

# タンパク質分解酵素を応用した新しい皮膚代謝促進治療薬の開発

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻 生命医科学講座 口腔病態薬理学分野

筑波 隆 幸

Cathepsin E is an endolysosomal aspartic proteinase predominantly expressed in immune related cells. In our previous study, cathepsin E-deficient mice displayed atopic dermatitis. In addition, macrophages derived from cathepsin E-deficient mice showed an accumulation of the lysosomal membrane sialoglycoproteins, LAMP-1 and LAMP-2, and, consequently, an elevation in lysosomal pH. However, the molecular mechanism by which cathepsin E deficiency causes atopic dermatitis remains unclear. In this report, we demonstrate that cathepsin E-deficient macrophages showed an increased reactive oxygen species production and up-regulation of oxidized peroxiredoxin-6, but decreased antioxidant glutathione. Moreover, cathepsin E-deficient macrophages displayed higher sensitivity to cell death by oxidative stress treated with  $H_2O_2$  and paraquat. Higher-sensitivity of cathepsin E-deficient macrophages to infection with *Staphylococcus aureus* was observed. These results indicate that cathepsin E deficiency causes increased oxidative stress, suggesting that these abnormalities in cathepsin E-deficient cells are presumably involved in the abnormal host defense of these mice.

## 1. 緒 言

アトピー性皮膚炎の有病率は年々増加してきており、現代社会において国民病といっても過言ではない。2001年および2002年に行われた厚生労働省の調査では、小学生の実に11%がアトピー性皮膚炎に罹患していると報告された。しかしながら、同疾患は遺伝的要因と環境的要因が複雑に影響するため、分子メカニズムは良く分かっていないのが現状である。

我々は、偶然にもアトピー性皮膚炎の発症にはプロテアーゼ（タンパク質分解酵素）であるカテプシンEが、アトピー性皮膚炎発症に関与している事を見出した<sup>1, 2)</sup>。カテプシンEは動物細胞に存在するアスパラギン酸プロテアーゼの一種であり、免疫担当細胞や皮膚上皮細胞など細胞特異的に存在する。我々はカテプシンEのノックアウトマウスを作製したところ、このマウスがアトピー性皮膚炎様症状を呈した<sup>1)</sup>。すなわち、引っ掻き行動を繰り返し、顔面、頸部、背部にアトピー性皮膚炎様症状を呈するようになる。病理組織学的解析では、表皮の肥厚と皮下組織への細胞浸潤が認められた。さらに、血清学的解析でも高好酸球血症と高IgE血症が認められた。

この分子メカニズムを解明するために、我々は野生型およびカテプシンEのノックアウトマウス由来のマクロファージを使って比較解析を行ったところ、リソソーム膜タンパク質の蓄積が起こっている事を見出した<sup>3, 4)</sup>。さらに最

近、カテプシンEのノックアウトマクロファージでは酸化ストレスの上昇している可能性を示唆するデータを得た。そこで本研究では、カテプシンEをターゲットにした創薬研究に応用するため、マウスおよびマクロファージで酸化ストレスが関与しているのかどうかの基礎的研究を行った。

## 2. 実 験

### 2. 1 マウス

カテプシンEのノックアウトマウスはスピードコンジェニックによりC57BL/6に99.5%以上遺伝的背景が同じマウスを用いた<sup>1~4)</sup>。また野生型マウスはC57BL/6マウスを用いた。

### 2. 2 腹腔マクロファージの調製

実験には8~12週齢のマウスを4.0%のチオグリコレートを腹腔内投与した方法<sup>3)</sup>を用いた。投与3.5日後に赤血球溶解バッファーで腹腔内を洗浄しながらマクロファージを採取した。採取後、10%牛胎児血清、100U/mLペニシリンおよび100 $\mu$ g/mLストレプトマイシン含有RPMI-1640培地にて37℃で培養した。

### 2. 3 二次元電気泳動法

二次元電気泳動法は以前報告した方法で行った<sup>3)</sup>。簡単に述べると、細胞抽出液をIPGストリップに掛け、マルチフォーア-IIを用いて等電点電気泳動を行った。その後、ストリップを15分間6M urea, 30% glycerol, 1% SDS, and 64 mM dithiothreitol 含有50 mM Tris-HClバッファー、pH8.8で平衡化した後、更に135mM iodoacetamideを含む同バッファーに15分間浸漬した。その後、10% SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。泳動後、銀染色でタンパク質を染色した。切り出されたタンパク質はマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析



