

Th2サイトカインはアトピー性皮膚炎患者におけるカリクレイン7の発現と機能を増強する

森実 真^{a*}, 山崎 研志^b, 梶田 藍^a, 池田佳寿子^a, Maosheng Zhan^a, 青山裕美^a, Richard L Gallo^c, 岩月啓氏^a

^a岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 皮膚科学, ^b東北大学大学院医学系研究科 皮膚科学, ^c米国カリフォルニア大学サンディエゴ校医学部 皮膚科学

キーワード: アトピー性皮膚炎, Th2 サイトカイン, カリクレイン, 表皮角化細胞

Th2 cytokines increase kallikrein 7 expression and function in patients with atopic dermatitis

Shin Morizane^{a*}, Kenshi Yamasaki^b, Ai Kajita^a, Kazuko Ikeda^a, Maosheng Zhan^a, Yumi Aoyama^a, Richard L Gallo^c, Keiji Iwatsuki^a

^aDepartment of Dermatology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, ^bDepartment of Dermatology, Tohoku University Graduate School of Medicine, ^cDivision of Dermatology, Department of Medicine, University of California, San Diego

アトピー性皮膚炎 (AD) 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。カリクレインはセリンプロテアーゼの一種であり, その名前はギリシャ語で膀胱を意味する kallikreas に由来する¹⁾。現在ヒトでは15種類の組織カリクレインが報告されており, 第19染色体の長腕に KLK1 から

KLK15までが遺伝子クラスターを形成している²⁾。表皮では mRNA レベルで KLK2, KLK3, KLK15以外の12種類³⁾、蛋白質レベルでは8種類の組織カリクレインの発現が確認されているが⁴⁾、特に高発現しているのは KLK5 と KLK7 である^{5,6)}。

KLK5 はトリプシン様セリンプロテアーゼであり, アルギニンとリジンのC末端を切断し, KLK7 はキモトリプシン様セリンプロテアーゼであり, チロシンとフェニルアラニンのC末端を切断する⁷⁾。表皮において, KLK5 と KLK7 は細胞接着分子であるデスモグレイン, デスモコリン, コルネオデスモシンを基質として作用し, 角層の剥離を促すと考えられている⁸⁾。そしてこれらの酵素が過剰に働き過ぎないようにリンパ上皮 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が作用して酵素活性がコントロールされている⁸⁾。また最近 KLK5 と KLK7 だ

平成25年8月受理

*〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1

電話: 086-235-7282 FAX: 086-235-7283

E-mail: zanemori@cc.okayama-u.ac.jp

プロフィール



森実 真

昭和49年生まれ

平成12年4月 岡山大学医学部・歯学部附属病院 皮膚科 研修医

平成12年6月 倉敷中央病院 研修医

平成14年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 大学院生

平成17年1月 呉共済病院 皮膚科 医員

平成17年10月 岡山大学医学部・歯学部附属病院 皮膚科 医員

平成19年7月 米国カリフォルニア大学サンディエゴ校医学部 皮膚科講座 ポストドクトラルフェロー

平成21年9月 岡山大学病院 皮膚科 医員

平成21年10月 岡山大学病院 皮膚科 助教

現在に至る

けではなく KLK8 と KLK14 も角層の剥離に関与していることが報告された⁹⁾。これらの組織カリクレインとプロテアーゼ阻害因子の均衡が崩れると接着分子の分解がおり、微生物やアレルゲンが侵入しやすい表皮に変化してしまう。

AD と組織カリクレインの関連性について注目してみると、AD の病変部において組織カリクレインの発現は増強していることがすでに報告されている^{3,10,11)}。また組織カリクレインの制御因子である LEKTI が先天的に欠損したネザートン症候群の患者は AD 様の症状を呈する¹²⁾。ネザートン症候群のモデル動物として LEKTI ノックアウトマウスが作成されているが、このマウスでは皮膚バリア機能が低下し、経表皮水分蒸散量 (TEWL) が上昇、KLK5 と KLK7 の活性が上昇している¹³⁾。さらにネザートン症候群では KLK5 がプロテアーゼ活性化型受容体 2 (PAR2) を介して TSLP や IL-8 などの発現を増強し皮膚炎を誘導していることが報告された¹⁴⁾。加えてヒト KLK7 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¹⁰⁾。

