

## 主 論 文

Expression of serine protease inhibitors in epidermal keratinocytes is increased by calcium but not 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> or retinoic acid

(表皮角化細胞におけるセリンプロテアーゼ阻害因子の発現をカルシウムは増強するが、活性型ビタミンD<sub>3</sub>やレチノイン酸は誘導しない)

### [緒言]

セリンプロテアーゼの発現や機能の異常は、ネザートン症候群やアトピー性皮膚炎、乾癬やしゅさなどの疾患と関与している。カリクレイン関連ペプチダーゼ (KLKs) は、KLK1 から KLK15 までのトリプシン様またはキモトリプシン様の分泌型蛋白であり、第 19 番目の長腕に遺伝子クラスターを形成している。ヒトの皮膚の角化において、KLK5 と KLK7 は細胞接着因子であるデスマグレイン 1 やデスマコリン 1、コルネオデスマシンを基質として作用し、皮膚の表面から角層の剥離を促すと考えられている。

皮膚におけるセリンプロテアーゼ活性は、個々のセリンプロテアーゼと *SPINK5* によってコードされるリンパ上皮 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)、*PI3* によってコードされるエラフィンといったセリンプロテアーゼ阻害因子により厳密に制御されている。

LEKTI はセリンプロテアーゼ阻害因子であり、その配列内に 15 個のセリンプロテアーゼ阻害ドメインを有しており、皮膚や他の臓器に発現している。*SPINK5* の機能喪失変異は魚鱗癬や毛の異常、アトピー症状を特徴とするネザートン症候群でみられる。*SPINK5* の変異を有する個体では、機能性 LEKTI の長さがプロテアーゼ活性、皮膚バリア機能や疾患の重篤度に関与する。モデルマウスにおいて、KLK5 を欠損させれば、ネザートン症候群の表皮機能の回復がみられるため、LEKTI は特に KLK5 との関連が強いのではないかと考えられている。さらに、420K の LEKTI 変異体は、LEKTI 蛋白の分解活性を変化させることで、アトピー性皮膚炎の病態と関与していることが報告されている。

SLPI およびエラフィンは表皮で発現しており、ともに好中球セリンプロテアーゼの有効な阻害剤と考えられている。SLPI は白血球エラスターーゼおよび Cathepsin G ならびに肥満細胞キマーゼを標的とし、KLK7 などのキモトリプシン様プロテアーゼを阻害する。エラフィンはエラスターーゼおよび Proteinase-3 を阻害する。SLPI、エラフィンはともに、好中球セリンプロテアーゼにより引き起こされる損傷から組織を守るために重要であると考えられている。これらのプロテアーゼの発現は正常皮膚では低いが、乾癬などの炎症疾患で上昇がみられる。

セリンプロテアーゼは皮膚疾患において重要な役割を担っており、表皮角化細胞においてセリンプロテアーゼ阻害因子がどのように調整されるかを理解することは重要である。我々はこれまでに、カルシウム、活性型ビタミン D<sub>3</sub>、アシトレチチンが正常ヒト表皮角化細胞において KLK5 と KLK7 の発現を増強することを明らかにしてきた。角化細胞の分化の過程において、カルシウムはデスマソーム、接着帯、タイトジャングションの形成を促進し、またカルシウム受容体を刺激することで角化に必要な細胞間シグナルを誘導する。活性型ビタミン D<sub>3</sub> は、角化細胞において分化を誘導、増殖を抑制し、ビタミン A の代謝産物であるレチノイン酸は角化細胞の増殖を誘導し、角化を調整していると報告されているが、これらの因子がセリンプロテアーゼ阻害因子の発現にどう影響しているかは完全には理解されていない。

今回我々は、表皮角化細胞において、高濃度のカルシウムは LEKTI、SLPI、エラフィンといったセリンプロテアーゼ阻害因子を増強するが、活性型ビタミン D<sub>3</sub> やアシトレチチンは誘導しないことを報告する。今回の結果は、セリンプロテアーゼ活性とその制御機構の解明に貢献すると考えられる。

