

# 主論文

## Toll-like receptor signaling induces the expression of lympho-epithelial Kazal-type inhibitor in epidermal keratinocytes

(表皮角化細胞において Toll-様受容体シグナルは lympho-epithelial Kazal-type inhibitor の発現を上昇させる)

### 【緒言】

ヒトカリクレイン関連ペプチダーゼ (KLKs) のうち、KLK5 と KLK7 は表皮が産生する主要なセリンプロテアーゼである。KLK5 はトリプシン様セリンプロテアーゼとしてアルギニンやリジンのカルボキシル基側を切断し、KLK7 はキモトリプシン様セリンプロテアーゼとしてチロシンまたはフェニルアラニンのカルボキシル基側を切断する酵素活性を持つ。表皮においてこれらのプロテアーゼは角質細胞間の接着因子であるデスモグレイン 1、デスモコリン 1、コルネオデスモンシンなどを分解し、落屑を形成して皮膚のバリア機構の破綻につながる。過剰なセリンプロテアーゼ活性は、Netherton 症候群、アトピー性皮膚炎、乾癬、しゅさなど様々な皮膚疾患に関与している。表皮のセリンプロテアーゼ活性は、*SPINK5* にコードされる Lympho-epithelial Kazal-type inhibitor; LEKTI、secretory leukocyte protease inhibitor; SLPI、peptidase inhibitor 3 (*PI3*) によってコードされるエラフィンなどのセリンプロテアーゼ阻害因子によって厳密に調整されている。Netherton 症候群では *SPINK5* のナンセンス変異により LEKTI が欠損ないしは機能不全をきたし、KLK5、KLK7、他の KLK の酵素活性が増し、タンパク分解が亢進するという病態が分かっている。アトピー性皮膚炎においては *SPINK5* の一塩基多型(SNP)である p.K420E 変異によって、LEKTI のプロテアーゼ阻害因子としての機能を変化させると報告されている。

一方で表皮角化細胞には Toll 様受容体 (Toll-like receptors; TLRs) が発現しており、外界由来の微生物に対する生体防御機構として病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) や損傷関連分子パターン (damage-associated molecular patterns; DAMPs) の両方を認識し、炎症性サイトカイン、ケモカイン、および抗菌ペプチドを産生する。TLR は帯状疱疹やしゅさなどの感染および炎症性皮膚疾患において高発現しており重要な役割を果たす。

LEKTI の発現調節メカニズムは、皮膚のプロテアーゼ活性の恒常維持に対する理解と皮膚疾患の病因の解明につながると考え、我々は既にカルシウムが表皮角化細胞において LEKTI の発現を誘導することを報告した。そこで我々は、新たに表皮角化細胞において TLR シグナルが LEKTI の発現を誘導することと、しゅさ、膿皮症、水痘病変において LEKTI の表現が亢進していることを見出した。

### 【材料と方法】

#### 細胞培養と刺激

正常ヒト表皮角化細胞 (normal human epidermal keratinocytes; NHEKs) を培養し、TLR1/2 リガンド (Pam3CSK4)、TLR3 リガンド (poly (I:C))、TLR4 リガンド (lipopolysaccharides (LPS))、TLR5 リガンド (flagellin)、TLR2/6 リガンド (MALP2)、TLR9 リガンド (CpG)を用いて、24-96 時間刺激した。

#### 免疫染色

岡山大学の倫理委員会にて承認を得て (承認番号: 1611-002)、岡山大学病院における水痘、膿皮症、しゅさの患者、および健常人の皮膚サンプルを用いて、LEKTI および KLK5 のポリクローナル抗体で免疫染色を行った。

## PCR と ELISA

NHEKsよりRNAを抽出し、cDNAを作成しreal-time PCRにて*SPINK5*, *SLPI*, *PI3*, *KLK5-8*, *KLK10*, *KLK11*, *KLK13*, *KLK14*の遺伝子発現を解析した。それぞれのmRNAは内在性コントロールであるGAPDH mRNAに対する相対量として算出し、全てのデータは無刺激細胞に対するfold changeで示した。NHEKsの培養上清中のLEKTI、SLPI、エラフィンのタンパク量をELISA法にて測定した。

## プロテアーゼアッセイ

NHEKsの培養上清と蛍光標識基質を24時間反応させプロテアーゼ活性を測定した。トリプシン様セリンプロテアーゼ活性に特異的な基質としてBoc-Phe-Ser-Arg-MCA、キモトリプシン様セリンプロテアーゼ活性に特異的な基質としてMeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-MCAを使用した。

## 【結果】

### 表皮角化細胞においてTLRリガンドによりLEKTIの発現は増加する

TLRリガンドを用いてNHEKsを刺激した。Pam3CSK4、poly(I:C)、flagellin、MALP2は細胞中の*SPINK5*のmRNA発現を誘導した(図. 1a)。培養上清においても同じ4種のTLRリガンドの刺激によって、LEKTIの発現が増加した(図. 1d)。またTLRリガンドは同様にmRNAとタンパクレベルにおいて、SLPIおよびエラフィンの発現も誘導した(図. 1b,c,e,f)。

### 表皮角化細胞においてpoly(I:C)によりLEKTIの発現は用量依存性に増加する

TLR3リガンドであるpoly(I:C)はTLRリガンドの中で最も炎症性サイトカインや抗菌ペプチドを誘導しやすいことが分かっており、LEKTIの誘導も最も顕著であった。Poly(I:C)の刺激によってLEKTIは用量依存性に発現が増加した(図. 2a)。またSLPIおよびエラフィンも同様に用量依存性に発現が増加した(図. 2b,c)。