Development of a novel therapeutic application for allergic skin diseases using intracellular proteases

Takayuki Tsukuba

Department of Dental Pharmacology, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University

機（島津製作所製）で解析した。タンパク質の同定にはマスコットサーチエンジン（マトリクスサイエンス社製）を用いて行った。

### 3. 結果

#### 3.1 二次元電気泳動の解析による変動するタンパク質の同定

我々は野生型およびカテプシンEのノックアウトマウス由来のマクロファージにおける細胞内のタンパク質を比較する目的で、両細胞の抽出液について二次元電気泳動を行った。図1に示すように、野生型に比べてカテプシンEノックアウトマクロファージでは約38kDaのタンパク質のスポットが増加していた。さらに約31kDaのタンパク質に関して、酸性側のスポットが増加していたが塩基性側のスポットが消失していた（図1A）。これらのタンパク質に関してプロテオーム解析を行ったところ、それらのN末端アミノ酸配列から38kDaのタンパク質はアネキシンA1であり、31kDaの増加、減少しているタンパク質は、両者共にペルオキシレドキシン-6であることが分かった（図1A）。

ペルオキシレドキシン-6は細胞内で抗酸化タンパク質として機能し、還元型と酸化型として存在することが知られている。そこで、同定されたタンパク質が還元型および

酸化型のペルオキシレドキシン-6である事を精査するため、マクロファージに過酸化水素（25 $\mu$ M）を37℃、20時間マクロファージを培養して、細胞抽出液を二次元電気泳動で比較した。両タンパク質スポットを比較すると、還元型ペルオキシレドキシン-6が酸化型へ移行している事が確認された（図1B）。以上の結果より、カテプシンEのノックアウトマクロファージでは、アネキシンA1と酸化型ペルオキシレドキシン-6が増加し、還元型ペルオキシレドキシン-6が減少している事が明らかになった。

#### 3.2 酸化ストレス関連分子の解析

アネキシンA1はストレスタンパク質の一種として知られており、さらにペルオキシレドキシン-6は細胞内で抗酸化ストレスタンパク質として機能する。これらの事実から、カテプシンEノックアウトマクロファージは酸化ストレスを受けているために、これらのタンパク質が増加している可能性が考えられた。

そこで、酸化ストレスに関連する分子について解析を行った。細胞内のスーパーオキシド（O<sup>2-</sup>）、及び過酸化水素（H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）を定量すると、有意に野生型に比べカテプシンEノックアウトマクロファージで多量に存在した（図2AおよびB）。

他方、還元物質の量を定量した。細胞内に最も多量に存

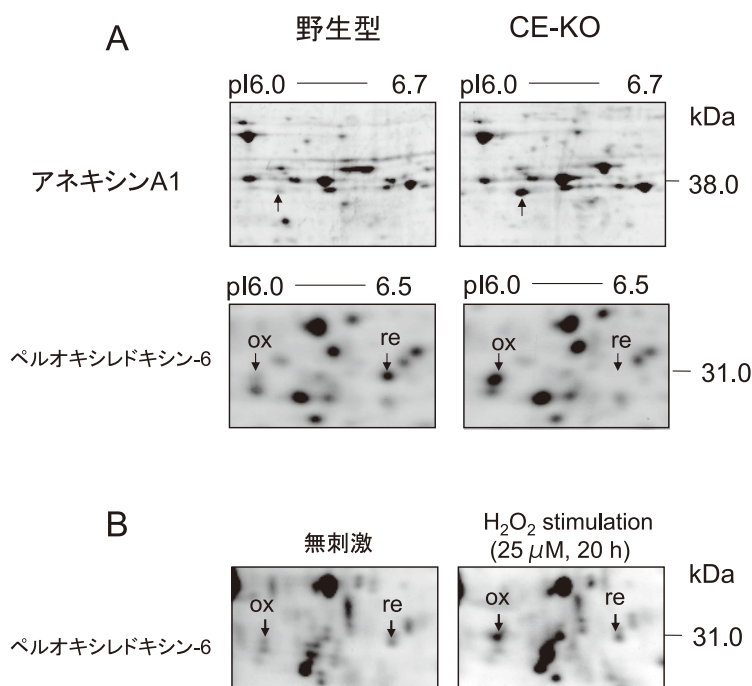


図1

A：野生型およびカテプシンEのノックアウトマウスマクロファージの二次元電気泳動像  
 （上段）カテプシンEのノックアウトマウスでアネキシンA1が増加している  
 （下段）カテプシンEのノックアウトマウスで還元型ペルオキシレドキシン-6が増加し、酸化型ペルオキシレドキシン-6が減少している。  
 B：野生型マクロファージの過酸化水素による変動