## **[材料と方法]**

### 細胞培養と刺激

正常ヒト表皮角化細胞 (Normal epidermal keratinocytes; NHEKs) を培養し、カルシウム (0.5–2mM)、活性型ビタミン D<sub>3</sub> (1μM)、アシトレチニン (1μM) を用いて、24 時間から 96 時間刺激した。それぞれ passage 3–8 の細胞を用いて解析を行った。

### リアルタイム PCR と ELISA

mRNAを抽出し、逆転写をしてcDNAとし、リアルタイムPCR法でSPINK5, SLPI, PI3, KLK5, KLK7, FURINの発現量の解析をした。各mRNA発現量はGAPDH発現量との相対値で示し、無刺激のコントロール群とのfold changeを用いて評価した。また、培養上清を回収し、LEKTI, SLPI, エラフィンのタンパク発現量をELISAで測定した。

### 蛍光免疫染色

表皮角化細胞を培養、カルシウム (2mM) で 24 時間刺激し、抗 SPINK5 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いて対比染色を行い、蛍光顕微鏡にて画像の取得を行った。

### プロテアーゼアッセイ

カルシウム (0.5–2mM) で 48 時間刺激した表皮角化細胞の培養上清と蛍光標識基質を反応させ、プロテアーゼ活性を測定した。下記に示す蛍光標識合成ペプチドを基質として測定した。

トリプシン様セリンプロテアーゼ活性：(Boc-Phe-Ser-Arg-MCA)

キモトリプシン様セリンプロテアーゼ活性：(Phe-MCA)

## **[結果]**

### 表皮角化細胞において高濃度のカルシウムは LEKTI、SLPI、エラフィンの発現を誘導する

我々はこれまでに、カルシウム、活性型ビタミン D<sub>3</sub>、アシトレチニンが正常ヒト表皮角化細胞において KLK5 と KLK7 の発現を増強することを明らかにしてきたが、ここでも同様の結果が得られた。(図. 1-d, e) SPINK5, SLPI, PI3 の発現については高濃度のカルシウムによって増強されたが、活性型ビタミン D<sub>3</sub> やアシトレチニンによる刺激では誘導されなかった。(図. 1a–c)

LEKTI はゴルジ体でフリン酵素によって切断され、成熟型、活性型に変換され機能すると考えられているため、FURIN の発現を確認したところ、高濃度のカルシウムの刺激下では発現が増強していた。(図. 1f)

### 表皮角化細胞において高濃度のカルシウムはセリンプロテアーゼ阻害因子を用量、時間依存性に発現を誘導する

0.5mM、1mM、2mM のカルシウムを用いて表皮角化細胞を刺激したところ、リアルタイム PCR で SPINK5, SLPI, PI3 の mRNA 発現は用量依存的に誘導された。(図. 2a, c, e) この用量依存的な誘導は培養上清を用いた ELISA でも確認された。(図. 2b, d, f)

次に 2mM のカルシウムを用いて 96 時間までの刺激を表皮角化細胞に施し、リアルタイム PCR を行ったところ、SPINK5, SLPI, PI3 の mRNA 発現は時間依存的に誘導された。(図. 3a, c, e) この時間依存的な誘導は培養上清を用いた ELISA でも確認された。(図. 3b, d, f)

### 高濃度のカルシウムは表皮角化細胞内において LEKTI の発現を誘導する

表皮角化細胞を 2mM のカルシウムで刺激し、蛍光抗体染色で LEKTI の局在を確認した。無刺激群と比較してカルシウムで刺激した群では、細胞質内で点状に LEKTI の発現が増強された。(図. 4)

## 高濃度のカルシウムは表皮角化細胞内においてトリプシン様セリンプロテアーゼ活性とキモトリプシン様セリンプロテアーゼ活性を調整する

0.5mM、1mM、2mM のカルシウムで表皮角化細胞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様セリンプロテアーゼ活性とキモ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、カルシウムは有意に培養上清中のトリプシン様セリンプロテアーゼ活性を用量依存的に増強したが、キモトリプシン様セリンプロテアーゼ活性については用量依存的に低下した。(図. 5a, b)

