



Kallikrein-related peptidase 5 functions in proteolytic processing of profilaggrin in cultured human keratinocytes

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-07-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 坂部, 純一 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/2713

博士(医学) 坂部 純一

論文題目

Jun-ichi Sakabe, Mami Yamamoto, Satoshi Hirakawa, Akira Motoyama, Isao Ohta, Kazuki Tatsuno, Taisuke Ito, Kenji Kabashima, Toshihiko Hibino, Yoshiki Tokura:
Kallikrein-related peptidase 5 functions in proteolytic processing of profilaggrin in cultured human keratinocytes

(カリクレイン関連ペプチターゼ5が培養ヒト角化細胞でのプロフィラグリンのプロセッシングにおいて機能する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

最近、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。しかし、天然保湿因子の基となる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。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。

[材料ならびに方法]

実験におけるヒト組織の使用に関して、浜松医科大学医の倫理委員会において承認を得ている。

実験 1 として 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リクレイン5 (KLK5) を、同定した。実験 2 では、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。次に、実験 3 では、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。実験 4 として、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。

[結果]

実験 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。実験 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。実験 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シングに異常が見られた。実験 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。

[考察]

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。

[結論]

ヒトの生体内において KLK5 は、プロフィラグリンのプロセシングを行い、フィラグリンモノマーを作出するための重要な役割を担っており、正常な表皮バリア機能の維持に寄与していると考えられる。