

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	井 川 哲 子
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Incomplete KLK7 secretion and upregulated LEKTI expression underlie hyperkeratotic stratum corneum in atopic dermatitis</p> <p>(アトピー性皮膚炎皮疹部の過角化を伴う鱗屑形成には KLK7 の不完全な分泌と LEKTI の発現亢進が関与している)</p> <p>共 著 者 名</p> <p>岸部 麻里、堀 仁子、本間 大、辻村 久、石川 准子、 藤村 努、村上 正基、山本 明美</p> <p>Journal of investigative dermatology 投稿中</p> <p>研 究 目 的</p> <p>アトピー性皮膚炎(Atopic dermatitis, AD)は慢性の炎症性皮膚疾患だが、近年小児はもちろん成人でも寛快せず長期間皮疹が持続する例が増加している。そのような例の病理組織では正常とは異なる角層の肥厚がみられ、これは角層の剥離異常を示唆する。角層の剥離には角層内の細胞接着構造である corneodesmosome (CD)の細胞外構成成分である desmoglein 1 (Dsg1)、corneodesmosin (Cdsn)、desmocollin 1 (Dsc1)が順序よく分解されることが重要で、多くのプロテアーゼやその阻害剤がその分解に関する(引用文献 1)。我々はこれまで、これらの構成成分の分解過程を免疫電顕(参考文献 1)や、テープで剥離した角層に免疫染色を施すこと(参考文献 2)で観察してきた。正常では角層最上層では CD 構成因子は角質細胞の辺縁のみに存在する(参考文献 1)。</p> <p>カリクレイン(Kallikrein-related peptidase, KLK) 7は層板顆粒から分泌されるセリンプロテアーゼの一種で Dsc1 と Cdsn を直接分解し、AD 皮疹部ではその発現や活性が亢進すると報告されている(引用文献 2)。一方我々は AD 皮疹部で CD 構成成分が角質細胞の表面全体に発現し、CD 分解の阻害が示唆されることを報告しており(参考文献 2)、先に述べた KLK7 活性の上昇との間に矛盾が生じていた。</p>			

今回われわれは、この矛盾を解消すべく、AD 皮疹部でみられる過角化の機序の解明を試みた。その結果、AD 皮疹部で KLK7 の発現は亢進しているが、層板顆粒からの分泌が不完全であること、またその阻害剤である Lympho-epithelial Kazal-type-related inhibitor (LEKTI) の発現亢進を確認した。また、これまでより生理的な手法で KLK の活性を測定したところ、AD 皮疹部の KLK 活性は正常角層と有意な差は見られなかった。

材 料 ・ 方 法

角層検体採取、角層水分量、経表皮水分蒸散量 (transepidermal water loss, TEWL) 測定

文書による同意を得たのち、AD 患者の皮疹部 (AD lesion: 11 例)、治療中で軽度に湿疹病変が残る部位 (AD under treatment: 6 例)、無疹部 (AD nonlesion: 11 例)、正常コントロールとして AD の既往のないボランティア (normal control: 11 例) から、粘着テープを用いて角層検体を採取した。同時に、角層水分量と TEWL も併せて計測した。

免疫染色

診断目的で得られた AD lesion 及び normal control 検体はホルマリン固定後包埋した。テープ剥離で得た角層検体は未固定で使用した。一次抗体として抗 Dsg1 抗体、抗 Dsc1 抗体、抗 Cdsn 抗体、抗 KLK7 抗体、抗 LEKTI 抗体を用いた。二次抗体で染色後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察、撮影した。テープ剥離角層の Cdsn 免疫染色像を用いて、角質細胞表面の染色パターンを過去の報告にならい (参考文献 2)、peripheral, dense diffuse, sparse diffuse, partial diffuse の 4 種に分類し、AD lesion と normal control の染色パターンの比率を百分率で表した。また、テープ剥離検体の Dsg1 免疫染色像から角質細胞の面積を計測した。

通常電顕及び免疫電顕

文書による同意を得て採取した normal control 及び AD lesion 検体を通常電顕は 'half-strength' Karnovsk 固定液、四酸化オスミウムで、免疫電顕は 2% パラフォルムアルデヒドで固定後包埋した。免疫電顕は一次抗体に抗 KLK7 抗体を用い post-embedding 法で行った。KLK7 の層板顆粒からの分泌を観察するため、最深部の角質細胞 (SC1) を、細胞外、細胞質内、空胞内の 3 か所に分け、角質細胞の表面の長さ 5 μ m を 1 区画としてそれぞれの部位にある KLK7 を標識した金コロイドの数を計測した。