### [考察]

皮膚におけるセリンプロテアーゼは、ネザートン症候群やアトピー性皮膚炎、乾癬やしづさなど皮膚疾患の病態において重要な役割を担っているが、その機能や制御機構についてはまだ明らかになっていない部分が多い。そこで今回我々は、表皮角化細胞を用いてセリンプロテアーゼの動態や活性を確認すると同時に、セリンプロテアーゼ阻害因子の発現についても検討した。

我々は過去の報告で、カルシウム、活性型ビタミン D<sub>3</sub>、アシトレチニンが正常ヒト表皮角化細胞においてセリンプロテアーゼである KLK5 と KLK7 の発現を増強することを明らかにしている。今回カルシウム、活性型ビタミン D<sub>3</sub>、アシトレチニンで表皮角化細胞を刺激したところ、セリンプロテアーゼ阻害因子である LEKTI、SLPI、エラフィンの発現について、カルシウムでのみ発現が増強された。

細胞外でのカルシウム濃度の上昇は、細胞内における遊離カルシウム濃度を上昇させ、さらに角化細胞の分化を促進するという過去の報告もあり、今回の我々の実験結果からは、遊離カルシウムが直接的に、または、カルシウムによって誘導される角化細胞の分化過程によって間接的に、角化細胞におけるセリンプロテアーゼ阻害因子の発現を増強する可能性があると考えられた。

過去に我々は、表皮角化細胞において、カルシウムが、メタロ、セリン、システインに対する非特異的基質を用いた実験でプロテアーゼ活性を増強することを報告したが、今回我々は、特異的な基質を用いて、セリンプロテアーゼ阻害因子の発現がセリンプロテアーゼ活性に如何に影響するかについて検討した。カルシウムは有意に培養上清中のトリプシン様セリンプロテアーゼ活性を用量依存的に増強したが、キモトリプシン様セリンプロテアーゼ活性については用量依存的に低下した。リアルタイム PCR や ELISA で、高濃度のカルシウムがセリンプロテアーゼ阻害因子を誘導した一方で、セリンプロテアーゼ活性がこのような傾向を呈したことについて、以下の様に考えた。現在ヒトで報告されている 15 種類の組織カリクレインのうち、表皮では蛋白質レベルでは 8 種類のカリクレインが確認されているが、特に高発現しているのは KLK5 と KLK7 である。KLK5 や表皮で確認されている他のカリクレインはトリプシン様セリンプロテアーゼ活性を呈し、KLK7 のみがキモトリプシン様セリンプロテアーゼ活性を呈する。それゆえ、高濃度のカルシウムによって、KLK5 以外の他のトリプシン様セリンプロテアーゼ活性が誘導された可能性や、未知のトリプシン様セリンプロテアーゼ活性が存在する可能性があるのではないかと考えた。

セリンプロテアーゼ阻害因子の活性化に関してもさらなる追求が必要である。分化した角化細胞の上清中で、フリンの活性化と、LEKTI のフラグメント (42-, 65-, 68-kDa) を検出した過去の報告があるが、今回我々の研究では LEKTI のフラグメントは確認しておらず、カルシウムによる刺激で活性化したフリンが LEKTI を断片化するかについては検討できていない。

今回の我々の研究は、表皮角化細胞において、カルシウムはセリンプロテアーゼ阻害因子の発現を増強するが、活性型ビタミン D<sub>3</sub> やアシトレチニンはそれらを誘導しないことを明らかにした。このことは、正常な皮膚だけでなくアトピー性皮膚炎などの炎症性皮膚疾患におけるセリンプロテアーゼ活性の制御機構の解明に重要であり、その解明のためにさらなる研究が必要である。

### [結論]

表皮角化細胞において、高濃度のカルシウムは LEKTI、SLPI、エラフィンといったセリンプロテアーゼ阻害因子を増強するが、活性型ビタミン D<sub>3</sub> やアシトレチニンは誘導しない。今回の結果は、セリンプロテアーゼ活性とその制御機構の解明に貢献すると考えられる。