



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12808
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/66917
Type	doctoral thesis
File Information	Inkin_Ujiie.pdf



学位論文

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)

2017 年 6 月

北海道大学

氏家 韻欣

学位論文

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)

2017 年 6 月

北海道大学

氏家 韻欣

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	9 頁
実験方法	10 頁
実験結果	14 頁
考察	28 頁
総括および結論	32 頁
謝辞	33 頁
引用文献	34 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1 . Inkin Ujiie, Yasuyuki Fujita, Chihiro Nakayama, Wakana Matsumura, Shotaro Suzuki, Satoru Shinkuma Toshifumi Nomura, Riichiro Abe, Hiroshi Shimizu

Altered balance of epidermis-related chemokines in epidermolysis bullosa

Journal of Dermatological Science **85**, 37-45 (2017)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1 . Inkin Ujiie, Yasuyuki Fujita, Wakana Matsumura, Shotaro Suzuki, Satoru Shinkuma Toshifumi Nomura, Riichiro Abe, Hiroshi Shimizu

Analysis of wound healing-related chemokines in the sera of epidermolysis bullosa patients

日本研究皮膚科学会 第 40 回年次学術大会・総会、2015 年 12 月 11 日～13 日、岡山

緒言

皮膚は全身を覆う人体で最大の臓器である。表層から角層・表皮・真皮に分かれており、それぞれの層は様々なタンパクにより強固に結合している (Fig 1)。最外層である角層は外界と直に接するため、水分の蒸発や異物の侵入、紫外線などの外的環境から人体を防御する役割がある。

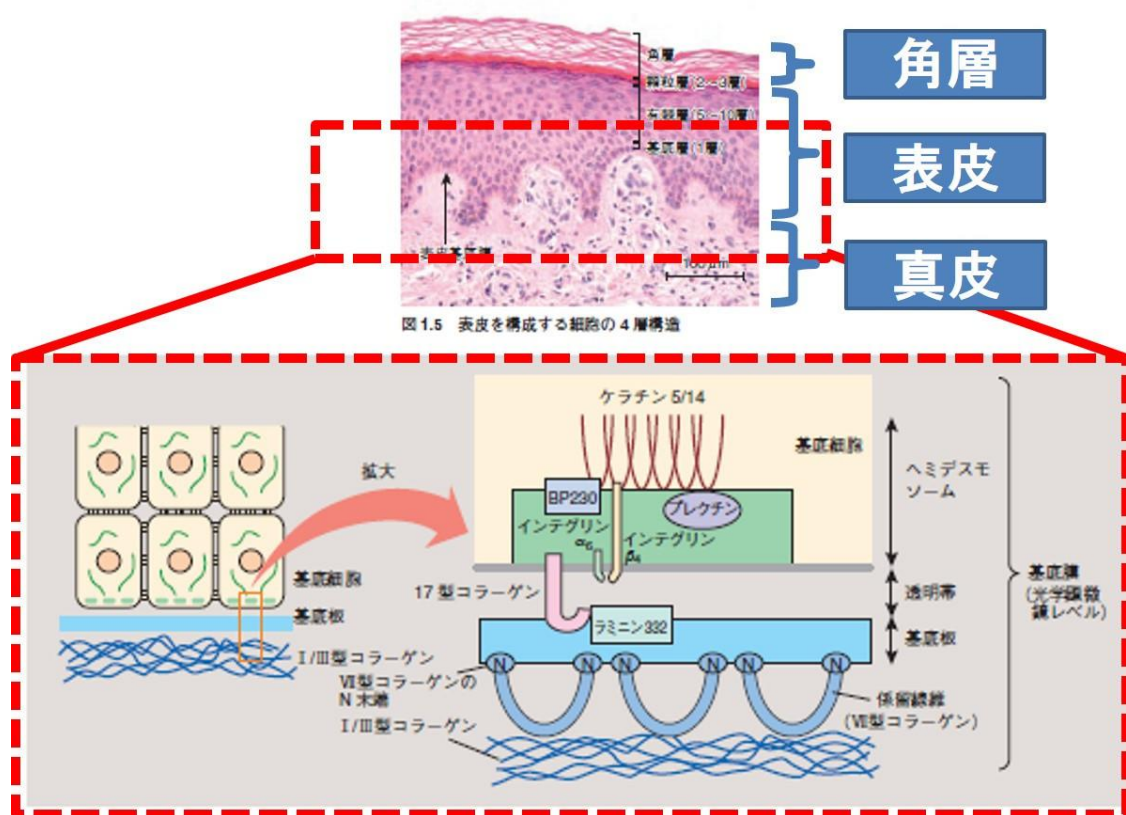


Figure 1 表皮を構成する細胞の構造と表皮基底膜付近の分子構造

(清水 宏「あたらしい皮膚科学第2版」より抜粋・改変¹⁾)

表皮水疱症とは表皮基底膜を構成する分子をコードする遺伝子の異常によって生じる疾患である。表皮基底膜タンパクの異常や欠損により皮膚が脆弱となり、軽微な刺激で水疱、びらん、潰瘍を形成する。日本国内における推定患者数は500～1000人程度といわれており、発症人数は年間10数人と非常に稀な疾患である。

表皮水疱症は臨床像や原因遺伝子、組織構造、免疫組織化学、分子学的な情報から分

類されている。病歴や家族歴、皮膚および皮膚以外の特徴的な臨床症状の有無から最初の判断を行い、次に様々な検査を行いより詳しく分類していく。裂隙形成の部位により、主に3つの病型に分けられる。表皮のタンパク異常では単純型表皮水疱症、表皮-真皮境界部のタンパク異常では接合部型表皮水疱症、真皮のタンパク異常では栄養障害型表皮水疱症とよばれる (Fig 2)。

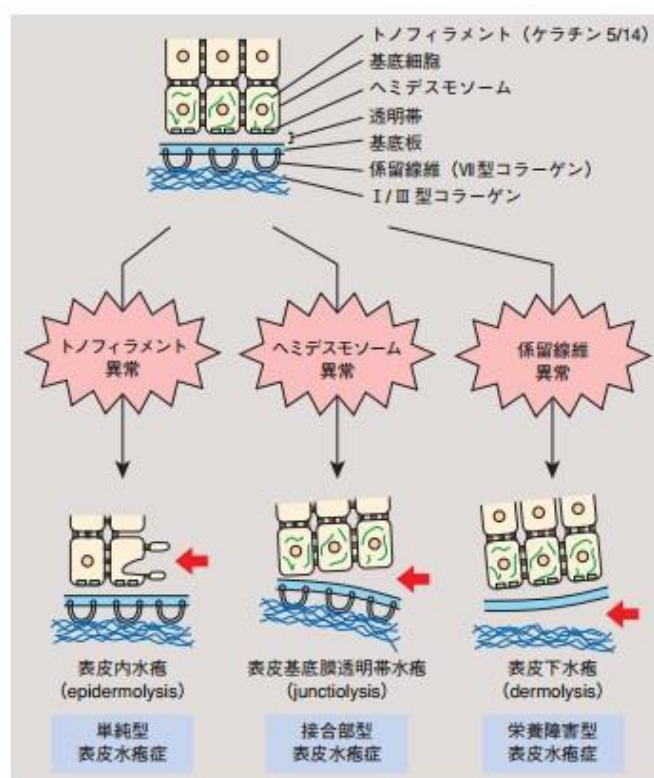


Figure 2 表皮水疱症をきたす機序と裂隙の微細形成部位

(清水 宏「あたらしい皮膚科学第2版」より抜粋¹⁾)

2008年には、第4の病型として Kindler syndrome が加えられ、表皮水疱症は4つの主病型に分類された²⁾。Kindler syndrome では、光線過敏などの特徴的な臨床症状を示し、水疱が基底膜内あるいは基底膜下の複数個所で生じる。

表皮水疱症で一番多くみられるのは栄養障害型表皮水疱症であり、遺伝形式から優性栄養障害型表皮水疱症、劣性栄養障害型表皮水疱症に分類される。患者数の多い順に、劣性栄養障害型、単純型、優性栄養障害型、接合部型となっている。加齢とともに皮膚症状が改善するものから、生後間もなく死亡する重症型まで臨床症状の程度は様々である (Fig 3)。



Figure 3 表皮水疱症患者の病型別臨床像

- a) 単純型表皮水疱症。表皮レベルで形成された浅いびらん、水疱形成がみられる。
- b) 接合部型表皮水疱症。全身のびらんに加え、歯牙形成不全もみられる。
- c) 栄養障害型表皮水疱症。基底膜直下での水疱形成により、瘢痕、手指の癒合がみられる。

その中でも特に栄養障害型、接合部型は重症であり、感染症や扁平上皮癌などの悪性腫瘍により死に至ることもある。このうち劣性栄養障害型表皮水疱症は最も重症な病型の一つであり、VII型コラーゲンの異常および欠損による³。VII型コラーゲンは基底細胞や真皮の線維芽細胞により産生され、係留線維の主要な構成要素であり、lamina densa から真皮乳頭に広がっており、表皮と真皮をつなぎとめる役割を果たしている⁴。臨床症状としては、全身性の皮膚粘膜の水疱形成、繰り返す水疱形成による食道狭窄、瘢痕、手指の癒合、そして感染症、扁平上皮癌などが生じ、致死的にもなりうる。

しかし現時点では、表皮水疱症に対する治療法は、ガーゼや軟膏、創傷被覆材などで創部を保護する対症療法にとどまっている。そこで、全身の皮膚が先天的な遺伝子異常により傷害される本症に対して、さまざまな根治的治療法が各国で研究されている。現在までに根治的治療法としては、蛋白補充療法、遺伝子治療、細胞療法などが試みられている。

蛋白補充療法は欠損した蛋白を皮膚欠損部やびらん部に局所的あるいは全身性に投与し、正常な皮膚の再生を試みる治療である⁵⁻⁷。患者自身の遺伝子を改変する必要がなく、安全性が高いと考えられているが、その効果は局所にとどまり一時的であるため、一生涯にわたり繰り返す必要がある。

遺伝子治療では原因遺伝子が同定されている場合に、ウイルスベクターなどを用いて正常遺伝子を導入する方法である⁸⁻¹¹。特に劣性栄養障害型表皮水疱症はⅦ型コラーゲンをコードする *COL7A1* の単一遺伝子変異によるため、治療に適していると考えられる。自己の細胞を用いるため、拒絶反応の心配は少ないが、新しく導入された遺伝子が生成した蛋白に対する免疫反応やがん化などの問題点もある。

細胞療法では、線維芽細胞、間葉系幹細胞、造血幹細胞を用いる方法がこれまでに報告されている。線維芽細胞を用いた治療法では、同種あるいは自己の線維芽細胞を皮内に投与することで創傷治癒が促進し、また、*COL7A1* 遺伝子の発現を増加させることができたという報告がある¹²⁻¹⁵。同様に、間葉系幹細胞も皮内投与することでⅦ型コラーゲンが補充され、再上皮化を促すことが示された¹⁶。しかし、これらの治療効果は注射部位に限局されるため、表皮水疱症に対しては一部の難治性潰瘍のみを治療対象にせざるを得ない。

そこで近年、全身に作用しうる治療法として、同種間葉系幹細胞の静脈投与や同種造血幹細胞を含む骨髓移植による根治的な治療法が試みられている¹⁷⁻¹⁹。間葉系幹細胞は自己複製能と様々な組織の細胞への分化能があり、また、その局所的な免疫抑制効果による拒絶反応の軽減のみならず、接着分子や様々な生物活性物質の産生源となり、移植した細胞の生着率を高めると考えられている²⁰。骨や軟骨骨折、心筋梗塞、脳虚血疾患などで組織が修復される際には、静脈投与された骨髓由来の間葉系幹細胞が損傷部位に遊走することが示され、構造的・機能的な修復を促進すると言われている²¹⁻²³。