このように過剰発現している KLK5 や KLK7 は AD 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い。そこで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た¹⁵⁾。

我々は正常ヒト表皮角化細胞を炎症性サイトカインで刺激し培養上清を回収、KLK7 の発現量を ELISA で評価した。興味深いことに Th2 サイトカインである IL-4 と IL-13 だけが KLK7 の発現を有意に誘導した (図 1 A)。Th1, Th17 サイトカインでは KLK7 の発現誘導はみられなかった。この誘導はリアルタイム PCR によって mRNA レベルでも確認された (図 1 B)。一方で KLK5 と KLK8 の発現は Th2 サイトカインによって変化しなかった (図 1 C, D)。KLK14 については培養表皮角化細胞において恒常的な発現が確認できなかった。また組織カリクレインの活性を制御するプロテアーゼ阻害因子の発現についても検証したが Th2 サイトカインによって LEKTI (SPINK5)、エラフィン (PI3)、SLPI の発現は誘導されなかった (図 1 E, F, G)。このとき角化細胞の分化マーカーであるフィラグリ (FLG) とロリクリン (LOR) の発現は従来の報告通り有意に低下していた (図 1 H, I)。

次に我々は酵素活性について検討した。角化細胞を IL-4 または IL-13 で刺激し培養上清を回収、特異的基

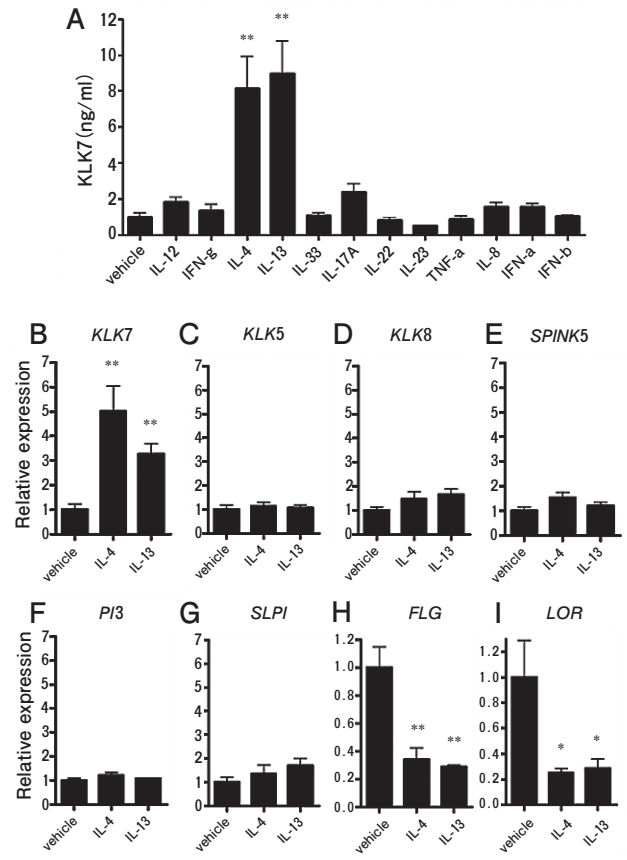


図1 A: 正常ヒト表皮角化細胞を炎症性サイトカインで刺激し培養上清を回収、ELISA で KLK7 の濃度を測定した。B-I: 正常表皮角化細胞を IL-4 または IL-13 を刺激し mRNA を回収、KLK7, KLK5, KLK8, SPINK5, PI3, SLPI, FLG, LOR の発現をリアルタイム PCR で評価した。(転載許諾を得て文献15より引用)

