

## 学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	岸部麻里
<p>学位論文題目</p> <p>Kallikrein 8 Is Involved In Skin Desquamation Through Cleaving Desmoglein 1 and Corneodesmosin</p> <p>(カリクレイン8は、デスモグレイン1とコルネオデスモシンを分解することによって落屑に関わる)</p> <p>共著者名</p> <p>板東良雄、寺山隆司、高橋英俊、橋本喜夫、山本明美、飯塚 一、吉田成孝</p> <p>未公表</p> <p>研究目的</p> <p>表皮の重要な機能には水分保持とバリア機能がある。これらは主に角層によって形成されている。いくつかの角層プロテアーゼは角層間接着を切断し、最外層の角質細胞を脱落することで角層を一定の厚さに保ち、バリア機能の維持に貢献する。カリクレイン8 (KLK8) は表皮に発現するトリプシン様活性を有するセリンプロテアーゼである。KLK8 は、ヒトおよびマウス皮膚では顆粒層から角層に局在し、表皮ケラチノサイトの分化増殖に関与するとされるが詳細な機能は不明である。また KLK8 は、尋常性乾癬およびアトピー性皮膚炎などの炎症性皮膚疾患で発現が増加しており、病態形成に関わる可能性が示唆されている。12-o-Tetradecanoyl-Phorbol Acetate (TPA) は protein kinase C (PKC) のアクチベーターであり、塗布により表皮の分化増殖を誘導し、尋常性乾癬様の病態を形成することが知られている。今回、我々は野生型マウスと KLK8 ノックアウトマウスに TPA を塗布し、両者の違いを比較検討することで、KLK8 の表皮における機能と乾癬における発現増加の意義について解析を試みた。</p> <p>材料・方法</p> <p><b>ヒト組織:</b> 尋常性乾癬病巣部 (n=7) を採取した。正常皮膚 (n=3) は植皮手術組織を入手した。</p> <p><b>実験モデル:</b> 6~9 週齢雌性の C57BL/6-neurosin<sup>+/+</sup>マウス (WT マウス) と C57BL/6-neurosin<sup>-/-</sup>マウス (KLK8<sup>-/-</sup>マウス) を使用した。背部皮膚を剃毛したのち、10nM TPA を 200<math>\mu</math>l 塗布した。塗布前、塗布後 24 時間、48 時間、72 時間、5 日、7 日の皮膚を採取した。</p>			

**RT-PCR** : マウス皮膚から RNA を抽出し、RT-PCR を施行し、TPA 塗布後の KLK8、KLK7、KLK6 mRNA の発現変化について検討した。Real-time PCR を用いて定量的解析も行なった。

**組織染色**: 凍結切片を 1%サフラニン水溶液で染色後、2%KOH にて封入し、角層数を計測した。1 切片につき任意に 6 箇所を選び、計測を行なった。

**免疫染色** : 凍結切片を用いてヒト皮膚を抗 hKLK8 抗体、マウス皮膚を抗 mKLK8 抗体、抗 KLK6 抗体、抗コルネオデスモシン(CDSN)抗体、抗デスモグレイン 1 (DSG 1)抗体を 1 次抗体として ABC 法にて行なった。

**蛋白分解活性測定**: マウス皮膚を 1M NaCl で 4°C、72 時間インキュベートし、表皮と真皮に分離した。表皮のみを 62.5mM Tris-HCl、2% glycerol、1% NP-40、5mM EDTA でホモジェナイズし、15000g で 20 分間遠心し、上清を蛋白分解活性の測定に用いた。基質には KLK8 の基質である Boc-Val-Pro-Arg-MCA (VPR-MCA)、Boc-Phe-Ser-Arg-MCA (FSR-MCA)を使用した。100mM の基質に蛋白量 10 $\mu$ g の抽出液を加え、37°C で 2 時間インキュベートした。放出された AMC は吸光光度計により測定した。

**In situ zymography**: 凍結切片を 2% Tween20+Milli Q で洗浄後、BOPY-FL 標識カゼインで 37°C、2 時間反応させた。水洗後、蛍光顕微鏡下で観察した。

**免疫プロット法**: マウス皮膚を 56°C の 10mM EDTA+PBS で 5 分間加熱し、表皮と真皮に分離した。表皮のみを lysis buffer でホモジェナイズし、15000g で 20 分間遠心した。上清を表皮蛋白抽出液とした。SDS-PAGE し、転写後、抗 DSG 1 抗体、抗 CDSN 抗体を 1 次抗体として反応させた。HRP 標識 2 次抗体で室温、1 時間で反応させたのち、ECL advance western blot detection kit (Amersham<sup>®</sup>) により化学発光させた。