皮膚においても創傷を受けた部位で、移植した間葉系幹細胞が表皮角化細胞などの皮膚を構成する複数の細胞に分化可能であることが証明されている²⁴。また、同様に造血幹細胞移植でも、ドナー造血幹細胞由来の細胞が皮膚に遊走し、皮膚を構成する細胞に分化することが確認されている²⁵。これらの知見をもとに、表皮水疱症マウスモデルにおいて、同種間葉系幹細胞あるいは造血幹細胞を含む骨髓移植により欠損基底膜タンパクの局所的な発現が認められ、びらんなどの臨床症状の改善もみられた (Fig 4)

^{25,26}。

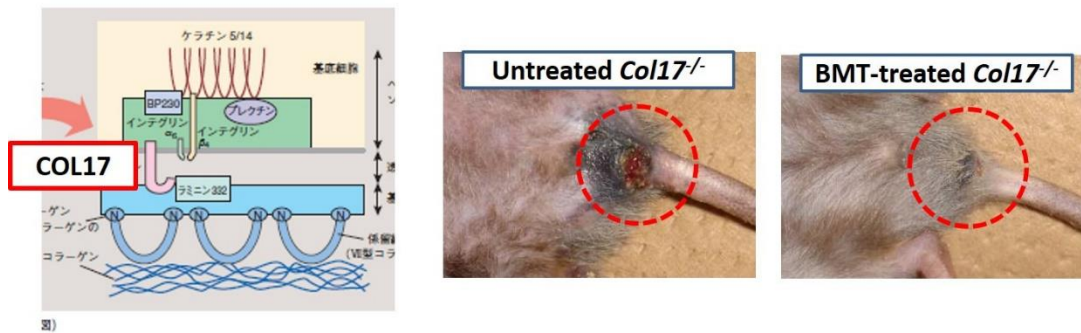


Figure 4 XVII型コラーゲンの構造と細胞療法による臨床症状の改善

(清水 宏「あたらしい皮膚科学第2版」¹、Fujita *et al* (2010)²⁵より抜粋・改変)

さらに国外では、重症劣性栄養障害型表皮水疱症の患者に対して、骨髄移植による治療が試みられている。骨髄移植後にびらんの上皮化が進み、免疫組織化学的にVII型コラーゲンの発現が確認され、概ね良好な成績を示している¹⁹。この治療法は、正常遺伝子を持つ同種ドナー細胞が皮膚粘膜の損傷部位に遊走、ホーミングし、生着したのち、欠損あるいは不十分な皮膚構成タンパクを産生し、組織を修復するという考えに基づいている²⁷。

このように、細胞療法は全身に作用し、根治的な治療法になると期待される一方で、他者の細胞を用いるため、免疫による拒絶反応や移植関連の合併症の危険性が懸念される。また、大きな問題点の一つとして、ドナー細胞の目的とする臓器への生着率が低いことがあげられる。

ドナー由来の細胞が表皮に到達する割合は皮膚の状態により異なっており、ケモカインを含む様々な液性因子の関与が示唆されている。通常では表皮における骨髄由来細胞は殆ど確認できないが、マウスの皮膚に創傷を加えることで、全表皮角化細胞の $0.025\% \pm 0.009\%$ 、基底細胞の約 0.1% がドナー骨髄細胞由来であったことが示された²⁸。一方で、接合部型表皮水疱症モデルマウスを用いた移植実験では、基底細胞の約 $1.08\% \pm 0.39\%$ がドナー骨髄細胞由来であり、通常の創傷の際と比較して約10倍も多く確認された²⁵。また、表皮水疱症患者においても骨髄移植後の皮膚におけるドナー骨髄由来細胞の割合は最大で93%という報告もある²⁷。

これらの研究から、損傷をうけた皮膚、特に表皮水疱症患者の皮膚ではドナー骨髄細胞の遊走を誘導する何らかの液性因子が発現し、それが血液に循環することで、目的とする皮膚の損傷部位へ造血幹細胞や間葉系幹細胞といった骨髄由来細胞の遊走を促していることが示唆される (Fig 5)。

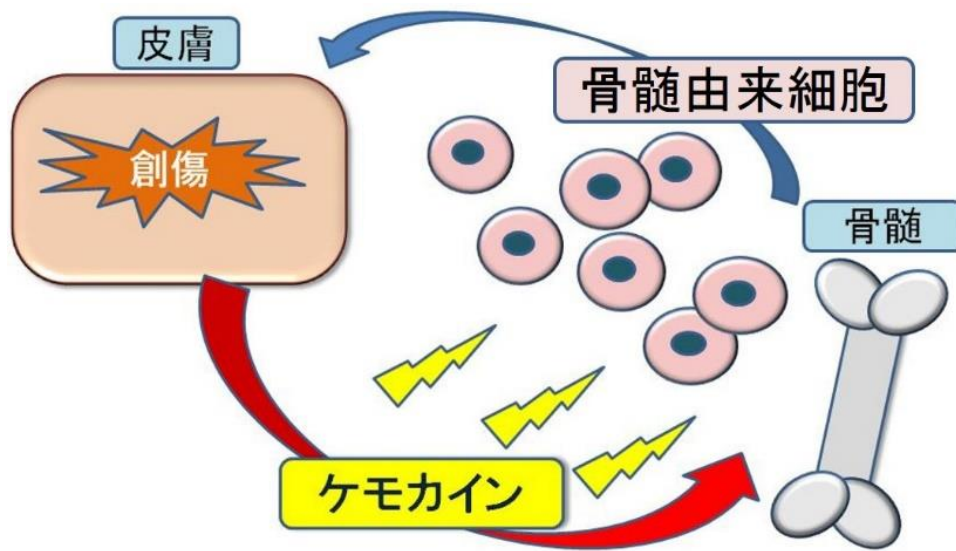


Figure 5 創傷時のケモカインのはたらき

創傷部位からケモカインなどが分泌され、目的とする臓器への骨髄由来細胞の遊走を促進していると考えられている。

骨髄由来の間葉系幹細胞が目的とする組織に遊走する機序に関する研究は複数のグループから報告されており、これまで数種類のケモカインが骨髄由来細胞の皮膚への遊走に関与していると考えられている。例えばマウス実験において、間葉系幹細胞は CCR7 を発現しており、そのリガンドである CCL21/secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC)を皮膚の損傷部位に投与すると骨髄由来の間葉系幹細胞の皮膚への遊走が促進され、各種表皮細胞に分化して創傷治癒を促すことがわかった²⁴。また、CCL27/cutaneous T-cell-attracting chemokine (CTACK)は全層皮膚欠損を作成したマウスで局所の発現が増加し、さらに創傷周囲の皮内に投与することで骨髄由来細胞の皮膚の損傷部位への遊走に強く関与し、創傷治癒を促すことが報告されている (Fig 6)

²⁸。

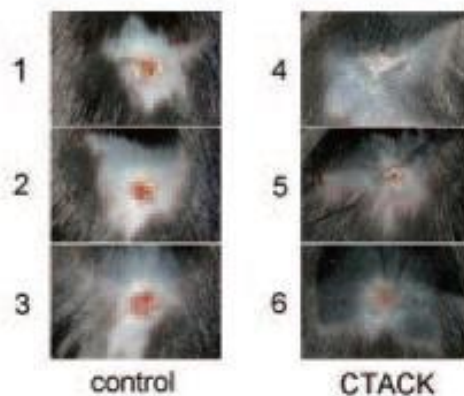


Figure 6

全層皮膚欠損作成後、PBS 投与を control とし、10 日後の創傷部位。CCL27 (CTACK) 投与群で創傷治癒が促進されている。

(Inokuma *et al*(2006)²⁸ より抜粋)

表皮水疱症モデルマウスにおいては、CCR10 が間葉系幹細胞に発現しており、リガンドである CCL27 の皮膚での発現が、間葉系幹細胞の皮膚への動員に寄与していることが報告されている²⁹。CXCL12/stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)はマウスモデルにおいて、皮膚のみならず様々な損傷部位で発現が増加しており、骨髄由来の間葉系幹細胞を集めることで創傷治癒過程に寄与していると報告されている³⁰⁻³²。High-mobility group box 1 (HMGB1)はマウスモデルにおいて骨髄由来細胞の血液循環への遊走に関与していることが報告されている³³。さらに、劣性栄養障害型表皮水疱症患者について、血中の HMGB1 濃度が健常人より高値であり、その値が重症度と相関しているとの報告もある^{33,34}。このように、マウスを用いた研究では、創傷治癒時に骨髄由来細胞を損傷部位に誘導するのに関連していると考えられるケモカインが報告されてきているが、現在までにヒトの表皮水疱症患者について、HMGB1 以外のケモカイン発現を解析した研究は報告されていない。

そこで、今回我々は表皮水疱症患者について、骨髄由来細胞を皮膚に動員させる皮膚関連ケモカインの発現を解析した。上記のケモカインに加えて、CCL21 および CCL27 と受容体を共有する CCL19 と CCL28 についても解析を試みた。表皮水疱症患者におけるケモカイン発現を検証することで、骨髄由来細胞の皮膚への遊走機序の一端の解明につながり、またより効率の良い細胞療法を行う一助となることが期待される。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

CLA	cutaneous lymphocyte-associated antigen
CTACK	cutaneous T-cell-attracting chemokine
DDEB	dominant dystrophic epidermolysis bullosa
DEB	dystrophic epidermolysis bullosa
EB	epidermolysis bullosa
EBK	epidermolysis bullosa keratinocyte
EBS	epidermolysis bullosa simplex
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FITC	fluorescein isothiocyanate
GVHD	graft-versus-host disease
HIV	human immunodeficiency virus
HMGB1	high-mobility group box 1
MIP	macrophage inflammatory protein
NHEK	normal human epidermal keratinocyte
RT-PCR	reverse-transcription-PCR
RAGE	receptor for advanced glycation end-products
RDEB	recessive dystrophic epidermolysis bullosa
SD	standard deviation
SDF-1	stromal cell-derived factor-1
SLC	secondary lymphoid-tissue chemokine
TLR	toll-like receptors

実験方法

1. 患者および対照群

本研究は、北海道大学病院自主臨床研究審査委員会において承認され、全参加者より適切なインフォームドコンセントが得られている。

当院および全国の協力病院・機関より表皮水疱症患者 45 人の血清が集められた。対照群として、明らかな皮膚疾患のない 39 人の健常成人より血清を採取した。表皮水疱症の診断は皮膚科専門医により国際基準²に基づいて行われた。上記の患者について、性別、年齢、病型、罹患面積(%)についての情報を収集した。罹患面積は紅斑、びらん、潰瘍、瘢痕を含むものとした。

凍結皮膚切片は 2000～2009 年に当科を受診した表皮水疱症患者 19 人の検体を用いた。対照群として健常人 5 人の皮膚切片を用いた。

in vitro のスクラッチモデルには、劣性栄養障害型表皮水疱症患者 2 人の表皮角化細胞を用いた。対照群として健常人 2 人の表皮角化細胞を用いた。

2. 血清ケモカイン濃度の測定

表皮水疱症患者の血清は全国の病院・機関より 4 °C の状態で送付され、当院で採取した血清と同様に、分注後 -80 °C で保管した。測定する前に、-80 °C に保管された患者および対照群の血清を氷上で融解した。血清のケモカイン濃度は添付のプロトコールに従い、以下の enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) キットを用いて測定した。

human CCL19/ macrophage inflammatory protein (MIP)-3 β DuoSet ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN)

human CCL21/6Ckine DuoSet ELISA (R&D Systems)

human CCL27/CTACK DuoSet ELISA (R&D Systems)

human CCL28 DuoSet ELISA (R&D Systems)

HMGB1 ELISA Kit (Shino-Test Corp., Tokyo, Japan)

human CXCL12/SDF-1 DuoSet ELISA (R&D Systems)

光学濃度は Bio-Rad Model 550 microplate reader (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA)を用いて測定した。タンパク濃度はカーブフィッティングにより得られた標準曲線から計算した。