質を用いてキモトリプシン様セリンプロテアーゼ活性とトリプシン様セリンプロテアーゼ活性を測定した。その結果、IL-4 と IL-13 は有意に培養上清中のキモトリプシン様セリンプロテアーゼ活性を増強していた (図 2 A)。その一方でトリプシン様セリンプロテアーゼ活性は変化していなかった (図 2 B)。これらの結果は先の ELISA とリアルタイム PCR の結果に一致していた。

また我々は実際の AD 病変部での KLK7 の発現が従来の報告通り高発現していることをリアルタイム PCR (図 2 C) および免疫染色で確認した (図 2 D)。さらに AD 患者血清中での KLK7 と Th2 サイトカインの濃度について検討したところ血清中の KLK7 の濃度は IL-4 の濃度と有意に相関することがわかった (図 2 E)。これらの結果は Th2 サイトカインが表皮におけるセリンプロテアーゼとプロテアーゼ阻害因子

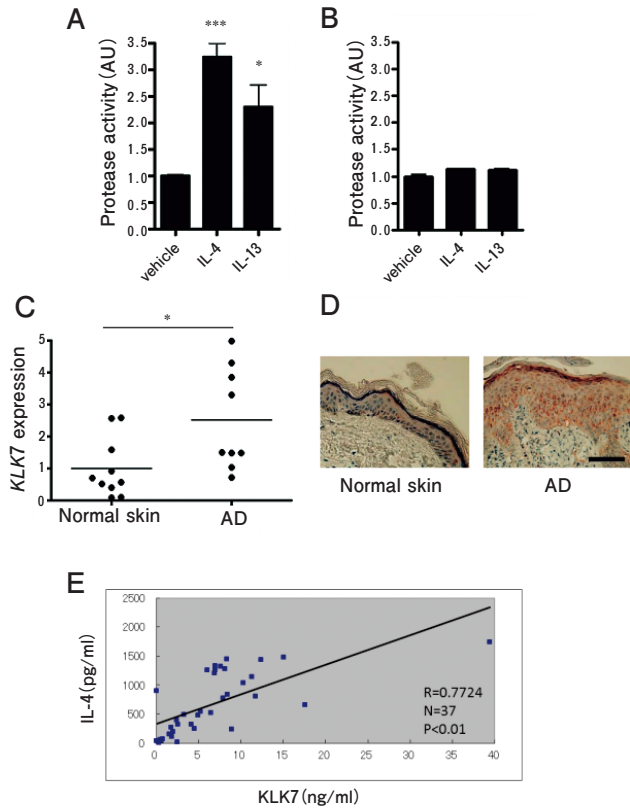


図2 A, B：正常ヒト表皮角化細胞をIL-4またはIL-13を刺激し培養上清を回収，特異的基質を用いてトリプシン型セリンプロテアーゼ（A）とキモトリプシン型セリンプロテアーゼ（B）の活性を測定した。C, D：正常皮膚とAD病変部におけるKLK7の発現をリアルタイムPCR（C）および免疫染色（D）で評価した。E：AD患者血清中のIL-4の濃度とKLK7の濃度を測定し相関関係について解析した。（転載許諾を得て文献15より引用）

の均衡を変化させ，ADにおけるバリア機能低下に関与する可能性を示唆している。

組織カリクレインとADの関連性についての研究はいくつか報告されているが，組織カリクレインとTh2サイトカインの関連性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組織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。Th2サイトカインによってセリンプロテアーゼである組織カリクレインが誘導される詳細なメカニズム，また結果としての皮膚バリアの破壊がより明確に示されれば，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予防薬・治療薬として認知され開発される可能性がある。