## 結 果

**正常皮膚と尋常性乾癬における KLK8 の発現** : 免疫プロット法で、尋常性乾癬で 28kDa hKLK8 の発現が増強していた。免疫染色では、正常皮膚で顆粒層から角層下層に弱く発現し、尋常性乾癬では有棘層上層から角層に発現が増加していた。

**TPA 塗布後の KLK8 発現変化と表皮の形態変化**: TPA 塗布により、WT では KLK8 mRNA の発現が 48 時間をピークに 5 倍に増加した。WT と KLK8<sup>-/-</sup>マウスの表皮について変化を調べたところ、TPA 塗布後の角層数は、72 時間を過ぎてから KLK8<sup>-/-</sup>マウスで WT に比較して有意に肥厚した。

**TPA 塗布後の KLK8 以外の KLK の発現変化** : WT では KLK6、KLK7 mRNA は 24 時間をピークにそれぞれ 35 倍、2.4 倍に増加した。ところが KLK8<sup>-/-</sup>マウスでは、KLK7 mRNA の有意な増加は認めず、KLK6 mRNA の増加は 4 倍にとどまった。免疫染色では KLK8 は有棘層上層から角層に強く発現し、KLK6 は顆粒層から角層に発現を認め、両者の局在は顆粒層から角層で一致した。

**蛋白分解活性の変化** : TPA 塗布後の蛋白分解活性に差がないか検討を行なったところ、WT では VPR-MCA 分解活性が 72 時間後まで上昇した。FSR-MCA 分解活性は 48 時間をピークに上昇した。KLK8<sup>-/-</sup>マウスではいずれも活性が低かった。また、活性は顆粒層から角層に認め、KLK8 と KLK6 が共局在する部位と一致した。

**角層間デスモゾーム構成蛋白の変化** : 角層間接着分子である DSG1 と CDSN について検討した。WT では、TPA 塗布後 48 時間までに DSG1 蛋白の減少を認めたが、KLK8<sup>-/-</sup>マウスでは認めなかった。また、WT では KLK8<sup>-/-</sup>マウスに比較して、CDSN の 2 次分解産物である 32kDa CDSN が有意に増加した。

## 考 察

過去の報告と同様に乾癬病巣部での KLK8 の発現増加を認めた。TPA は表皮ケラチノサイトの増殖を誘導し、ターンオーバーを亢進することで乾癬類似の表皮を形成する。TPA により WT と KLK8<sup>-/-</sup>マウスともに表皮の増殖が誘導されるのを確認した。WT ではより強く増殖が誘導され、KLK8 がケラチノサイトの増殖に関わるとする過去の報告とも一致する。RT-PCR および免疫染色の結果から、KLK8 が TPA 塗布後の KLK6、KLK7 mRNA の十分な誘導に必須であり、KLK8 が有棘層で KLK6 の誘導に働いたのち、顆粒層で KLK6 を活性化の可能性が示唆された。KLK はカスケード反応によって機能することが知られており、今回の研究でも、KLK8 は KLK6 と KLK7 に平行な変動を示し、カスケードの中の 1 つの因子として機能する可能性が示唆された。さらに免疫染色および蛋白分解活性の検討から、KLK8 がカスケードの上流に位置して効率よく活性を上昇させ、維持する可能性が示唆された。最近、KLK カスケードが落屑において重要な役割をもつことが明らかにされた。KLK5 は KLK7 を活性化し、角層デスモゾーム構成蛋白である CDSN、DSG1 およびデスモコリン1を分解する。その他、少なくとも KLK5、KLK6、KLK7、KLK8 を含む 8 つの KLK がカスケードに関連する可能性が指摘されている。TPA 塗布 72 時間以降では KLK8<sup>-/-</sup>マウスの角層が有意に肥厚した。KLK8<sup>-/-</sup>マウスでは、WT に比べて角層間接着分子である DSG1 および CDSN の分解がみられなかったことから、角質細胞の脱落が遅延し、角層の肥厚が生じたと考えられる。

## 結 論

今回の検討から、KLK8 が KLK6、KLK7 の発現誘導に関わり、角層間接着分子の切断に関与することが示された。KLK8 は、表皮ケラチノサイトの増殖に関与するとともに、肥厚した角層を脱落することで表皮のバランスを維持するよう機能している可能性が示唆された。

## 引 用 文 献

1. Caubet C, Jonca N, Brattsand M, Guerrin M, Bernard D, Schmidt R, Egelrud T, Simon M, Serre G: Degradation of Comeodesmosome Proteins by Two Serine Proteases of the Kallikrein Family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. *J Invest Dermatol.* 2004,122:1235-44.
2. 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 disease. *Br J Dermatol* 2005,153: 274-281

