HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	表皮水疱症患者における表皮関連ケモカインの解析［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	氏家, 韻欣
Description	配架番号：2330
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12808号
Issue Date	2017-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/66916
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Inkin_Ujiie_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　氏家韻欣

学 位 論 文 題 名

表皮水疱症患者における表皮関連ケモカインの解析
（Analysis on epidermis-related chemokines in epidermolysis bullosa）

【背景と目的】　表皮水疱症は先天的な遺伝子異常により、表皮真皮境界部の基底膜タンパクが異常ないし欠損することで生じる疾患である。これにより皮膚が脆弱となり、容易に水疱、びらん、潰瘍を形成する。本症は臨床像や責任遺伝子などから 30 種類以上に分類されており、比較的軽微なものから死に至る可能性のある最重症型までである。しかし、現時点ではガーゼや軟膏などの対症療法が主であり、根治的治療法として確立された治療法は未だ無い。

近年、骨髄移植などの細胞療法が根治的な治療法になり得るとして、海外では臨床試験も行われ、概ね良好な結果を示している。これらの治療は、損傷を受けた際に、ドナー由来の正常な遺伝子を持つ細胞が損傷部位に遊走し、その修復・再生に寄与しうるという知見に基づく。このような細胞療法は根治的な治療法になる可能性が期待される一方で、目的とする臓器に遊走する細胞がかなり少数にとどまるという低効率が懸念されている。

細胞が遊走する際の詳細な機序は未だ明らかではないものの、過去の皮膚を含む検討では、ケモカインを含む液性因子の関与が推測されている。一方で、表皮水疱症患者においてケモカイン類の発現を検証した報告はなされていない。そこで、過去のマウスやヒトの実験に基づき､特に皮膚への遊走に関連すると推測される 6 種類のケモカイン(CCL19､CCL21､CCL27、CCL28、HMGB1、CXCL12）に着目した。表皮水疱症患者では、常に皮膚に創傷を形成しているため、末梢血や皮膚におけるこれらケモカインの発現を解析することとした。

【材料と方法】　当院および全国の協力病院・機関より表皮水疱症患者 45 人の血清を収集し、ELISA 法を用いて CCL19、CCL21、CCL27、CCL28、HMGB1、CXCL12 の 6 つのケモカイン濃度を測定した。また、健常成人 39 人より血清を採取し、対照群とした。

次に、血中ケモカイン濃度が、皮膚でのケモカイン発現を反映するものかどうかを確認するため、患者凍結皮膚切片が入手できたものについては、蛍光免疫染色法でこれら 6 つのケモカインおよびそれらの受容体である CCR7、CCR10、RAGE の染色性を確認した。

創傷に対するケモカインの動態を確認するため、*in vitro* での創傷モデルとして、表皮水疱症患者の表皮角化細胞（EBK）を用いてスクラッチアッセイを行った。正常ヒト角化細胞（NHEK）を対照群とした。それぞれスクラッチ後 24 時間で細胞を回収し、mRNA を抽出した。定量的リアルタイム RT-PCR 法を用いて、血中濃度に有意差のみられた CCL21、HMGB1、CXCL12 について mRNA の発現を調べた。同様にスクラッチ後 24 時間で培養上清を回収し、ELISA 法でこれら 6 つのケモカイン値について測定した。

【結果】　表皮水疱症患者血清と対照群の HMGB1 濃度は、それぞれ 13.8±2.7 ng/ml、4.9±1.4 ng/ml、また CXCL12 濃度は 34.2±7.3 pg/ml、3.8±1.1 pg/ml といずれも患者群が有意に高値であった。

一方、CCL21 濃度は表皮水疱症患者血清で 123.5±18.8 pg/ml、対照群で 996.2±270.3 pg/ml と患者群で有意に低値であった。

さらに、表皮水疱症患者における血清 CXCL12 濃度は、罹患面積と正の相関を示し、逆に血清 CCL27 濃度は負の相関を示す傾向がみられた。また蛍光免疫染色法では、CCL21、CCL27、HMGB1、CXCL12 について、染色強度が強い検体が表皮水疱症患者表皮で多く見られた。

in vitro での創傷治癒モデルとして行ったスクラッチアッセイでは、NHEK、EBK ともに HMGB1 において mRNA の発現が認められたが、スクラッチの有無による有意な差は認められなかった。また、ELISA 法では NHEK について、スクラッチを行った群で有意な HMGB1 濃度の上昇をみたが、EBK について上昇はみられず、HMGB1 の発現において NHEK/EBK 間で挙動の差違が示唆された。CXCL12 についてはスクラッチの有無および細胞の種類による有意な差はみられなかった。

【考察】

今回の研究では、対照群と比較して表皮水疱症患者の CCL21 の血中濃度が低かった。しかし、皮膚組織においては、対照群より表皮水疱症患者の方が、染色強度の強い検体が多かった。マウス実験では、皮内に CCL21 を投与することで間葉系幹細胞の遊走を促し、創傷治癒を促進させることが報告されている。今回の結果からは、表皮水疱症患者の血中と皮膚組織中の CCL21 の濃度差が顕著であることが推測され、この濃度勾配により、効率よく間葉系幹細胞の皮膚への遊走を促している可能性が示唆された。

HMGB1 については過去の報告と同様に表皮水疱症患者で有意に高値を示した。皮膚組織においても患者群で HMGB1 の発現が強い傾向が示されたが、罹患面積との相関関係は確認できなかった。一方、スクラッチアッセイでは、EBK で NHEK よりも HMGB1 の発現が低く、また物理的刺激に対する反応性も弱かった。これらの機械的刺激に対する表皮角化細胞の反応性の相違が HMGB1 の血中濃度に影響する可能性が示唆されたが、今後さらなる検討を要すると考える。

HMGB1 と同様、CXCL12 についても患者群で有意に高値を示したが、CXCL12 では罹患面積に応じて血中濃度が高値となる傾向がみられた。皮膚組織でも患者群において染色強度の強い検体が確認され、皮膚由来の CXCL12 が血中濃度の上昇に寄与していることが示唆された。HMGB1 は CXCL12 とヘテロコンプレックスを形成することが知られており、損傷部位から産生された CXCL12 が HMGB1 と共同して骨髄由来細胞を損傷部位に遊走させ、創傷治癒を促進していると考えられた。

CCL27 は、ヒトにおいて皮膚特異的に恒常的に産生されており、特に表皮角化細胞に強く発現している。また CCL27 は、マウス創傷治癒時に骨髄由来細胞を遊走させることが報告されている。今回の結果からは、CCL27 は患者群において対照群との有意差がみられなかったが、罹患面積に応じて低値になる傾向がみられた。この理由の一つとして、CCL27 は表皮角化細胞から分泌されるため、皮膚損傷の罹患面積に応じて CCL27 の産生量が減少する可能性が推測された。対して CXCL12 では、表皮角化細胞のみならず損傷部位の線維芽細胞や炎症細胞等からも産生されるため、罹患面積に応じて高値になる傾向を示したと推測された。

【結論】　皮膚関連ケモカインとして着目した 6 つのケモカインのうち、CCL21、HMGB1、CXCL12 の値について、表皮水疱症患者と対照群の比較で有意差がみられた。また、CXCL12 と CCL27 については罹患面積に応じて変動する傾向がみられた。表皮水疱症患者におけるこれらケモカインの変動は、効率の良い細胞療法や創傷治癒の機序解明につながる一助となることが期待される。