伝子変異が無いにもかかわらず、フィラグリンモノマーが低下している群が想定されている。こうした患者群では KLK5 の活性が低下していることも考えられる。

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〕(英文論文総数 計 101 件)

Nakazawa S, Moriki M, Ikeya S, Sakabe J-I, Tokura Y: Atopic dermatitis presenting as generalized poikiloderma with filaggrin gene mutation. J Dermatol (in press).

Sakabe J, 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 288: 17179-17189, 2013.

Yamaguchi H, Kabashima-Kubo R, Bito T, Sakabe J-I, Shimauchi T, Ito T, Hirakawa S, Hirasawa N, Ogasawara K, Tokura Y: High frequencies of positive nickel/cobalt patch tests and high sweat nickel concentration in patients with intrinsic atopic dermatitis. J Dermatol Sci 72(3): 240-245, 2013.

Yamaguchi H, Tatsuno K, Sakabe J, Tokura Y: Second report of FLG R501X mutation in Japanese patients with atopic dermatitis. J Dermatol 40: 498-499, 2013.

Kabashima-Kubo R, Nakamura M, Sakabe J-I, Sugita K, Hino R, Mori T, Kobayashi M, Bito T, Kabashima K, Ogasawara K, Nomura Y, Nomura T, Akiyama M, Shimizu H, Tokura Y: A group of atopic dermatitis without IgE elevation or barrier impairment shows a high Th1 frequency: Possible immunological state of the intrinsic type. J Dermatol Sci 67: 37-43, 2012.

〔学会発表〕(英語発表 計 82 件)

Tokura Y: Proteome analysis of corneum from atopic dermatitis patients. World Rendez-vous on Dermatology. 2014.3.11. Tokyo, Japan

Tokura Y: Profilaggrin processing and metal allergy: Novel aspects of atopic dermatitis. International Immunodermatology Symposium(Post-IID 2013). 2013.5.13. Heidelberg, Germany.

Sakabe J, Yamamoto M, Motoyama A, Ohta I, Hirakawa S, Hibino T, Tokura Y: Involvement of kallikrein-related peptidase 5 in profilaggrin processing. 2013 International Investigative Dermatology Meeting. 2013.5.9-11. Edinburgh, United Kingdom.

Sakabe J, Ohta I, Hirakawa S, Tokura Y: Co-localization of kallikrein5 and profilaggrin in keratohyalin granules and reduction of filaggrin monomers by kallikrein5 downmodulation. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2012.12.7-8. Naha, Japan.

〔図書〕(総数 計 45 件)

戸倉新樹: アトピー性皮膚炎: 皮膚バリアの破綻によるアレルギー. 実験医学 31: 143-149, 2013.

戸倉新樹: フィラグリン異常とアレルギー疾患の進展. モダンフィジシャン 33: 193-197, 2013

戸倉新樹: IgE 値正常の内因性アトピー性皮膚炎の成因は如何に. 皮膚アレルギーフロンティア. 10: 19-23, 2012.

戸倉新樹: 皮膚バリアからみるアトピー性皮膚炎の全体像. 臨床免疫・アレルギー科 58: 295-299, 2012.

〔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
浜松医科大学皮膚科学講座 業績
<http://www2.hama-med.ac.jp/w1b/derm/ach>

ievements/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

戸倉 新樹 (TOKURA, Yoshiki)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：00172156

(2) 研究分担者

平川 聡史 (HIRAKAWA, Satoshi)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50419511

(3) 連携研究者

坂部 純一 (Sakave, Jun-ichi)

浜松医科大学・医学部・特任助教

研究者番号：30631494