在する還元物質はグルタチオンである。そこで、還元型グルタチオン (GSH) を定量すると、逆にカテプシンEノックアウトマクロファージでは有意に減少している事が明らかになった (図2C)。

生体内でも酸化ストレスの影響が観察されるのかどうか、マウスの血清に関して検討した。過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) を定量すると、野生型に比べカテプシンEノックアウトマウスで有意に多量に存在した (図2D)。これ等の結果より、生体及び細胞レベルにおいて、カテプシンEが欠損すると酸化ストレスが起こる事が示唆された。

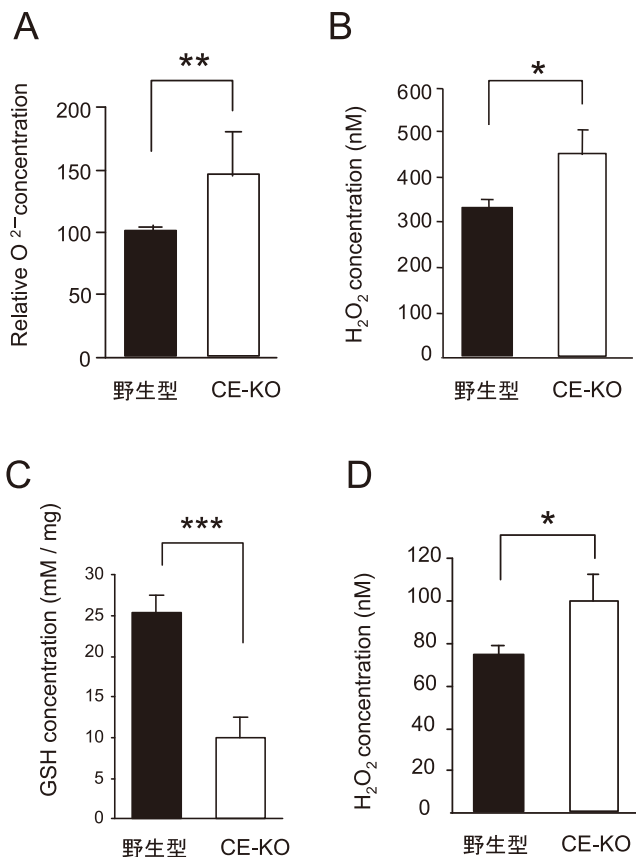


図2

- A: 野生型およびカテプシンEのノックアウトマウスマクロファージの細胞内スーパーオキシド ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) 量。両マクロファージをザイモサン刺激後、ケミルミネッセンス反応で計測した。
- B: 野生型およびカテプシンEのノックアウトマウスマクロファージの過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 量。両細胞を24時間培養後、Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kitで定量した。
- C: 野生型およびカテプシンEのノックアウトマウスマクロファージの還元型グルタチオン (GSH) 量。マクロファージの細胞抽出液を合成基質 DTNB と反応後、吸光度 420nm で測定し、算出した。
- D: 野生型およびカテプシンEのノックアウトマウスの血清中の過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 量。両マウス血清を24時間培養後、Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kitで定量した。

### 3.3 酸化ストレスによる細胞死の影響

もしカテプシンEノックアウトマクロファージにおいて、細胞内で酸化ストレスが上昇しているならば、同細胞は酸化ストレス刺激に対する感受性も上昇していることが考えられる。この事を確かめるために、野生型およびカテプシンEノックアウトマクロファージにおいて活性酸素種による刺激に対する細胞死の影響について検討した (図3)。両マクロファージに過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (0 ~ 200  $\mu\text{M}$ ) とミトコンドリア依存性酸化ストレス誘導剤であるパラコート (0 ~ 2000  $\mu\text{M}$ ) を加えた後、37°C 24時間でインキュベシ