3. スクラッチアッセイ

健常人の表皮角化細胞 (Normal human epidermal keratinocyte, NHEK) および劣性栄養障害型表皮水疱症患者の表皮角化細胞 (Epidermolysis bullosa keratinocyte, EBK) は CnT-PR (CeLLnTEC, Bern, Switzerland) 培地を用いて 37°C、5 %CO₂ の湿潤環境で培養した。いずれも 6 継代に至る前に実験に使用した。コンフルエントになった NHEK および EBK を、200 μ l ピペットのチップ先端で縦・横方向に計 6 方向スクラッチし、24 時間後に細胞および培養上清を回収した (Fig 7)。同時に、別のディッシュで同様に培養し、コンフルエントになった NHEK および EBK について細胞および培養上清を回収した。培養上清のケモカイン濃度は前述と同様に、ELISA キットを用いて測定した。

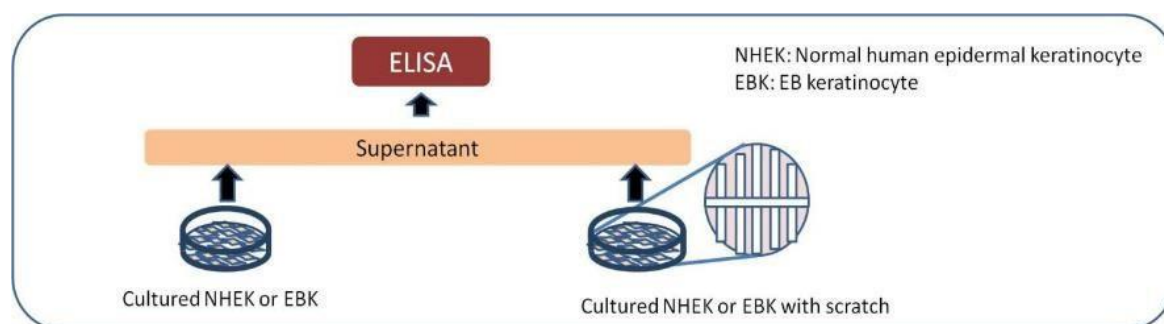


Figure 7 スクラッチアッセイの方法

4. リアルタイム reverse-transcription (RT)-PCR

スクラッチ無し・スクラッチ有りの NHEK および EBK それぞれより、RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hombrechtikon, Switzerland)を用いて添付のプロトコール通りに RNA を抽出した。抽出した RNA は SuperscriptTM III RT (Invitrogen)を用いて添付のプロトコール通りに thermocycler (GeneAmp PCR system 9600; PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA)を用いて cDNA を作成した。リアルタイム PCR は TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて CCL21、HMGB1、CXCL12 について行った。50°C2 分間、95°C10 分間の後、95°C15

秒間・60°C1分間を40サイクルの条件で、StepOnePlus Real-Time PCR Systems (v. 2.0, Applied Biosystems)をもちいて解析した。遺伝子発現レベルは18S rRNAを内因性コントロールとして、 $\Delta\Delta C_t$ methodsを用いて計算した。

5. 蛍光免疫染色

表皮水疱症患者および対照群の採取された皮膚は生理食塩水に浸したガーゼにくるんだ後、optimum cutting temperature compound (Muto Pure Chemicals, Japan)に包埋し、-80°Cで保管した。クリオスタットを用いて5 μ mの薄切切片を作成し、冷却したアセトンに30分間浸し固定した。その後、ブロッッキングとして切片を10%BSAを含むPBS溶液に37°C15分間浸した。次に37°C30分間で一次抗体を反応させた。

使用した一次抗体は以下のとおりである。

mouse monoclonal anti-human CCL19/MIP-3 β (54909, 20 μ g/ml, R&D Systems)

goat polyclonal anti-human CCL21/SLC (10 μ g/ml, R&D Systems)

mouse monoclonal anti-human CCL27/CTACK antibody (124302, 20 μ g/ml, R&D Systems)

mouse monoclonal anti-human CCL28 antibody (62705, 20 μ g/ml, R&D Systems)

mouse monoclonal anti-HMGB1 antibody (115603, 20 μ g/ml, R&D Systems)

mouse monoclonal anti-Human/Mouse CXCL12/SDF-1 antibody (79018, 12 μ g/ml, R&D Systems)

rabbit monoclonal anti-human CCR7 antibody (ab32527, 2 μ g/ml, Abcam, Cambridge, UK)

goat polyclonal anti-human CCR10 antibody (ab1661, 20 μ g/ml, Abcam)

rabbit polyclonal anti-human receptor for advanced glycation end-products (RAGE) (sc-5563, 4 μ g/ml, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)

次に37°C30分間で二次抗体を反応させた。

使用した二次抗体は以下のとおりである。

fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG (15 μ g/ml, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)

FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG (15 μ g/ml, Jackson ImmunoResearch)

FITC-conjugated donkey anti-goat IgG (15 μ g/ml, Jackson ImmunoResearch)

切片は細胞核を可視化するため、mounting medium with propidium iodide (ImmunoBioScience Corp., Mukilteo, WA)を用いて封入した。切片は confocal laser scanning fluorescence microscope (Fluoview FV1000, Olympus, Tokyo, Japan)を用いて観察した。

6. 統計学的解析

ケモカインの項目別血中濃度に関しては Student's t-test を用いて解析した。また、表皮水疱症の病型別ケモカイン血中濃度については、Kruskal-Wallis test および Dunnett's post test を用いて解析した。ケモカインの血中濃度と年齢および罹患面積については Pearson's correlation coefficient test を用いて解析した。スクラッチアッセイの結果については paired t-test を用いて解析した。 $P < 0.05$ を統計学的有意差があると判断した。それぞれの解析は Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA) with the add-in software Statcel2³⁵ および GraphPad Prism ver. 7.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA) を使用して行った。

実験結果

1. 患者背景

1.1 血清検体

表皮水疱症患者 45 名の血清が得られた。病型の内訳は以下のとおりである (Table 1)。

Table 1 血清検体の病型

病型	遺伝形式による分類	人数
栄養障害型表皮水疱症	劣性栄養障害型表皮水疱症	23
	優性栄養障害型表皮水疱症	6
	栄養障害型表皮水疱症 (遺伝形式不明)	2
単純型表皮水疱症	—	9
病型不明	—	5
合計		45

表皮水疱症は病型により重症度や機序も異なるため、解析する際に、遺伝形式不明の栄養障害型 2 名、病型不明の 5 名は除外した。

上記の患者について、性別、年齢、病型、罹患面積 (%) についての結果を示す (Table 2)。全国的にみられるように劣性栄養障害型表皮水疱症患者の検体が最も多く集められた。

Table 2 血清検体の臨床情報

	表皮水疱症患者 (n = 45)					対照群 (n = 39)
病型	劣性栄養障害型	優性栄養障害型	栄養障害型	単純型	病型不明	
人数	23	6	2	9	5	39
年齢(歳) ± SD (範囲)	24 ± 22.0 (2-83)	20 ± 15.5 (6-53)	6 ± 5.5 (0-11)	19 ± 15.7 (1-48)	21 ± 20.9 (3-61)	30 ± 4.2 (25-42)
性別 男:女	13:10	2:4	2:0	7:2	2:3	22:17
罹患面積(%)	48.5 ± 37.0	29.8 ± 24.5	67.5 ± 27.5	14.2 ± 28.9	17.6 ± 11.6	—

SD, standard deviation

また、病型別に罹患面積を比較したところ、重症度の違いは、病型から予想される通りとなった(Fig 8)。

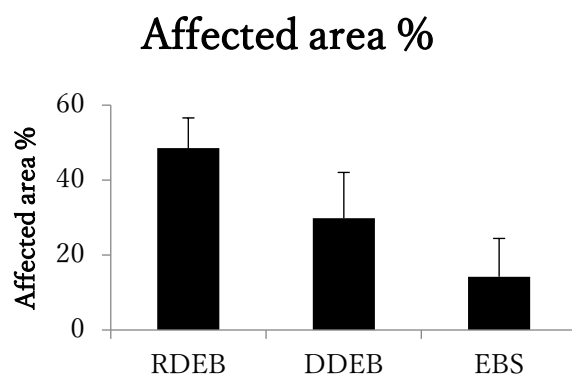


Figure 8 病型別罹患面積

RDEB, recessive dystrophic epidermolysis bullosa (劣性栄養障害型表皮水疱症); DDEB, dominant dystrophic epidermolysis bullosa (優性栄養障害型表皮水疱症); EBS, epidermolysis bullosa simplex (単純型表皮水疱症)。

データは平均値および標準誤差で示した。

1.2 皮膚検体

得られた皮膚検体の病型の内訳は以下のとおりである(Table 3)。

Table 3 皮膚検体の病型

病型	遺伝形式による分類	人数
栄養障害型表皮水疱症	劣性栄養障害型表皮水疱症	4
	優性栄養障害型表皮水疱症	1
	栄養障害型表皮水疱症 (遺伝形式不明)	1
接合部型表皮水疱症	—	2
単純型表皮水疱症	—	7
Kindler syndrome	—	1
病型不明	—	3
合計		19

2. 血中ケモカイン濃度

ELISA 法により、CCL19、CCL21、CCL27、CCL28、HMGB1、CXCL12 の 6 つの項目について測定した。

CCL21 については表皮水疱症患者において対照群よりも有意に低い値であった。HMGB1 については過去の報告と同様に表皮水疱症患者の方が対照群よりも有意に高い値となった。また、CXCL12 についても表皮水疱症患者の方が対照群よりも有意に高い値となった。CCL19、CCL27、CCL28 については有意差が認められなかった (Table 4, Fig 9)。

Table 4 ELISA 法によるケモカイン測定値

項目	表皮水疱症患者	対照群	P 値
CCL19	887.2 ± 90.4 pg/ml	1067.2 ± 235.5 pg/ml	> 0.05
CCL21	123.5 ± 18.8 pg/ml	996.2 ± 270.3 pg/ml	< 0.01
CCL27	410.8 ± 28.5 pg/ml	363.6 ± 45.4 pg/ml	> 0.05
CCL28	1807.4 ± 332.7 pg/ml	1766.5 ± 502.0 pg/ml	> 0.05
HMGB1	13.8 ± 2.7 ng/ml	4.9 ± 1.4 ng/ml	< 0.01
CXCL12	34.2 ± 7.3 pg/ml	3.8 ± 1.1 pg/ml	< 0.0001