Western blotting

診断目的で得られた AD lesion 及び normal control 検体はディスペーゼで表皮を分離した。テープ剥離で得られた角層検体は、テープごとトルエンにつけてテープと粘着剤を除去した。それぞれの検体から抽出したたんぱくを電気泳動で分離し、Cdsn、KLK7、LEKTI の発現を確認した。

In situ zymography

テープ剥離角層検体に蛍光標識がついたカゼインを反応させ、KLK 阻害剤のあるなしで

その角質細胞表面積当たりの輝度を求めた。阻害剤のないものから阻害剤のあるものの輝度を差し引いた差を KLK の活性として比較検討した。

天然保湿因子計測

テープ剥離角層検体を用い HLPC/MS で角層中のアミノ酸総量、2-pyrrolidone-5-carboxylic acid (PCA)、urocanic acid (UA)を天然保湿因子として計測、角層中のタンパク総量との比で標準化した。

統計学的解析

AD lesion と normal control 群で、年齢、性別、テープ剥離検体採取時の室温、湿度に有意差がないことを確認し、KLK 活性について Welch の *t* 検定で解析を行った。

AD lesion と normal control それぞれの角質細胞で、Cdsn が dense diffuse パターンを示す割合を目的変数として、Cdsn 分解阻害に関する説明変数の候補に角層中のアミノ酸総量、PCA、UA、角質細胞表面積、年齢、性別、角層水分量、TEWL、KLK 活性を用いて重回帰分析を行い、 $P < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。

成 績

AD 皮疹部角層では CD 分解に異常がある

テープ剥離角質細胞において CD 構成因子である Dsg1, Dsc1, Cdsn の分布を免疫染色で調べた結果、AD lesion の角質細胞表面全体に 3 者とも密な分布がみられ、この異常な分布は湿疹病変の改善に伴い正常に近づくことも判明した。通常電顕でも形態学的に AD lesion 角層最上部での異常な CD 残存を確認した。Western blotting による解析で AD lesion では角層中の Cdsn 分解パターンが正常と異なることが判明した。重回帰分析からは Cdsn の分解阻害に寄与する因子は AD lesion では TEWL 高値、角層水分量の低下、KLK 高活性だった。

In situ zymography を用いた AD 角層中の KLK 活性は正常と有意な差がない

従来より生理的な KLK 活性測定法として、テープ剥離検体を用いた *in situ* zymography を行い、KLK 特異的阻害剤添加の有無で生じる輝度の差を定量化し比較した結果、AD lesion 角層中の KLK 活性は normal control と有意な差がなかった。

AD 角層では KLK7 の角質細胞間への分泌が不完全である

通常電顕では AD 角層において、層板顆粒の分泌不全による角質細胞内の空胞を認める。免疫電顕を用いて AD と正常で SC1 の 3 領域における KLK7 の分布を確認したところ、AD 角層では正常に比べ多くの KLK7 が角質細胞質内や空胞内に取り残されていた。しかし、KLK7 の 60%以上は細胞外に分泌されていた。

AD 角層では KLK7、LEKTI 両方の発現亢進がある

上述の結果から、角層剥離が遅延する理由として、角質細胞外の KLK7 活性を阻害する LEKTI の発現が AD では高まっている可能性を考え、AD lesion と normal control で比較

した。免疫染色では AD で KLK7、LEKTI ともに発現が亢進し、正常と同様 LEKTI の後に KLK7 が発現する順序は保たれていた。また、AD lesion と normal control 表皮を用いた western blotting でも AD で KLK7、LEKTI ともに発現が亢進していた。

考 案

今回の検討で、AD 皮疹部角層では CD 分解の阻害があり、KLK7 の層板顆粒からの分泌不全、KLK7 の活性を阻害する LEKTI の発現亢進が関与していると考えた。近年、頭皮の鱗屑でも CD 分解の阻害とセリンプロテアーゼ及びその阻害剤の発現亢進が報告されており(引用文献 3)、セリンプロテアーゼとその阻害剤の不均衡を伴う CD の分解不全は AD 以外にもひろく鱗屑形成の機序への関与が示唆される。さらに、AD 角層では層板顆粒の分泌が不十分なため角質細胞内にとどまる KLK7 の割合が正常より高いため、その高発現にも関わらず、CD 分解に寄与する KLK7 が不十分な可能性が示唆された。