### 表皮角化細胞においてpoly(I:C)によりセリンプロテアーゼ活性は用量依存性に上昇する

培養上清中のトリプシンおよびキモトリプシン様セリンプロテアーゼ活性を測定した。NHEKsにおいてpoly(I:C)の刺激によって、共に用量依存性に活性が上昇した(図. 3a,b)。

### 表皮角化細胞においてpoly(I:C)によりKLK6、KLK10、KLK11、KLK13の発現が上昇する

KLKファミリータンパクはKLK1からKLK15から成っており、中でもKLK5、KLK6、KLK7、KLK8、KLK10、KLK11、KLK13、およびKLK14がヒト正常皮膚に発現している。NHEKsにおいてpoly(I:C)はセリンプロテアーゼ活性を著明に誘導したので、次に細胞内のKLKsの発現を解析した。Poly(I:C)は*KLK6*、*KLK10*、*KLK11*、および*KLK13*のmRNA発現を誘導した一方で(図. 4a-d)、*KLK5*、*KLK7*、および*KLK8*のmRNA発現は変化しなかった(図. 4e-g)。

### 様々な皮膚疾患においてLEKTIは高い発現を示す

TLRシグナルによってLEKTIの発現が誘導されることがin vitroで示されたため、次に感染および炎症性の皮膚疾患におけるLEKTIの発現を調べた。正常皮膚においてLEKTIは主に表皮の顆粒層に限局して発現する分泌タンパクである。免疫染色では急性ウイルス感染症である水痘、慢性の皮膚細菌感染症である膿皮症、TLR2が亢進しているしゅさの病変部では表皮全層にLEKTIが高発現を示した(図. 5a-d)。さらに正常皮膚に比べ水痘においてKLK5は高発現を示した(図. 5e, f)。

## 【考察】

皮膚バリア障害とそれに関連した表皮の炎症を伴う様々な皮膚疾患においてタンパク分解経路が乱れており、その解明が急がれる。Netherton 症候群とアトピー性皮膚炎の病変部ではセリンプロテアーゼ活性が異常に上昇していることが知られている。皮膚において LEKTI は、KLK5 および KLK7 の主要な阻害因子である。我々は初めて、TLR シグナルが表皮角化細胞において LEKTI の発現を誘導することを発見した。Poly (I:C)を介した TLR3 シグナルは抗ウイルス活性を亢進させることが分かっている。我々は既に、ヘルペス性水疱周囲の表皮角化細胞において TLR3 を始めとするウイルス由来の dsRNA センサーおよびカテリシジン抗菌ペプチドである LL-37 が増加していることを報告している。

Poly (I:C)を介した TLR3 シグナルは、表皮の構造に関わるいくつかの遺伝子の発現に変化をきたす。我々の研究では、NHEKs において poly (I:C)により阻害因子である LEKTI の発現が上昇し、プロテアーゼ活性も同様に上昇した。プロテアーゼの発現についても解析を行うと、KLK5、KLK7、または KLK8 は変化がなく、KLK6、KLK10、KLK11、および KLK13 は上昇したため、トリプシン様セリンプロテアーゼ活性の上昇を反映していると考えた。一方で、TLR シグナルは KLK7 以外のキモトリプシン様セリンプロテアーゼ活性を上昇させるのかもしれない。

TLR は微生物センサーとして発見された。微生物が皮膚のプロテアーゼの機能に影響を与えることが分かっている。黄色ブドウ球菌やプロピオニバクテリウム属アクネ菌は KLK の発現およびセリンプロテアーゼ活性を上昇させると報告されている。我々は感染および炎症性皮膚疾患において LEKTI が高発現していることを示した。水痘は水痘・帯状疱疹ウイルスの初感染によって発症する急性ウイルス感染症であり、水痘・帯状疱疹ウイルスは多くの KLK 遺伝子の発現を調整すると報告がある。我々は既に単純ヘルペス病変部において TLR3 が高発現していることを報告している。水痘・帯状疱疹病変部においてもウイルスに対する TLR3 応答が活性化し水痘の病変部で TLR3 および LEKTI の発現が増加しているものと考えられる。しゅさは TLR2 および KLK5 が病態に関与している炎症性皮膚疾患であり、TLR2 シグナルにより LEKTI が誘導されていると考えられる。膿皮症は再発性の感染性皮膚疾患であり、病原微生物に長期間さらされており、TLR2 と TLR4 が関与している可能性がある。膿皮症で LEKTI が増加する機序についてはさらなる研究が必要である。Netherton 症候群の患者で再発性ヘルペス感染症を認めた報告があるように、Netherton 症候群は皮膚バリア障害と免疫異常をきたすため、ヘルペスウイルス感染症が重症化することがある。Netherton 症候群の患者は細菌感染症にもかかりやすく、異常なセリンプロテアーゼの増加をもたらしているものと考えられる。一方でアトピー性皮膚炎、乾癬、しゅさなど炎症性皮膚疾患では、セリンプロテアーゼ活性が上昇していることが既に報告されている。セリンプロテアーゼ阻害因子は、炎症後に上昇したプロテアーゼ活性を制御するために重要と考えられる。表皮角化細胞においてセリンプロテアーゼとその阻害因子によってセリンプロテアーゼ活性が TLR シグナルによって制御されるメカニズムについて解明するためにはさらなる研究が必要である。

## 【結論】

TLR シグナルは表皮角化細胞において LEKTI の発現を上昇させた。LEKTI を始めとするセリンプロテアーゼ阻害因子は、炎症性の皮膚疾患における異常なセリンプロテアーゼ活性の制御に関与していることが示唆される。