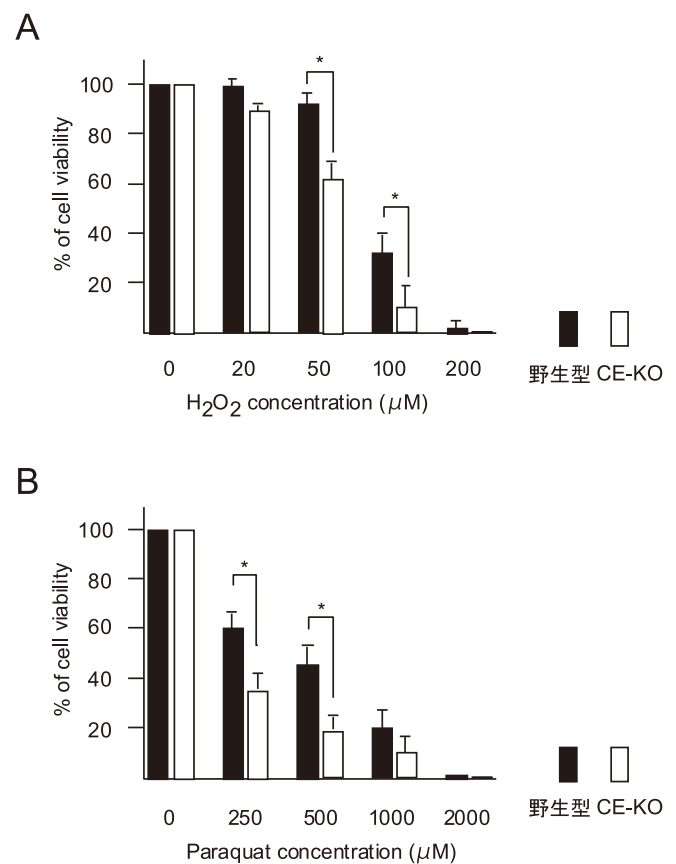


図3

- A: 野生型およびカテプシンEのノックアウトマウスマクロファージの過酸化水素による細胞生存率。両マクロファージに過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (0 ~ 200  $\mu\text{M}$ ) 37°C、24時間でインキュベーションし、Cell counting kit-8を用いて細胞生存率を算定した。
- B: 野生型およびカテプシンEのノックアウトマウスマクロファージのパラコートによる細胞生存率。両マクロファージにミトコンドリア依存性酸化ストレス誘導剤であるパラコート (0 ~ 2000  $\mu\text{M}$ ) を37°C、24時間でインキュベーションし、Cell counting kit-8を用いて細胞生存率を算定した。

ョンし、Cell counting kit-8 (同仁化学) を用いて細胞生存率を算定した (図3 A 及びB)。野生型に比べ、カテプシンEノックアウトマクロファージは、過酸化水素50および100  $\mu$ Mで、パラコートは250および500  $\mu$ Mの濃度で統計学的に有意に高い細胞死を起こす事が分かった。従って、カテプシンEノックアウトマクロファージは、酸化ストレスに対して高い感受性を持つ事が示され、細胞内酸化ストレスを受けている事がこの実験でも確認された。

### 3. 4 黄色ブドウ球菌による細胞死の影響

アトピー性皮膚炎患者は黄色ブドウ球菌に対する感受性が高いため、皮膚炎が起こる事が知られている。そこでカテプシンEノックアウトマクロファージが野生型に比べて細胞死を起こしやすいのか否かについて検討を行った。マクロファージと黄色ブドウ球菌の比率を1:100で37℃30分間貪食させた後、1~4時間インキュベーションし、Cell counting kit-8を用いて細胞生存率を算定した (図4)。処理後4時間の野生型のマクロファージが80%以上生存していたのに対して、カテプシンE欠損マクロファージでは生存率が有意に減少しており、65%しか生存していなかった。これらの結果から、カテプシンEノックアウトマクロファージは、黄色ブドウ球菌感染による生存率も減少している事が分かった。

## 4. 考 察

本研究では、免疫担当細胞であるマクロファージを用いて、野生型およびカテプシンEのノックアウトマウスの細

胞内のタンパク質を比較した。変動する分子として同定したのは、アネキシンA1とベルオキシレドキシン-6であり、特に後者に関しては酸化型が増加し、還元型が減少していた。従って、カテプシンEノックアウトマクロファージは酸化ストレスを受けている可能性が推測された。事実、カテプシンEノックアウトマクロファージでは活性酸素種であるスーパーオキシド ( $O_2^{\cdot -}$ )、及び過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) が有意に増加し、逆に還元物質であるグルタチオンは有意に減少していた。また、酸化ストレス刺激である過酸化水素とパラコート処理を行ったところ、カテプシンEノックアウトマクロファージはいずれも低濃度で細胞死を起こした。また、アトピー性皮膚炎発症の原因菌の1つである黄色ブドウ球菌に対して、カテプシンEノックアウトマクロファージは低濃度で細胞死を起こした。このような結果から、カテプシンEノックアウトマクロファージは、酸化ストレスを受けているために様々な異常を惹起していると考えられる。