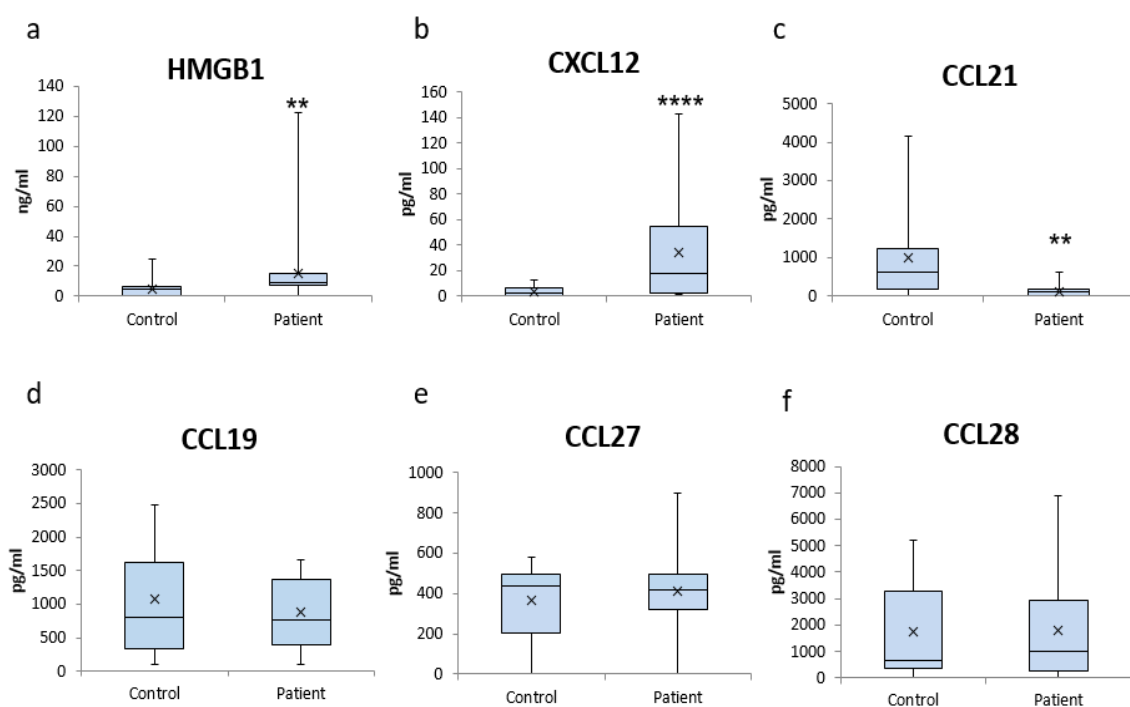


Figure 9 項目別ケモカイン値

(a) HMGB1 (Controls, $n = 18$; Patients, $n = 37$); (b) CXCL12 (Controls, $n = 15$; Patients, $n = 34$); (c) CCL21 (Controls, $n = 19$; Patients, $n = 37$); (d) CCL19 (Controls, $n = 13$; Patients, $n = 33$); (e) CCL27 (Controls, $n = 21$; Patients, $n = 37$); (f) CCL28 (Controls, $n = 15$; Patients, $n = 33$). 箱ひげ図は各ケモカイン値の分布を示し、ひげの両端は最大値および最小値を表す。×印は平均値を表す。統計学的有意差は Student's t-test を用いて検定した。** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$.

また、栄養障害型表皮水疱症患者が大半を占めるため、栄養障害型表皮水疱症患者のみにしても項目別にケモカイン値を解析したが、表皮水疱症全体と同様な結果を示した(Fig 10)。

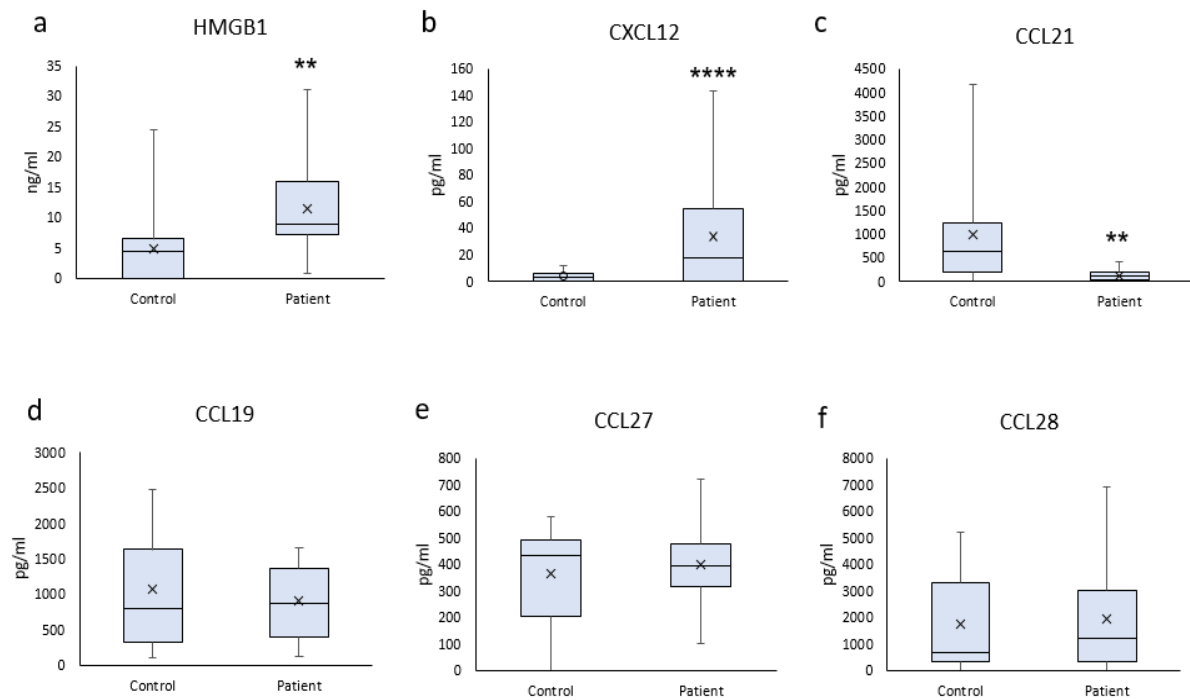


Figure 10 栄養障害型水疱症における項目別ケモカイン値

(a) HMGB1 (Controls, n = 18; Patients, n = 30); (b) CXCL12 (Controls, n = 15; Patients, n = 28); (c) CCL21 (Controls, n = 19; Patients, n = 30); (d) CCL19 (Controls, n = 13; Patients, n = 27); (e) CCL27 (Controls, n = 21; Patients, n = 29); (f) CCL28 (Controls, n = 15; Patients, n = 27). 箱ひげ図は各ケモカイン値の分布を示し、ひげの両端は最大値および最小値を表す。×印は平均値を表す。統計学的有意差は Student's t-test を用いて検定した。 ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$.

3. 血中ケモカイン濃度と臨床情報

3.1 性別・年齢

患者の性別・年齢とケモカイン濃度との関連について解析したが、いずれも有意差および相関関係は認められなかった (Fig 11, 12)。

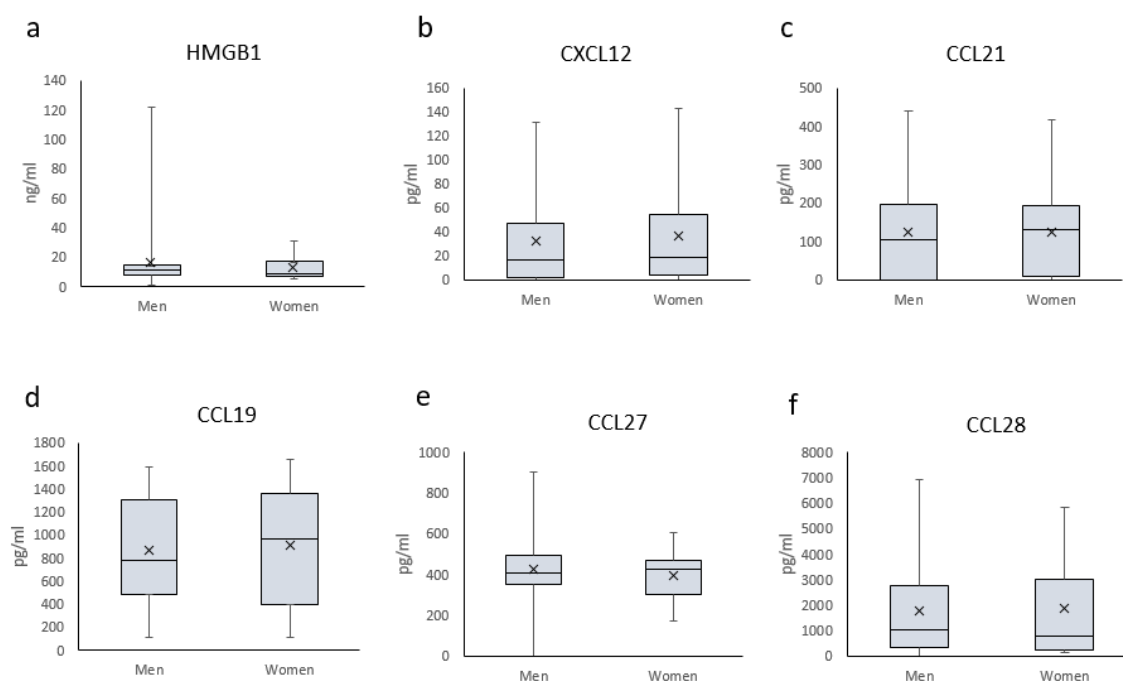


Figure 11 性別とケモカイン値

(a) HMGB1 (Men, n = 21; Women, n = 16); (b) CXCL12 (Men, n = 19; Women, n = 15); (c) CCL21 (Men, n = 21; Women, n = 16); (d) CCL19 (Men, n = 19; Women, n = 14); (e) CCL27 (Men, n = 19; Women, n = 16); (f) CCL28 (Men, n = 19; Women, n = 14). 箱ひげ図は各ケモカイン値の分布を示し、ひげの両端は最大値および最小値を表す。×印は平均値を表す。統計学的有意差は Student's t-test を用いて検定した。

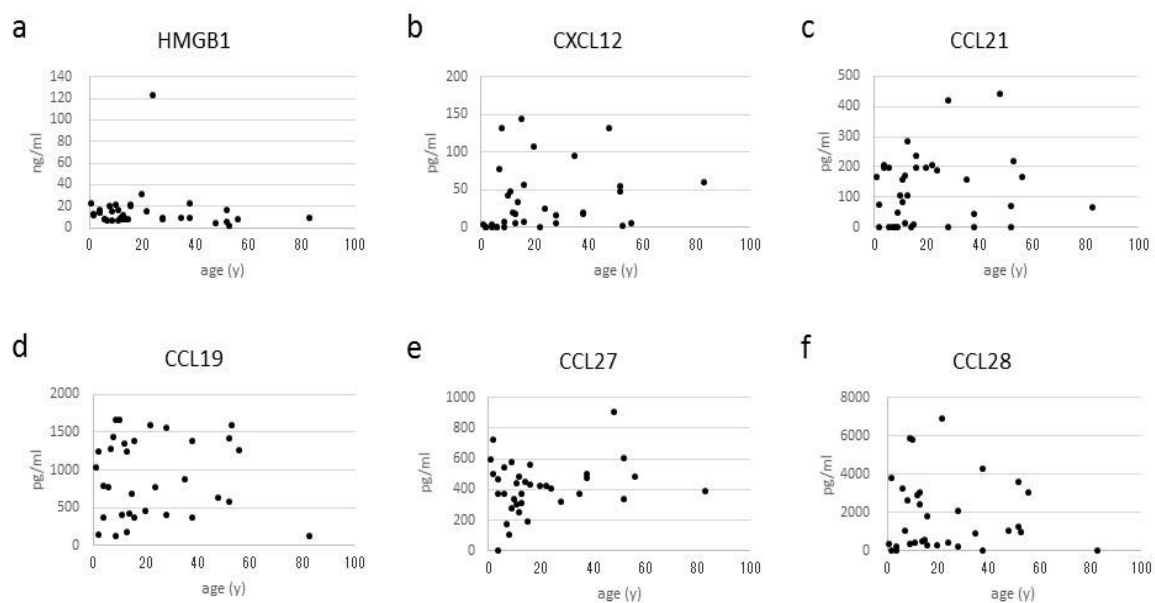


Figure 12 年齢とケモカイン値

(a) HMGB1 (n = 37); (b) CXCL12 (n = 34); (c) CCL21 (n = 37); (d) CCL19 (n = 33); (e) CCL27 (n = 35); (f) CCL28 (n = 33). 散布図は血中のケモカイン濃度の分布を示す。統計学的有意差は Pearson's correlation coefficient test を用いて解析した。

3.2 臨床病型

病型と血中ケモカイン濃度との関連については、HMGB1 で対照群とそれぞれの病型、CXCL12 で対照群と劣性栄養障害型表皮水疱症、CCL21 で対照群と劣性栄養障害型表皮水疱症、単純型表皮水疱症に有意差がみられた (Fig 13)。