文 献

- 1) Kraut H, Frey EK, Werle E: Der Nachweis eines Kreislaufhormons in der Pankreasdrüse. *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem* (1903) 189, 97-106.
- 2) Yousef GM, Diamandis EP: The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease. *Endocr Rev* (2001) 22, 184-204.
- 3) Komatsu N, Saijoh K, Toyama T, Ohka R, Otsuki N, Hussack G, Takehara K, Diamandis EP: Multiple tissue kallikrein mRNA and protein expression in normal skin and skin diseases. *Br J Dermatol* (2005) 153, 274-281.
- 4) Komatsu N, Saijoh K, Sidiropoulos M, Tsai B, Levesque MA, Elliott MB, Takehara K, Diamandis EP: Quantification of human tissue kallikreins in the stratum corneum: dependence on age and gender. *J Invest Dermatol* (2005) 125, 1182-1189.
- 5) Hansson L, Stromqvist M, Backman A, Wallbrandt P, Carlstein A, Egelrud T: Cloning, expression, and characterization of stratum corneum chymotryptic enzyme. A skin-specific human serine proteinase. *J Biol Chem* (1994) 269, 19420-19426.
- 6) Ekholm IE, Brattsand M, Egelrud T: Stratum corneum tryptic enzyme in normal epidermis: a missing link in the desquamation process? *J Invest Dermatol* (2000) 114, 56-63.
- 7) Yamasaki K, Schaubert J, Coda A, Lin H, Dorschner RA, Schechter NM, Bonnart C, Descargues P, Hovnanian A, Gallo RL: Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. *FASEB J* (2006) 20, 2068-2080.
- 8) Caubet C, Jonca N, Brattsand M, Guerrin M, Bernard D, Schmidt R, Egelrud T, Simon M, Serre G: Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/CLK5/hK5 and SCCE/CLK7/hK7. *J Invest Dermatol* (2004) 122, 1235-1244.
- 9) Ovaere P, Lippens S, Vandenabeele P, Declercq W: The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. *Trends Biochem Sci* (2009) 34, 453-463.
- 10) Hansson L, Bäckman A, Ny A, Edlund M, Ekholm E, Ekstrand Hammarström B, Törnell J, Wallbrandt P, Wennbo H, Egelrud T: Epidermal overexpression of stratum corneum chymotryptic enzyme in mice: a model for chronic itchy dermatitis. *J Invest Dermatol* (2002) 118, 444-449.
- 11) Komatsu N, Saijoh K, Kuk C, Liu AC, Khan S, Shirasaki F, Takehara K, Diamandis EP: Human tissue kallikrein expression in the stratum corneum and serum of atopic dermatitis patients. *Exp Dermatol* (2007) 16, 513-519.
- 12) Chavanas S, Bodemer C, Rochat A, Hamel-Teillac D, Ali M, Irvine AD, Bonafé JL, Wilkinson J, Taïeb A, Barrandon Y, Harper JI, de Prost Y, et al.: Mutations

- in SPINK5, encoding a serine protease inhibitor, cause Netherton syndrome. *Nat Genet* (2000) 25, 141-142.
- 13) Descargues P, Deraison C, Bonnard C, Kreft M, Kishibe M, Ishida-Yamamoto A, Elias P, Barrandon Y, Zambruno G, Sonnenberg A, Hovnanian A : Spink5-deficient mice mimic Netherton syndrome through degradation of desmoglein 1 by epidermal protease hyperactivity. *Nat Genet* (2005) 37, 56-65.
- 14) Briot A, Deraison C, Lacroix M, Bonnard C, Robin A, Besson C, Dubus P, Hovnanian A : Kallikrein 5 induces atopic dermatitis-like lesions through PAR2-mediated thymic stromal lymphopoietin expression in Netherton syndrome. *J Exp Med* (2009) 206, 1135-1147.
- 15) Morizane S, Yamasaki K, Kajita A, Ikeda K, Zhan M, Aoyama Y, Gallo RL, Iwatsuki K : T(H)2 cytokines increase kallikrein 7 expression and function in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* (2012) 130, 259-261.