では、なぜカテプシンE欠損が酸化ストレスを引き起こすのであろうか。我々は、酸化ストレスの直接的原因の1つとして、カテプシンEノックアウトマクロファージでは、オートファジー不全とそれに伴うミトコンドリアの代謝不全を起こしている事を見出している。オートファジーは体内の不要なタンパク質をリソソーム系で分解する生理反応であり、古くなったミトコンドリア等のオルガネラは、このメカニズムで除去される。従って、カテプシンE欠損により、リソソーム分解能が低下し、そのためにオートファジーによる古くなったミトコンドリアが除去されないために、酸化ストレスが上昇している可能性が高い。

一方、カテプシンEノックアウトマウス由来の血清中でも過酸化水素レベルが上昇していたことから、個体レベルでも酸化ストレスが上昇している可能性が示唆された (図2 D)。興味深い事に、酸化ストレスの上昇とアトピー性皮膚炎の発症には、相関関係があることは多くの研究で示唆されている (総説参照5)。従って、本研究で示したように、カテプシンE欠損が、酸化ストレスの上昇をもたらし、酸化ストレスの上昇がアトピー性皮膚炎の発症の原因となっている可能性が高いと考えられる。

## 5. 総 括

カテプシンEの欠損により、細胞レベルでの酸化ストレスの上昇が認められた。この酸化ストレスは個体レベルでも同様に認められることから、酸化ストレスの上昇が、アトピー性皮膚炎の発症に関連するのではないかと考えられる。本研究で得た知見が、今後アトピー性皮膚炎治療薬への分子基盤になる事を期待したい。

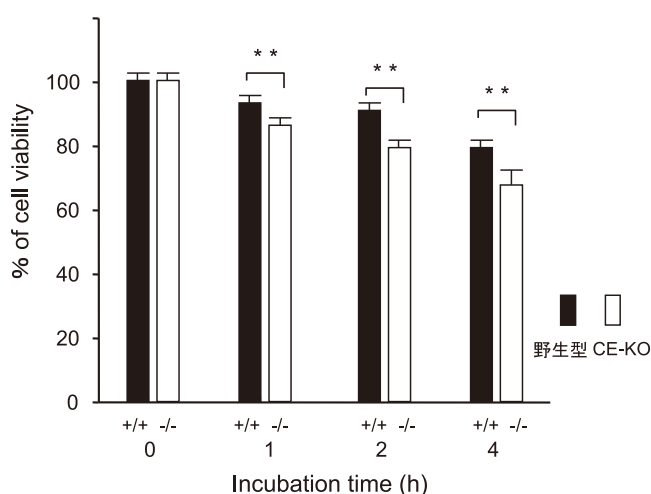


図4 野生型およびカテプシンEのノックアウトマウスマクロファージの黄色ブドウ球菌取り込み後の細胞生存率。両マクロファージと黄色ブドウ球菌の比率を1:100で37℃、30分間貪食させた後、1~4時間インキュベーションし、Cell counting kit-8を用いて細胞生存率を算定した。



(参考文献)

- 1) Tsukuba T, Okamoto K, Okamoto Y, et al:  
Association of cathepsin E deficiency with development  
of atopic dermatitis. J. Biochem. 134, 893-902, 2003
- 2) Tsukuba T, Yamamoto S, Yanagawa M, et  
al : Cathepsin E-deficient mice show increased  
susceptibility to bacterial infection associated with the  
decreased expression of multiple cell surface Toll-like  
receptors. J. Biochem. 140, 57-66, 2006
- 3) Yanagawa M\*. Tsukuba T\*. Nishioku T, et  
al: Cathepsin E deficiency induces a novel form  
of lysosomal storage disorder in macrophages  
showing the accumulation of lysosomal membrane  
sialoglycoproteins and the elevation of lysosomal  
pH. J. Biol Chem. 282, 1851-1862, 2007 \*Both authors  
contributed equally to this work
- 4) Kakehashi H, Nishioku T, Tsukuba T, et al :  
Differential regulation of the nature and functions of  
dendritic cells and macrophages by cathepsin E. J.  
Immunol. 179, 5728-5737, 2007.
- 5) Okayama Y: Oxidative stress in allergic and  
inflammatory skin diseases. Curr Drug Targets  
Inflamm Allergy. 4, 517-519. 2005 (Review)