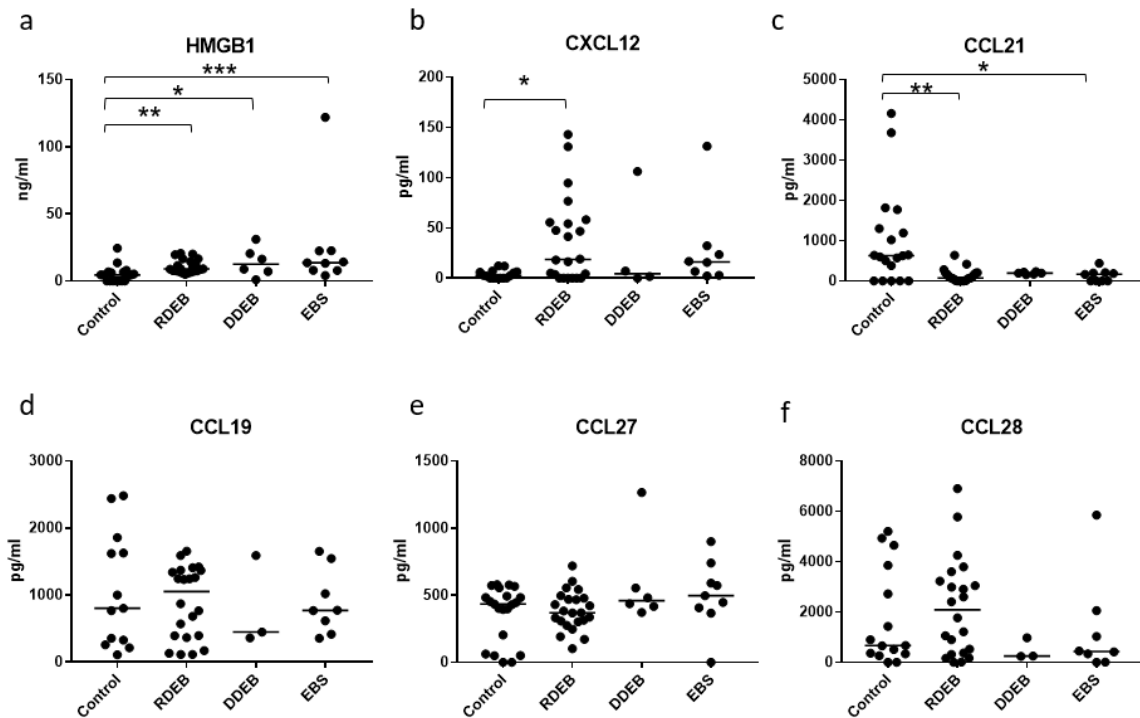


Figure 13 病型とケモカイン値

RDEB (劣性栄養障害型表皮水疱症) ; DDEB (優性栄養障害型表皮水疱症) ; EBS (単純型表皮水疱症) .

(a) HMGB1 (control, n = 18; RDEB, n = 22; DDEB, n = 6; EBS, n = 9); (b) CXCL12 (control, n = 15; RDEB, n = 22; DDEB, n = 4; EBS, n = 8); (c) CCL21 (control, n = 19; RDEB, n = 23; DDEB, n = 6; EBS, n = 9); (d) CCL19 (control, n = 13; RDEB, n = 22; DDEB, n = 3; EBS, n = 8); (e) CCL27 (control, n = 21; RDEB, n = 23; DDEB, n = 6; EBS, n = 9); (f) CCL28 (control, n = 15; RDEB, n = 22; DDEB, n = 3; EBS, n = 8). 散布図は血中のケモカイン濃度の分布を示す。中央値はダッシュで表した。統計学的有意差は Kruskal–Wallis test および Dunnett’s post test で検定した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

3.3 罹患面積

罹患面積と血中ケモカイン濃度との関連については、罹患面積の増加に伴い、CXCL12 濃度が高値となる傾向がみられた ($r = 0.574$, $P < 0.001$)。一方で、統計学的有意差はないものの、罹患面積の増加に伴い、CCL27 濃度が低値となる傾向がみられた ($r = -0.326$, $P = 0.064$)。罹患面積は 4 つのグループに分けて表示した (Fig 14)。

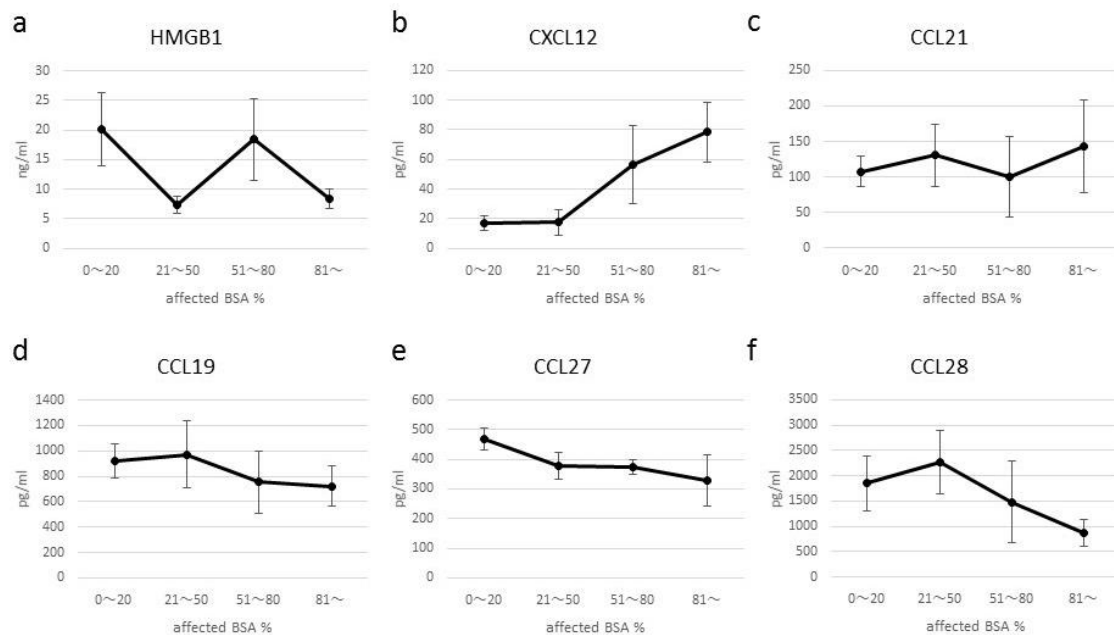


Figure 14 罹患面積とケモカイン値

(a) HMGB1 (patients, $n = 35$); (b) CXCL12 (patients, $n = 32$); (c) CCL21 (patients, $n = 35$); (d) CCL19 (patients, $n = 32$); (e) CCL27 (patients, $n = 33$); (f) CCL28 (patients, $n = 32$). 罹患面積は以下の 4 つのグループに分類して示した。0-20%, 21-50%, 51-80%, 80% <。 データは平均値および標準誤差で表した。罹患面積とケモカイン濃度の関係について Pearson's correlation coefficient test を用いて解析した。

また、患者の大多数を占める劣性栄養障害型表皮水疱症患者のみにしても同様に、罹患面積の増加に伴い、CXCL12 濃度が高値となる傾向がみられた ($r = 0.467$, $P < 0.05$)。一方で、罹患面積の増加に伴い、CCL27 濃度が低値となる傾向がより顕著にみられた ($r = -0.702$, $P < 0.001$) (Fig 15)。また、CCL28 濃度についても罹患面積の増加に伴い、低値となる傾向がみられた ($r = -0.464$, $P < 0.05$)

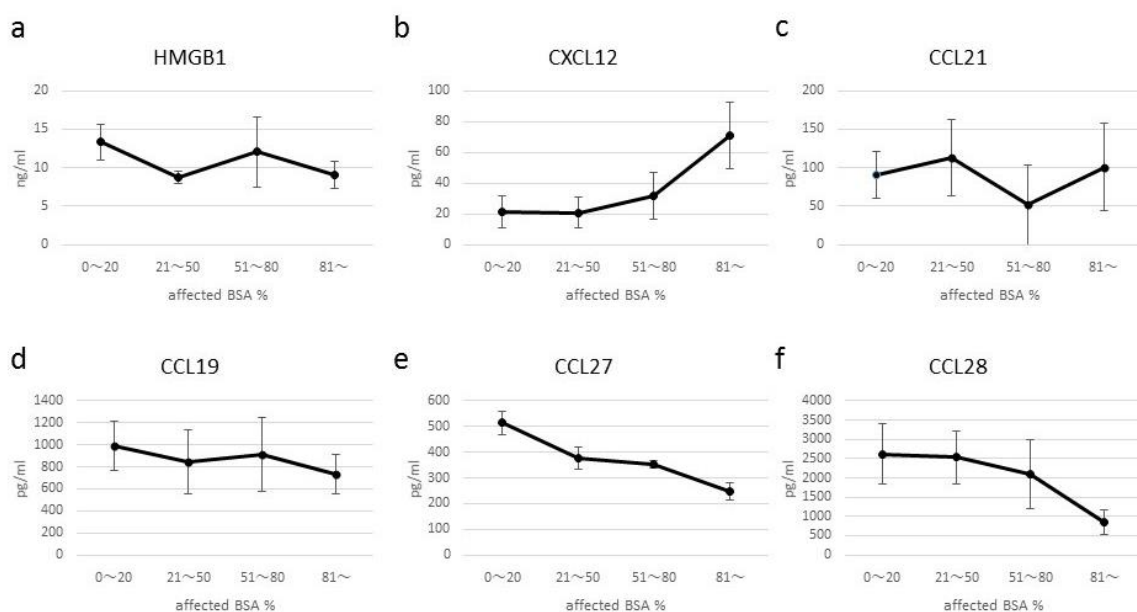


Figure 15 劣性栄養障害型表皮水疱症患者の罹患面積とケモカイン値

各項目いずれも n = 21。罹患面積は以下の 4 つのグループに分類して示した。0-20%, 21-50%, 51-80%, 80% <。データは平均値および標準誤差で表した。罹患面積とケモカイン濃度の関係について Pearson's correlation coefficient test を用いて解析した。

4. 蛍光免疫染色

次に、血中のケモカイン濃度が皮膚で産生されたケモカインを反映している可能性を考え、皮膚でのケモカイン発現をみるために蛍光染色を行い観察した。前述の 6 種類のケモカインに加え、それぞれの受容体である CCR7、CCR10、RAGE についても染色を行った。

CCL21 は、表皮水疱症患者の約半数で基底細胞から表皮中層まで染色された(表皮水疱症: 10/19 検体; 対照群: 1/5 検体)。また、CCL27 については表皮水疱症患者と対照群ともに基底細胞が染色され(表皮水疱症患者: 11/19 検体; 対照群: 3/5 検体)、表皮水疱症患者 1 例で表皮全層への染色が確認できた。HMGB1 は対照群では基底細胞より上層にのみ染色が確認できたのに対し、表皮水疱症患者では基底細胞層を含む表皮全層に染色された検体が確認できた(表皮水疱症: 6/19 検体; 対照群: 0/5 検体)。同様に CXCL12 についても、対照群では基底細胞より上層にのみ染色が確認できたのに対し、表皮水疱症患者では基底細胞を含む表皮全層への染色が確認できた(表皮水疱症患者: 2/10 検体; 対照群: 0/5 検体) (Fig 16)。それぞれ症例数が少ないこともあり、染色性と表皮水疱症の病型との関連性は確認できなかった。

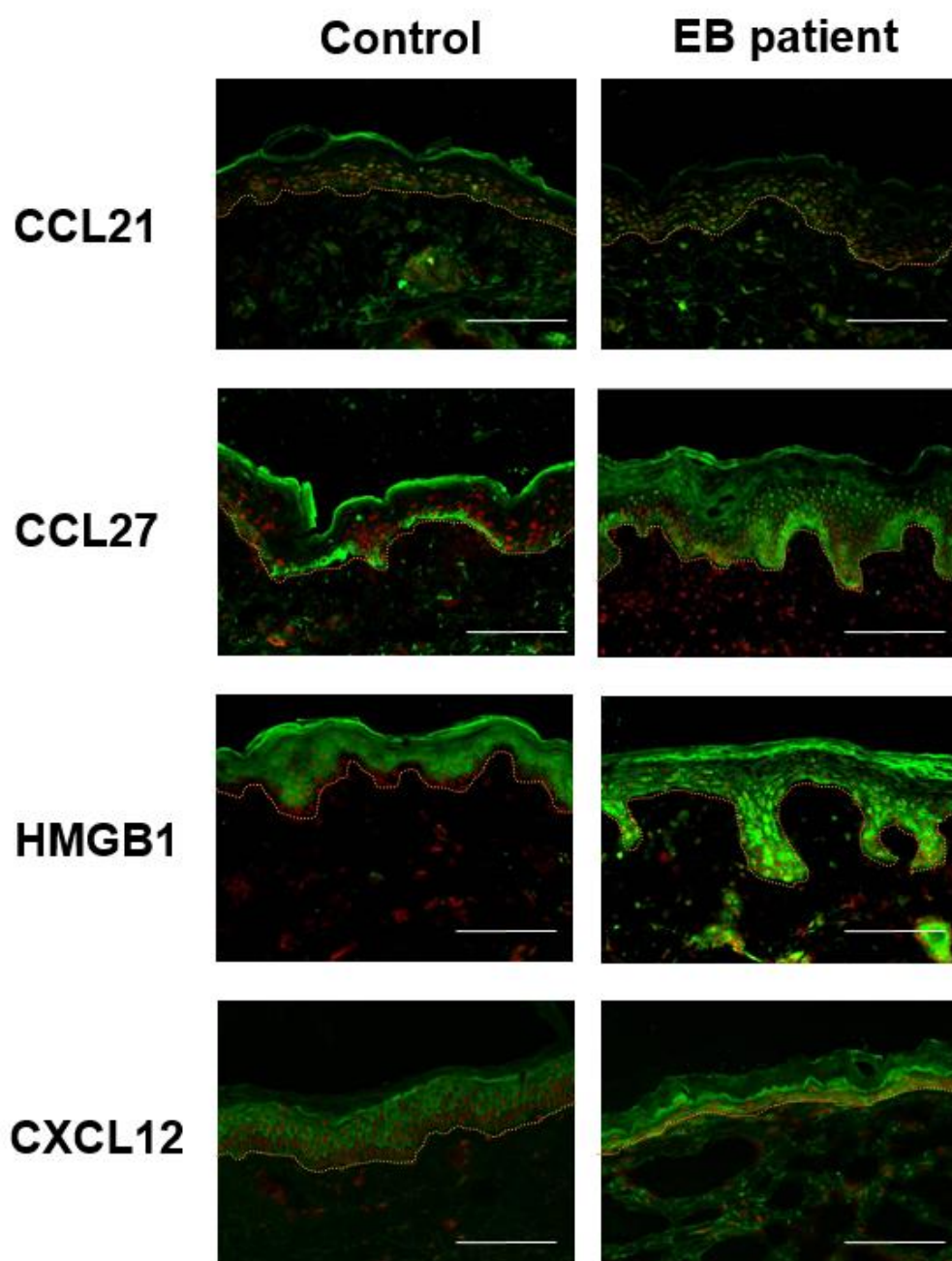


Figure 16 ケモカインの皮膚での発現

各項目の control および表皮水疱症（EB, epidermolysis bullosa）患者組織の代表的な画像を示した。ケモカインは緑、細胞核は赤で示されている。点線は表皮真皮境界部を示している。Bar = 100 μ m.

また、CCL19、CCL28、CCR7、CCR10、RAGE については表皮水疱症患者と対照群で明らかな違いは認められなかった (Fig 17)。

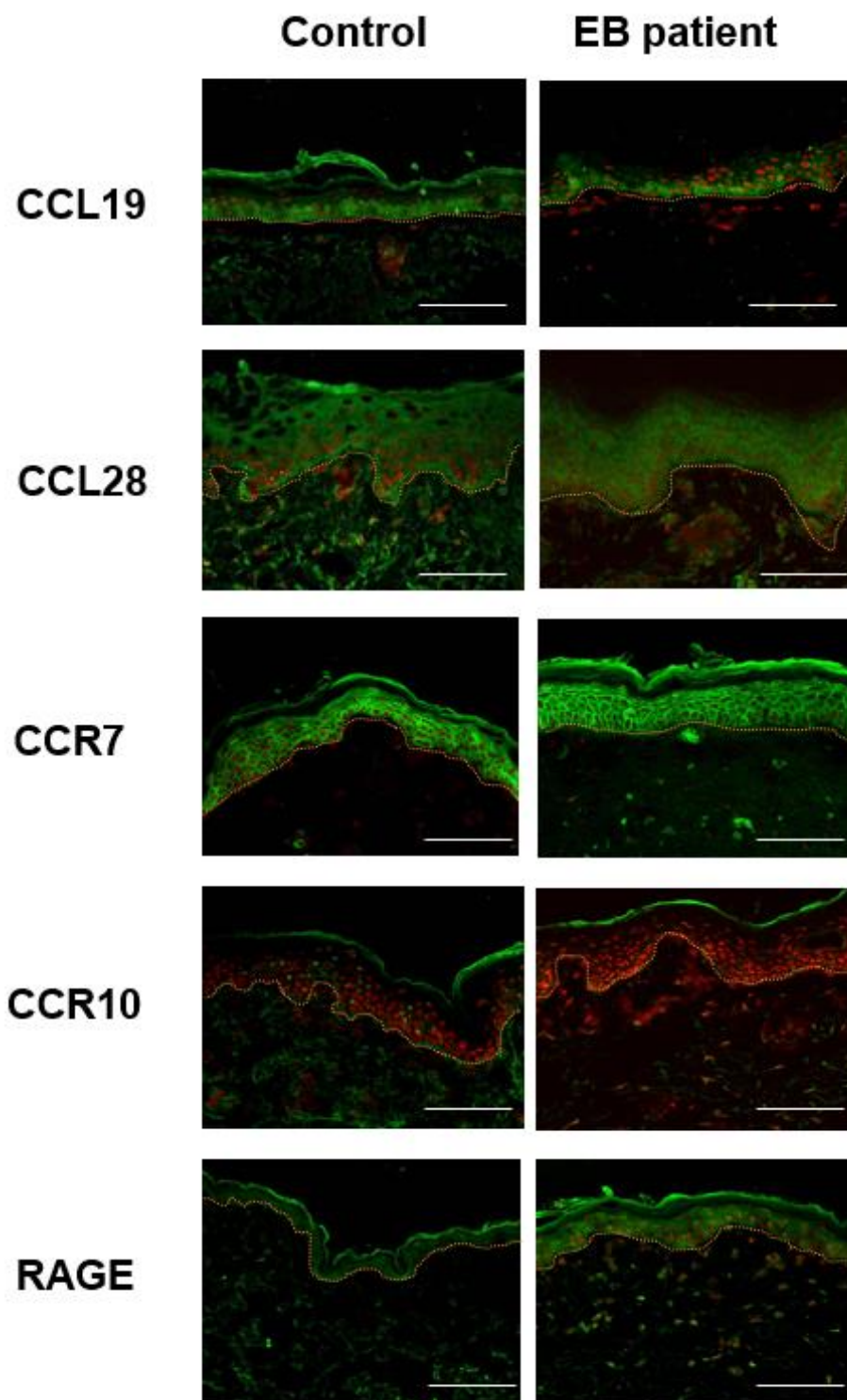


Figure 17 ケモカインおよび受容体の皮膚での発現

各項目の control および表皮水疱症 (EB) 患者組織の代表的な画像を示した。ケモカインは緑、細胞核は赤で示されている。点線は表皮真皮境界部を示している。Bar = 100 μ m.

表皮水疱症患者の皮膚検体において、CCL21、CCL27、HMGB1、CXCL12 の染色性がより明瞭に確認できたことから、これらの染色性の違いが血中のケモカイン濃度に寄与していることが推測された。

5. スクラッチアッセイ

表皮水疱症では軽微な刺激によるびらんや水疱形成により、常に皮膚表層に創傷が形成されている状態と考えられる。そこで、蛍光免疫染色で見られたケモカインの染色強度の違いが、損傷を受けた表皮角化細胞から産生されたケモカイン発現の差を反映している可能性を考え、*in vitro* での創傷治癒モデルとしてスクラッチアッセイを行った。ELISA 法およびリアルタイム RT-PCR 法を行いケモカインの発現を調べた。

5.1 ELISA 法

NHEK の培養上清について、スクラッチを行った群の方がスクラッチを行っていない群よりも有意に HMGB1 濃度の上昇がみられた。一方、EBK ではスクラッチ後にわずかな上昇がみられた。さらに、EBK は NHEK よりも HMGB1 の産生が少なく、またスクラッチに対する反応性も弱い傾向がみられた (**Fig 18a**)。CXCL12 ではスクラッチの有無および細胞の種類による有意な変化はみられなかった (**Fig 18b**)。また、CCL19、CCL21、CCL27、CCL28 については ELISA 法による検出値以下であった。

5.2 リアルタイム RT-PCR 法

NHEK と EBK で HMGB1 の mRNA の発現が認められたが、NHEK と EBK およびスクラッチの有無による明らかな違いは認められなかった (**Fig 18c**)。血中濃度に有意差のみられた CCL21 および CXCL12 についても調べたが、検出値以下であった。

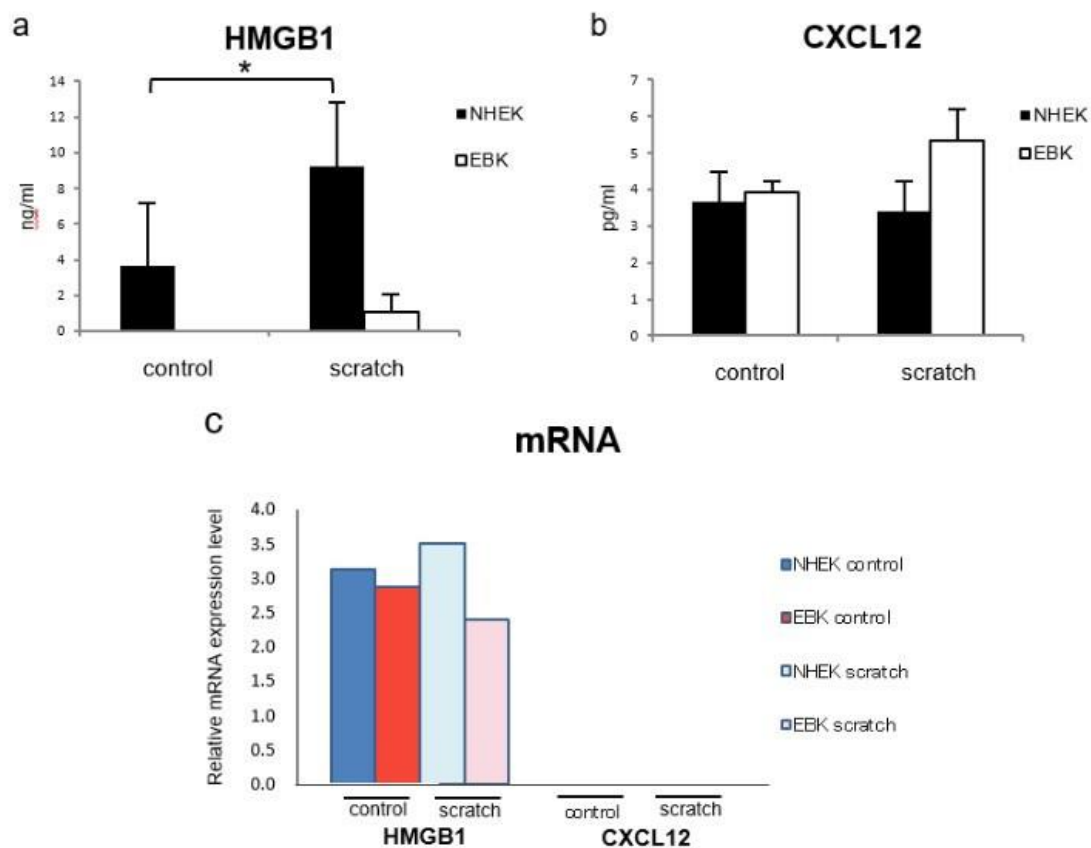


Figure 18 スクラッチアッセイによるケモカイン値と mRNA の発現

(a および b) NHEK および EBK のスクラッチ有りあるいは無しについて、培養上清における HMGB1 と CXCL12 の発現レベルを示した。NHEKs (black bars; $n = 2$)、EBKs (white bars; RDEB, $n = 2$)。結果は平均値および標準誤差で表した。統計学的有意差は paired t-test を用いて解析した。* $P < 0.05$. (c) *HMGB1* および *CXCL12* の mRNA について RT-PCR 解析の結果を示した。データはそれぞれ 3 つずつのサンプルをそれぞれ 3 回施行した値の平均で示した。各 mRNA の発現レベルは NHEK の mRNA の発現レベルの平均値に対する相対的発現レベルで示されている。18S rRNA を内因性コントロールとして用いた。

考察

創傷治癒と組織再生は主に炎症、細胞増殖、再生の3つの過程に分けられる³⁶。創傷部位から産生される様々な成長因子やケモカインを含むサイトカインが、この過程に重要な役割を果たしていることはよく知られている。本研究では特に、骨髄由来細胞の皮膚への動員に関与するとされているケモカインに着目し、解析を行った。今回の結果では、対照群と比較して、表皮水疱症患者の HMGB1 と CXCL12 の血中濃度が有意に高値であり、CCL21 の血中濃度は有意に低値を示した。さらに、CXCL12 と CCL27 の血中濃度は罹患面積に伴いそれぞれ増加・減少する傾向がみられた。

多くのケモカインは感染や炎症時に発現が誘導されるが、CCL19 と CCL21 は胸腺の間質細胞など主に二次リンパ組織に恒常的に発現しており、リンパ器官発生誘導やリンパ球、樹状細胞のリンパ節への流入を調整している³⁷。しかし、感染や炎症時には皮膚などの非リンパ組織においても線維芽細胞や血管平滑筋、内皮細胞などで発現し、血管の炎症や細胞増殖、そして細胞間質の再構成にも関与していることが示唆されている^{28,38-42}。アトピー性皮膚炎や扁平苔癬、graft-versus-host disease (GVHD)患者、関節リウマチや潰瘍性大腸炎、乾癬などの慢性疾患の炎症局所では、CCL21 の発現が報告されている^{43,44}。そのため、心不全や喘息、human immunodeficiency virus (HIV)感染症の病因解明や予後予測にも役立つことが期待されている^{38,45,46}。また、乳がんを始めとする悪性黒色腫、白血病、胃がんなどの悪性腫瘍にもその受容体である CCR7 が発現しており、リンパ節転移に関与していることが報告されている⁴⁷⁻⁵⁰。通常 CCR7 は、主に胸腺内の T 細胞や B 細胞に発現しているが、それぞれの成熟段階によってその発現は調整されている。抗原で活性化された T 細胞は CCR7 の発現を失い、一方で CCR7 を発現していない未成熟な樹状細胞は、外部からの刺激により成熟あるいは活性化すると CCR7 を発現するようになる^{51,52}。このような発現の調整により、胸腺内での適切な位置に誘導され、抗原提示等、その後の免疫反応につながる。また、CCR7 を発現する細胞は、CCL19 や CCL21 の濃度勾配に従って遊走することが知られている⁵³。創傷治癒に関連するものとしては、マウス実験で皮内に 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た²⁴。

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、染色強度が強い検体が多かった。これらの結果からは、表皮水疱症患者では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た。CCL21 については、樹状細胞がリンパ節に遊走する際にケモカインの濃度勾配に従っていることが示されており⁵⁴、表皮水疱症患者においても血中と皮膚組織のケモカインの濃度勾配により、効率よく間葉系幹細胞の皮膚への遊走を促していることが示唆された。

HMGB1 は当初、敗血症において前炎症性サイトカインとして報告された⁵⁵。HMGB1 は真核細胞では恒常的に発現しており、遺伝子の発現やヌクレオソームの安定化に役立っている⁵⁶。一方で、炎症時などには白血球を動員し、炎症性サイトカインを産生させる働きがあり、外傷や感染により細胞が死ぬと、HMGB1 は受動的に放出され、炎症反応や免疫反応を活性化する⁵⁷。また、強いストレスがかかると多種多様な細胞から能動的に産生されうることにもわかってきた⁵⁸。敗血症のみならず、様々なウイルス感染症や関節リウマチ、高脂血症、動脈硬化の病変部、皮膚の損傷部位などでも HMGB1 の上昇がみられており、これら疾患の重症度のマーカーとして有用であることも示唆されている⁵⁹⁻⁶⁴。また、皮膚では HMGB1 により炎症や損傷部位に再生細胞の遊走・増殖が促され、損傷を受けた組織の再生を促進することが報告されている^{33,65}。マウスの実験では、損傷をうけた表皮から産生された HMGB1 により、骨髄由来の間葉系幹細胞が血液循環中に動員され、皮膚への遊走を促していることが示された³³。HMGB1 は、RAGE、toll-like receptors (TLR) など多くの受容体と結合することが知られており⁵⁷、HMGB1 単独では、RAGE や TLR と結合し、サイトカインやケモカインの産生を促し、白血球などの遊走を促す。一方で、骨髄由来細胞の遊走に参与するものとしては CXCR4 が知られており、この受容体だけではなくそのリガンドである CCL12 も必要であることが報告されている。すなわち、HMGB1 が化学誘引物質 (chemoattractant) として細胞の遊走を促すには、CXCR4 を介した CXCL12 との結合によりヘテロコンプレックスを形成する必要がある⁶⁶。

今回の研究では、過去の報告と同様に表皮水疱症患者で HMGB1 の血中濃度が有意に高値を示した。また、皮膚組織においても患者群の方で、より広く表皮全層が染色される検体が多く見られた。しかし、Petrof ら³⁴の報告と異なり、罹患面積との相関関係は見られなかった。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。過去の報告との相違の理由は明らかではないものの、こういった機械的刺激に対する反応性の違いや炎症細胞浸潤の程度など創傷部位の状態の違いが、HMGB1 の血中濃度に影響するのではないかと推測された。さらに、感染症や動脈硬化、糖尿病などを含む慢性疾患の有無などによっても HMGB1 が変動しうることから、全身状態により必ずしも皮膚の罹患面積とは相関しなかったのではないかと考えた。

今回の研究結果では、CXCL12 の血中濃度についても患者群で有意に高値を示し、罹患面積が大きくなるほど高値となる傾向がみられた。皮膚組織では HMGB1 と同様に、患者群の方がより広く表皮全層が染色される検体が多く確認できた。そのため、皮膚で産生された CXCL12 が血中濃度の上昇に寄与しているのではないかと推測された。

多くのケモカインが炎症時に発現誘導されるのに対し、CXCL12 は恒常的にも発現している。特に造血幹細胞のホーミングに重要な役割を果たし、発生過程ではその欠損により、骨髄での造血障害が引き起こされる^{67,68}。CXCL12 は造血系以外にも中枢神経や心臓の発生に重要な役割を果たしており、その欠損は胎生や周産期において致死的である^{67,69}。また、受容体である CXCR4 は HIV-1 が宿主細胞に侵入する際に CD4 とともにウイルス受容体となり、その病態に深く関与しているため、治療戦略としても注目されている^{70,71}。さらに、乳がんを始めとするいくつかの癌細胞の走化性に関与し、転移との関連の可能性も報告されている⁴⁷。その他、CXCL12 は多種多様な組織・臓器の間質細胞および内皮細胞で恒常的に発現しているが、皮膚の損傷や虚血性心疾患、脊椎の損傷時などに発現が増加する^{28,30,31}。皮膚においてはマウスの創傷モデルで全層皮膚欠損により CXCL12 の発現が増加するといわれている^{28,32}。皮膚の熱傷モデルでは、移植した骨髄由来の間葉系幹細胞が、初めは毛包と損傷の境界部に行きあたり、上皮化を促進し、その際に CXCL12/CXCR4 軸が関与していることが報告されている⁷²。多くの研究で報告されているように、CXCL12 はストレス環境下で幹細胞を損傷部位に引き寄せ、骨髄由来幹細胞が損傷部位に遊走し、傷の修復や再生に寄与する^{30-32,73}。また、CCL21 と同様に、CXCL12 による骨髄由来の間葉系幹細胞の遊走は濃度依存性である²³。

HMGB1 による炎症細胞の動員は前述のように CXCL12 とヘテロコンプレックスを形成することにより行われると言われており、今回の結果は、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いう概念と整合すると考えた。

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。炎症時には、CCR10 を発現する細胞、cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) 陽性メモリーT リンパ球やランゲルハンス細胞などに対して走化活性を有する^{74,75}。皮膚に関連する疾患としては、接触皮膚炎、尋常性乾癬、アトピー性皮膚炎、菌状息肉症での上昇や重症度との関連が報告されている⁷⁶⁻⁷⁹。また、CCL27 はマウス実験で、創傷治癒時に骨髄由来細胞が皮膚の損傷部位に遊走するのに強く関連していることが報告されている²⁸。

今回は同じ CCR10 を共有するケモカインとして CCL27 に加え、CCL28 も測定し

た。CCL28 は CCR10 と CCR3 の新しいリガンドとして Pan らが報告した⁸⁰。CCL27 と非常に構造が似ており、アミノ酸の 40% が同じである⁸⁰。上皮細胞を中心にヒトの多種多様な細胞や組織で発現しているが、皮膚での発現は弱く、消化管、気道を含む粘膜や、唾液腺や乳腺などに多く発現しており、CLA 陽性メモリーT リンパ球や好酸球の一部を炎症部位にホーミングさせる⁸⁰。アトピー性皮膚炎、尋常性乾癬、水疱性類天疱瘡などの炎症性皮膚疾患やヘリコバクターピロリ感染による胃炎などにおいて、血中や病変部で上昇している⁸¹⁻⁸³。また、乳がん、悪性黒色腫では CXCR4 および CCR7 を発現しているが、悪性黒色腫の細胞はそれ以外に CCR10 も発現しており、皮膚転移に関与する可能性が示唆されている⁴⁷。CCL27 と CCL28 に関しては、最初のステップとして CCL28 がインテグリン依存性の接着を介し、T 細胞を内皮細胞から動員し、続いて CCL27 の働きにより皮膚の上層へ T 細胞を遊走させるのではないかと推測されている⁸¹。

今回の結果からは、CCL27 と CCL28 の血中濃度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、CCL27 に関しては、罹患面積に応じて低値となる傾向がみられた。これは、CCL27 がほぼ表皮角化細胞からのみ産生されるため、罹患面積が広く、産生源である表皮角化細胞が乏しくなっているためではないかと考えられた。対して CXCL12 では、表皮角化細胞のみならず広く損傷部位の細胞から産生されるため、罹患面積に応じて高値となる傾向がみられたと考えられた。

総括及び結論

本研究において、以下の知見が得られた。

1. 表皮水疱症患者は対照群と比較し、血中の HMGB1 および CXCL12 濃度が有意に高く、一方で CCL21 濃度は低かった。
2. 血中の CXCL12 濃度は表皮水疱症患者の罹患面積に応じて高くなる傾向があり、一方で CCL27 濃度は低くなる傾向が見られた。
3. CCL21、CCL27、HMGB1、CXCL12 について、表皮水疱症患者では対照群と比較し、染色強度の強い皮膚検体が多く確認できた。
4. *in vitro* では、NHEK よりも EBK の方で、スクラッチに対する HMGB1 の上昇が乏しい傾向がみられた。

表皮水疱症は比較的稀な疾患であり、今回の研究のように HMGB1 以外のケモカイン発現について、45 名もの表皮水疱症患者について解析した研究はこれまで報告されていない。骨髓由来幹細胞が損傷部位に遊走する過程についてはケモカイン以外にも多種多様な因子があり、詳細な機序はまだ解明されていないが、今回の研究で変動が示された HMGB1、CXCL12、CCL21、CCL27 などのケモカインが表皮水疱症患者の創傷治癒過程に寄与している可能性が示唆された。モデルマウス等を用いた *in vivo* での更なる検討が必要であるが、これらケモカインを用いて骨髓由来幹細胞の皮膚への遊走や生着率を向上させることにより、創傷治癒の促進や、より効率の良い幹細胞移植療法の開発につながることを期待される。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださり多くのご指導とご助言を賜りました、北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野 清水 宏教授ならびに新潟大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野 阿部理一郎教授、そして直接ご指導いただきました北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野 藤田靖幸講師に深く感謝いたします。

そして本研究にご協力いただきました表皮水疱症患者さまならびに各病院・施設の先生方に厚く御礼申し上げます。

最後に、研究を遂行するにあたりあらゆる面でお力添えいただいた北海道大学大学院医学研究科皮膚科学分野の皆様方に心より感謝申し上げます。とくに中村裕生子さんからは、技術面での多大なるサポートをいただきました。

引用文献

1. 清水宏. あたらしい皮膚科学 (第2版). 中山書店, 東京, 2011.
2. Fine, J. D., Bruckner-Tuderman, L., Eady, R. A. J., Bauer, E. A., Bauer, J. W., Has, C., Heagerty, A., Hintner, H., Hovnanian, A., Jonkman, M. F., Leigh, I., Marinkovich, M. P., Martinez, A. E., McGrath, J. A., Mellerio, J. E., Moss, C., Murrell, D. F., Shimizu, H., Uitto, J., Woodley, D. & Zambruno, G. Inherited epidermolysis bullosa: Updated recommendations on diagnosis and classification. *J. Am. Acad. Dermatol.* **70**, 1103–1126 (2014).
3. Konig, A., Lauharanta, J. & Bruckner-Tuderman, L. Keratinocytes and fibroblasts from a patient with mutilating dystrophic epidermolysis bullosa synthesize drastically reduced amounts of collagen VII: lack of effect of transforming growth factor-beta. *J. Invest. Dermatol.* **99**, 808–812 (1992).
4. Bruckner-Tuderman, L. Dystrophic epidermolysis bullosa: pathogenesis and clinical features. *Dermatol. Clin.* **28**, 107–114 (2010).
5. Woodley, D. T., Keene, D. R., Atha, T., Huang, Y., Lipman, K., Li, W. & Chen, M. Injection of recombinant human type VII collagen restores collagen function in dystrophic epidermolysis bullosa. *Nat. Med.* **10**, 693–695 (2004).
6. Remington, J., Wang, X., Hou, Y., Zhou, H., Burnett, J., Muirhead, T., Uitto, J., Keene, D. R., Woodley, D. T. & Chen, M. Injection of Recombinant Human Type VII Collagen Corrects the Disease Phenotype in a Murine Model of Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *Mol. Ther.* **17**, 26–33 (2009).
7. Woodley, D. T., Wang, X., Amir, M., Hwang, B., Remington, J., Hou, Y., Uitto, J., Keene, D. & Chen, M. Intravenously Injected Recombinant Human Type VII Collagen Homes to Skin Wounds and Restores Skin Integrity of Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *J.*

- Invest. Dermatol.* **133**, 1910–1913 (2013).
8. Ortiz-Urda, S., Thyagarajan, B., Keene, D. R., Lin, Q., Fang, M., Calos, M. P. & Khavari, P. a. Stable nonviral genetic correction of inherited human skin disease. *Nat. Med.* **8**, 1166–1170 (2002).
 9. Woodley, D. T., Remington, J., Huang, Y., Hou, Y., Li, W., Keene, D. R. & Chen, M. Intravenously injected human fibroblasts home to skin wounds, deliver type VII collagen, and promote wound healing. *Mol. Ther.* **15**, 628–635 (2007).
 10. Osborn, M. J., Starker, C. G., McElroy, A. N., Webber, B. R., Riddle, M. J., Xia, L., DeFeo, A. P., Gabriel, R., Schmidt, M., von Kalle, C., Carlson, D. F., Maeder, M. L., Joung, J. K., Wagner, J. E., Voytas, D. F., Blazar, B. R. & Tolar, J. TALEN-based gene correction for epidermolysis bullosa. *Mol. Ther.* **21**, 1151–1159 (2013).
 11. Cutlar, L., Greiser, U. & Wang, W. Gene therapy: Pursuing restoration of dermal adhesion in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Exp. Dermatol.* **23**, 1–6 (2014).
 12. Wong, T., Gammon, L., Liu, L., Mellerio, J. E., Dopping-Hepenstal, P. J. C., Pacy, J., Elia, G., Jeffery, R., Leigh, I. M., Navsaria, H. & McGrath, J. A. Potential of fibroblast cell therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 2179–2189 (2008).
 13. Nagy, N., Almaani, N., Tanaka, A., Lai-Cheong, J. E., Techanukul, T., Mellerio, J. E. & McGrath, J. A. HB-EGF induces COL7A1 expression in keratinocytes and fibroblasts: possible mechanism underlying allogeneic fibroblast therapy in recessive dystrophic epidermolysis Bullosa. *J. Invest. Dermatol.* **131**, 1771–1774 (2011).
 14. Petrof, G., Martinez-Queipo, M., Mellerio, J. E., Kemp, P. & McGrath, J. A. Fibroblast cell therapy enhances initial healing in recessive dystrophic epidermolysis bullosa wounds: Results of a randomized, vehicle-controlled trial. *Br. J. Dermatol.* **169**, 1025–1033 (2013).
 15. Venugopal, S. S., Yan, W., Frew, J. W., Cohn, H. I., Rhodes, L. M.,

- Tran, K., Melbourne, W., Nelson, J. A., Sturm, M., Fogarty, J., Marinkovich, M. P., Igawa, S., Ishida-Yamamoto, A. & Murrell, D. F. A phase II randomized vehicle-controlled trial of intradermal allogeneic fibroblasts for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J. Am. Acad. Dermatol.* **69**, 898–908 (2013).
16. Conget, P., Rodriguez, F., Kramer, S., Allers, C., Simon, V., Palisson, F., Gonzalez, S. & Yubero, M. J. Replenishment of type VII collagen and re-epithelialization of chronically ulcerated skin after intradermal administration of allogeneic mesenchymal stromal cells in two patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Cytotherapy* **12**, 429–431 (2010).
 17. El-Darouti, M., Fawzy, M., Amin, I., Abdel Hay, R., Hegazy, R., Gabr, H. & El Maadawi, Z. Treatment of dystrophic epidermolysis bullosa with bone marrow non-hematopoietic stem cells: a randomized controlled trial. *Dermatol. Ther.* **29**, 96–100 (2016).
 18. Petrof, G., Lwin, S. M., Martinez-Queipo, M., Abdul-Wahab, A., Tso, S., Mellerio, J. E., Slaper-Cortenbach, I., Boelens, J. J., Tolar, J., Veys, P., Ofuya, M., Peacock, J. L., Martinez, A. E. & McGrath, J. A. Potential of Systemic Allogeneic Mesenchymal Stromal Cell Therapy for Children with Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 2319–2321 (2015).
 19. Wagner, J. E., Ishida-Yamamoto, A., McGrath, J. a, Hordinsky, M., Keene, D. R., Woodley, D. T., Chen, M., Riddle, M. J., Osborn, M. J., Lund, T., Dolan, M., Blazar, B. R. & Tolar, J. Bone marrow transplantation for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *N. Engl. J. Med.* **363**, 629–639 (2010).
 20. Tolar, J., Hippen, K. L. & Blazar, B. R. Immune regulatory cells in umbilical cord blood: T regulatory cells and mesenchymal stromal cells. *Br. J. Haematol.* **147**, 200–206 (2009).
 21. Murphy, J. M., Fink, D. J., Hunziker, E. B. & Barry, F. P. Stem Cell Therapy in a Caprine Model of Osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **48**, 3464–3474 (2003).
 22. Shake, J. G., Gruber, P. J., Baumgartner, W. A., Senechal, G.,

- Meyers, J., Redmond, J. M., Pittenger, M. F. & Martin, B. J. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: Engraftment and functional effects. *Ann. Thorac. Surg.* **73**, 1919–1926 (2002).
23. Ji, J. F., He, B. P., Dheen, S. T. & Tay, S. S. W. Interactions of Chemokines and Chemokine Receptors Mediate the Migration of Mesenchymal Stem Cells to the Impaired Site in the Brain After Hypoglossal Nerve Injury. *Stem Cells* **22**, 415–427 (2004).
 24. Sasaki, M., Abe, R., Fujita, Y., Ando, S., Inokuma, D. & Shimizu, H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J. Immunol.* **180**, 2581–2587 (2008).
 25. Fujita, Y., Abe, R., Inokuma, D., Sasaki, M., Hoshina, D., Natsuga, K., Nishie, W., McMillan, J. R., Nakamura, H., Shimizu, T., Akiyama, M., Sawamura, D. & Shimizu, H. Bone marrow transplantation restores epidermal basement membrane protein expression and rescues epidermolysis bullosa model mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 14345–14350 (2010).
 26. Alexeev, V., Uitto, J. & Igoucheva, O. Gene expression signatures of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the cutaneous environment and therapeutic implications for blistering skin disorder. *Cytotherapy* **13**, 30–45 (2011).
 27. Tolar, J., Blazar, B. R. & Wagner, J. E. Concise review: Transplantation of human hematopoietic cells for extracellular matrix protein deficiency in epidermolysis bullosa. *Stem Cells* **29**, 900–906 (2011).
 28. Inokuma, D., Abe, R., Fujita, Y., Sasaki, M., Shibaki, A., Nakamura, H., McMillan, J. R., Shimizu, T. & Shimizu, H. CTACK/CCL27 accelerates skin regeneration via accumulation of bone marrow-derived keratinocytes. *Stem Cells* **24**, 2810–2816 (2006).
 29. Alexeev, V., Donahue, A., Uitto, J. & Igoucheva, O. Analysis of chemotactic molecules in bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the skin: Ccl27-Ccr10 axis as a basis for targeting to

- cutaneous tissues. *Cytotherapy* **15**, 171–184 (2013).
30. Jaerve, A., Schira, J. & Müller, H. W. Concise review: the potential of stromal cell-derived factor 1 and its receptors to promote stem cell functions in spinal cord repair. *Stem Cells Transl. Med.* **1**, 732–739 (2012).
 31. Abbott, J. D., Huang, Y., Liu, D., Hickey, R., Krause, D. S. & Giordano, F. J. Stromal cell-derived factor-1 α plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation* **110**, 3300–3305 (2004).
 32. Xu, X., Zhu, F., Zhang, M., Zeng, D., Luo, D., Liu, G., Cui, W., Wang, S., Guo, W., Xing, W., Liang, H., Li, L., Fu, X., Jiang, J. & Huang, H. Stromal cell-derived factor-1 enhances wound healing through recruiting bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the wound area and promoting neovascularization. *Cells Tissues Organs* **197**, 103–113 (2013).
 33. Tamai, K., Yamazaki, T., Chino, T., Ishii, M., Otsuru, S., Kikuchi, Y., Iinuma, S., Saga, K., Nimura, K., Shimbo, T., Umegaki, N., Katayama, I., Miyazaki, J., Takeda, J., McGrath, J. A., Uitto, J. & Kaneda, Y. PDGFRalpha-positive cells in bone marrow are mobilized by high mobility group box 1 (HMGB1) to regenerate injured epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 6609–6614 (2011).
 34. Petrof, G., Abdul-Wahab, A., