

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461658

研究課題名(和文) 表皮角化細胞産生セリンプロテアーゼ阻害因子の発現制御機構の解析

研究課題名(英文) The analysis of regulation of serine protease inhibitors expression in epidermal keratinocytes

研究代表者

森実 真 (Morizane, Shin)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：80423333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：培養ヒト正常表皮角化細胞を用いた検討で、高濃度Ca<sup>2+</sup>、炎症性サイトカインであるTNF- $\alpha$ とIL-17A、およびToll様受容体リガンドがセリンプロテアーゼ阻害因子の発現を有意に増強した。さらに高濃度Ca<sup>2+</sup>は培養上清中のトリプシン様セリンプロテアーゼ活性を増強し、その一方でキモトリプシン様セリンプロテアーゼ活性を減弱させることが明らかになった。免疫組織化学的検討では乾癬、酒さ、尋常性ざ瘡、慢性膿皮症、帯状疱疹の病変部においてLEKTI、SLPI、エラフィンの発現が増強していた。

研究成果の概要(英文)：High calcium, TNF- $\alpha$ , IL-17A, and Toll-like receptor ligands significantly induced the expression of LEKTI, SLPI, and elafin in normal human epidermal keratinocytes. In addition, high calcium up- and down-regulated trypsin- and chymotrypsin-like serine protease activities in epidermal keratinocytes, respectively. Immunohistochemical analysis revealed that the expression of LEKTI, SLPI, and elafin were increased in the lesion of psoriasis, rosacea, acne, chronic pyoderma, and herpes zoster.

研究分野：皮膚自然免疫

キーワード：セリンプロテアーゼ セリンプロテアーゼ阻害因子 表皮角化細胞

### 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あり、そ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り、他方は表皮角化細胞層におけるバリア機能異常である。

表皮のバリア形成に重要な因子のひとつとしてセリンプロテアーゼである組織カリクレインが挙げられる。ヒトでは現在15種類の組織カリクレインが報告されているが、表皮角化細胞においては特にカリクレイン5(トリプシン型セリンプロテアーゼ)とカリクレイン7(キモトリプシン型セリンプロテアーゼ)が高発現している(*Cell Mol Life Sci.* 2008;65:2019-2038)。これらのカリクレインは、正常皮膚においてデスモグレインなどの細胞接着分子を基質として、表皮角層の剥離を促すと考えられる(*J Invest Dermatol.* 2004;122:1235-1244)。また、アトピー性皮膚炎病変部ではカリクレインが過剰に発現していることが報告されている。セリンプロテアーゼ活性の上昇は表皮細胞間接着分子の過剰な分解を誘導するため、病変部は微生物やアレルゲンが侵入しやすい表皮に変化すると考えられている(*J Allergy Clin Immunol.* 2006;118:3-21)。加えてヒトカリクレイン7のトランスジェニックマウスは慢性皮膚炎を自然発症すると報告されている(*J Invest Dermatol.* 2002;118:444-449)。このように過剰発現しているカリクレイン5やカリクレイン7はアトピー性皮膚炎の病態に関与している可能性が高いが、それらの発現制御機構についてはよく知られていなかった。我々は組織カリクレインと局所で産生しうる炎症性サイトカインの関連性について注目し、皮膚炎症部位で発現しうるサイトカインが表皮角化細胞のカリクレイン発現に与える影響を検討した。正常表皮角化細胞をTh1、Th2、またはTh17サイトカインで刺激すると、意外なことにTh2サイトカインであるIL-4とIL-13だけが角化細胞においてカリクレイン7の発現を誘導することを見出した(*J Allergy Clin Immunol.* 2012; 130:259-61)。

一方で、表皮におけるカリクレインの酵素活性はリンパ上皮 Kazal 型関連阻害因子(LEKTI)、分泌型白血球ペプチダーゼ阻害因子(SLPI)、エラフィンといったセリンプロテアーゼ阻害因子によって制御されている(*J Allergy Clin Immunol.* 2006;118:3-21)。カリクレイン酵素の異常活性化モデルマウス(LEKTI(SPINK5)の欠損マウス)ではフィラグリンの分解促進に伴って、角層バリア機能の低下と皮膚湿疹性炎症が誘発される。LEKTIの遺伝子異常はヒトのNetherton症候群患者において見いだされ、これらの患者ではアトピー性皮膚炎様の症状と高IgE血症を来すのは、興味深い一

致である(*Nat Genet.* 2000;25:141-142)。加えて最近、新たに表皮カリクレイン制御因子としてLEKTI2(SPINK9)、SPINK6が報告された(*PLoS One.*2009;4:e4372。)(*J Biol Chem* 2010; 285: 32174-81)。

我々によって表皮角化細胞産生カリクレインの発現制御機構は報告されているが(*J Invest Dermatol.*2010;130:1297-306。)(*J Allergy Clin Immunol.* 2012; 130:259-61)、前述のセリンプロテアーゼ阻害因子の発現制御機構について詳細に報告するものはまだない。

### 2. 研究の目的

本研究はセリンプロテアーゼ阻害因子の発現を誘導する機構について培養ヒト表皮角化細胞を用いて、転写レベル、蛋白レベル、酵素活性レベルで解析すること、さらに種々の皮膚疾患における阻害因子の発現を検討することを目的としている。

### 3. 研究の方法

培養ヒト正常表皮角化細胞を炎症性サイトカイン、高濃度カルシウム(Ca<sup>2+</sup>)、活性型ビタミンD<sub>3</sub>、アシトレチン、またはToll様受容体リガンドで刺激した後、LEKTI、SLPI、エラフィンの発現をリアルタイムPCRとELISAを用いて解析した。

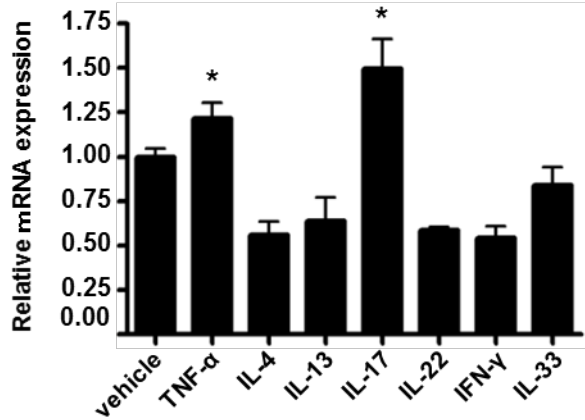
アトピー性皮膚炎、乾癬、酒さ、尋常性ざ瘡、慢性膿皮症、帯状疱疹の病変部におけるLEKTI、SLPI、エラフィンの発現について免疫組織学的に検討した。

### 4. 研究成果

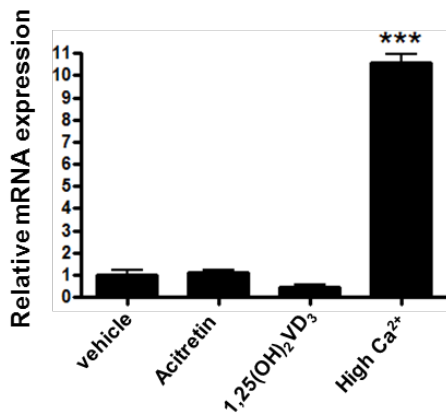
培養ヒト正常表皮角化細胞を用いた検討で、高濃度Ca<sup>2+</sup>が転写および蛋白レベルでLEKTIの発現を有意に増強した。その誘導はCa<sup>2+</sup>濃度依存性および時間依存性であった。さらに高濃度Ca<sup>2+</sup>は培養上清中のトリプシン様セリンプロテアーゼ活性を増強し、その一方でキモトリプシン様セリンプロテアーゼ活性を減弱させることが明らかになった。また炎症性サイトカインであるTNF-αとIL-17A、およびToll様受容体リガンドもセリンプロテアーゼ阻害因子の発現を増強した。