## 参 考 論 文

1. Ishida-Yamamoto A, Simon M, Kishibe M, Miyauchi Y, Takahashi H, Yoshida S, O'Brien TJ, Serre G, Iizuka H: Epidermal lamellar granules transport different cargoes as distinct aggregates. *J Invest Dermatol.* 2004,122:1137-44.
2. Descargues P, Deraison C, Bonnart 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

## 学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	岸部 麻里
<p>審査委員長 谷 口 隆 信 ㊞</p> <p>審査委員 飯 塚 一 ㊞</p> <p>審査委員 吉 田 成 孝 ㊞</p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p><b>Kallikrein 8 Is Involved In Skin Desquamation Through Cleaving Desmoglein 1 and Corneodesmosin</b></p> <p>(カリクレイン 8 は、デスマoglein 1 とコルネオデスマシンを分解すること によって落屑に関わる)</p> <p style="text-align: center;">共著者名</p> <p>板東良雄、寺山隆司、高橋英俊、橋本喜夫、山本明美、飯塚 一、吉田成孝</p> <p style="text-align: center;">未公表</p>			
<p>表皮において角層は一定の厚みを保ち、体内の水分を保持し外界とのバリア機能を果たしている。この角層の厚みの調節には、いくつかのプロテアーゼが関与し、角層間接着を切断して最外層の角質細胞を脱落させることが知られている。カリクレイン 8 (KLK8) は表皮に発現するトリプシン様活性を有するセリンプロテアーゼであり、ヒトおよびマウス皮膚では顆粒層から角層に局在することが報告されているが詳細な機能は不明である。また KLK8 は、尋常性乾癬およびアトピー性皮膚炎などの炎症性皮膚疾患で発現が亢進しており、病態形成に関わる可能性も示唆されている。protein kinase C (PKC) のアクチベーターである Tetradececanoyl-Phorbol Acetate (TPA) は、塗布により表皮の分化増殖を誘導し、尋常性乾癬様の病態モデルとして研究されている実験系である。今回、著者らは野生型マウスと KLK8 ノックアウトマウスを用い、TPA 塗布による差異を比較検討することで、KLK8 の表皮における機能と乾癬における病態的意義について検討している。</p>			

著者らは先ず、ヒトの皮膚標本を用いて免疫プロット法及び免疫組織染色法で検討したところ、KLK8 は正常皮膚では顆粒層から角層下層に弱い発現しか認められないのに対し、尋常性乾癬では発現が亢進し有棘層上層から角層に明瞭に認められた。この結果はこれまでの報告と合致し、KLK8 の尋常性乾癬病態形成における関与を支持するものである。

次いで、マウスを用いて TPA 塗布実験をおこなった。野生型では TPA 塗布により KLK8 mRNA の発現が 48 時間をピークに 5 倍に増加し、この実験系においても KLK8 が関与していると考えられた。そこで野生型と KLK8 ノックアウトマウスの表皮について TPA 塗布後の変化を比較したところ、Ki67 を指標とした角化細胞の増殖亢進はノックアウトマウスでは野生型の半分程度であったが、角層数の増加は 72 時間を過ぎてからノックアウトマウスで有意に亢進していた。この結果は KLK8 ノックアウトマウスにおいては野生型に比して角化細胞の増殖亢進が低下しているにもかかわらず、角層の肥厚がより顕著になっていることを示している。

さらに、皮膚における TPA 塗布後のプロテアーゼ活性の変化について検討したところ、KLK8 ノックアウトマウスにおける活性上昇の程度は野生型に比して低いものであった。

最後に、角質細胞の相互結合を担っている角層間デスモゾーム構成蛋白についても検討している。角層間接着分子であるコルネオデスモシンとデスマグレインの 2 つのタンパク質について、野生型で観られる TPA 塗布後 48 時間での分解消失は、KLK8 ノックアウトマウスにおいて著明に遅延しており、これが角質細胞の脱落を抑制し角層の肥厚をもたらしていると考えられた。

今回の検討から、KLK8 は表皮ケラチノサイトの増殖に関与するとともに、角層間接着分子を切断することにより、角層の外層を脱落させることで角層の厚みを調節し、表皮の恒常性を維持するよう機能していることが示唆された。

これらの結果は、KLK8 の機能をノックアウトマウスを用いて明確に示したものであり、今後の皮膚病態における関与や他のタンパク質との関連等に関する解析を発展させる上で、価値のある研究と考えられる。

申請者に対して査問を行い、当該分野に関する申請者の知識／経験／見識は課程博士に相応しいものであると判断しました。以上、論文／査問による審査の結果、博士に値すると判定したことを御報告致します。

平成18年2月10日