結 論

AD 皮疹部角層では CD の分解阻害により過角化がみられる。これは、CD の分解に関与する KLK7 が、その高発現にもかかわらず、阻害剤である LEKTI の高発現や、KLK7 自体の分泌不全によって、十分に活性を発揮できていないことが一因と考えられた。

引 用 文 献




1. Ishida-Yamamoto A. et al., Order and disorder in corneocyte adhesion. J Dermatol. 2011. 38(7): p.645-54.
2. Voegeli R. et al., Increased stratum corneum serine protease activity in acute eczematous atopic skin. Br J Dermatol, 2009. 161(1): p.70-7
3. Singh B., et al., Retention of corneodesmosomes and increased expression of protease inhibitors in dandruff. Br J Dermatol. 2014. 71(4): p.760-70.

参 考 文 献

1. Igawa S. et al., Tight junctions in the stratum corneum explain spatial differences in corneodesmosome degradation. Exp Dermatol. 2011. 20(1): p.53-7.

2. Igawa S. et al., Aberrant distribution patterns of corneodesmosomal components of tape-stripped corneocytes in atopic dermatitis and related skin conditions (ichthyosis vulgaris, Netherton syndrome and peeling skin syndrome type B). *J Dermatol Sci.* 2013. 72(1): p.54-60.

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	井川 哲子
審査委員長 小林 博也  審査委員 原 保明  審査委員 藤井 聡 			
学 位 論 文 題 目 Incomplete KLK7 secretion and upregulated LEKTI expression underlie hyperkeratotic stratum corneum in atopic dermatitis アトピー性皮膚炎皮疹部の過角化を伴う鱗屑形成には KLK7 の不完全な分泌と LEKTI の発現亢進が関与している 掲載雑誌 Journal of investigative dermatology, 2016 accepted			
<p>【目的】アトピー性皮膚炎(AD)では角層が肥厚し剥離の異常が示唆される。角層の剥離に必要なのは角層の細胞接着構造であるコルネオデスモソーム(CD)の構成成分(デスマoglein 1 :Dsg1、コルネオデスモシン:Cdsn、デスマコリン 1:Dsc1)の正しい分解である。カリクレイン(KLK)7はADでの高発現が知られる剥離に関するプロテアーゼの一種で、Lympho-epithelial Kazal-type-related inhibitor (LEKTI)がその活性を阻害する。今回はADの過角化の機序解明のため剥離に関するこれらのタンパクについて検討した。</p> <p>【方法】AD病変部、回復期、無疹部、正常皮膚各群からテープ剥離した角層で、Dsg1, Dsc1, Cdsnの免疫染色とKLKの<i>in situ</i> zymographyを行った。正常とAD病変部生検検体で、透過電顕、KLK7の免疫電顕、KLK7、LEKTIの免疫染色とウエスタンブロッティング法で発現レベルを検討した。</p>			

【結果】免疫染色で、AD 病変部で Dsg1, Dsc1, Cdsn は角質細胞表面全体に分布しこの異常な分布は病変改善に伴い正常に近づいた。透過電顕で AD 病変部の層板顆粒分泌障害を認めたため層板顆粒からの KLK7 の角質細胞外への分泌も阻害されると仮定し、角質細胞外の KLK 活性測定を目的に *in situ* zymography を行った結果、病変部の KLK 活性は正常と有意差がなかった。免疫電顕で KLK7 の角層内分布を確認すると、AD 病変部では正常より多くの KLK7 が角質細胞内に留まっていたが、その半分以上は細胞外に分泌されていた。以上より、AD の CD 分解異常の理由として角質細胞外の KLK7 活性を阻害する LEKTI 発現の変化の可能性を考え免疫染色とウェスタンブロッティングを行った結果、AD では正常より KLK7、LEKTI ともに高発現していた。

【結論】AD 病変部では CD 分解に関する KLK7 が高発現するが、それ自体の分泌不全や阻害剤の LEKTI の高発現で十分に活性化せず CD 分解不全から過角化へ至ると考えられた。

本論文は国際的に高い評価を受けている、*J Investigative Dermatology* 誌にアクセプトされ、その内容は独創的で、データ解析も十分なされていた。論文提出者は各審査委員の当該論文及び関連領域に関する質問に的確に答え、十分な知識を有することが確認された。以上より当審査委員会は、本論文が博士（医学）の学位に値するものと判断した。