次に我々は正常皮膚、アトピー性皮膚炎病変部、乾癬病変部におけるLEKTIの発現を免疫組織学的に検討した。興味深いことにLEKTIの発現は乾癬病変部で著明に増強している一方で、アトピー性皮膚炎病変部では正常皮膚と同レベル程度しか認めなかった。さらに酒さ、尋常性ざ瘡、慢性膿皮症、帯状疱疹の皮膚病変部においてLEKTI、SLPI、エラフィンの発現が増強していた。これらの結果は表皮角化細胞において炎症性サイトカインやToll様受容体リガンドがこれらの阻害因子の発現を誘導することと関連があると示唆された。

### SPINK5



### SPINK5



### LEKTI

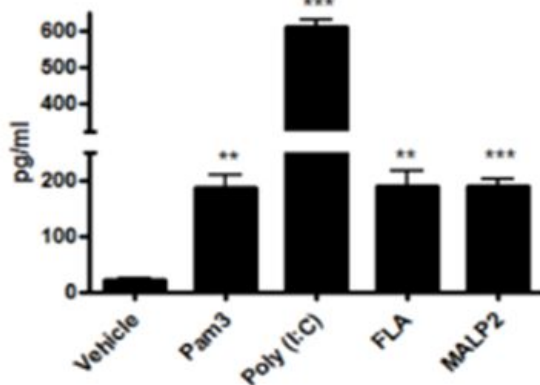


図 ヒト正常表皮角化細胞において高濃度 Ca<sup>2+</sup>、TNF-αと IL-17A、Toll 様受容体リガンドは LEKTI(SPINK5)の発現を増強する。

#### 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](計 1 件)

Kobashi M, Morizane S, Sugimoto S, Sugihara S, Iwatsuki K. Expression of serine protease inhibitors in epidermal keratinocytes is increased by calcium but not 1,25-dihydroxyvitamin D3 or retinoic acid. Br J Dermatol. 2016 Oct 31. doi: 10.1111/bjd.15153. [Epub ahead of print] 査読あり

[学会発表](計 7 件)

Kobashi M, Morizane S, Sugimoto S, Sugihara S, Iwatsuki K. Calcium but not 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D3 or retinoic acid increases SPINK5 expression in epidermal keratinocytes. The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2015.12.11-13, Okayama, Japan

Sugihara S, Morizane S, Sugimoto S, Kobashi M, Iwatsuki K. TNF-alpha and IL-17A increase SPINK5 expression in epidermal keratinocytes. The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2015.12.11-13, Okayama, Japan

Sugimoto S, Morizane S, Sugihara S, Kobashi M, Sunagawa K, Iwatsuki K. TNF-alpha, IL-17A, a Toll-like receptor 3 ligand, and high calcium enhances the expression of SPINK6 in epidermal keratinocytes. The 40th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2015.12.11-13, Okayama, Japan

杉本佐江子, 森実真, 杉原悟, 小橋美那, 岩月啓氏. アトピー性皮膚炎におけるセリンプロテアーゼインヒビターの発現および機能解析. 第 46 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会. 2016.11.05-06, 東京

Sugimoto S, Morizane S, Sugihara S, Kobashi M, Iwatsuki K. TLR signaling regulates the expression of the expression of serine protease inhibitors in epidermal keratinocytes. The 41st Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2016.12.09-11, Sendai, Japan

Sugihara S, Morizane S, Sugimoto S, Kobashi M, Iwatsuki K. The expression of serine protease inhibitors are induced by TNF- and IL-17A in skin inflammatory diseases. The 41st Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2016.12.09-11, Sendai, Japan

Kobashi M, Morizane S, Sugimoto S, Sugihara S, Iwatsuki K. The expression of serine protease inhibitors in epidermal keratinocytes is increased by calcium, but not 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> or retinoic acid. The 41st Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology. 2016.12.09-11, Sendai, Japan

〔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〕

ホームページ等なし

#### 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

研究者番号：

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

なし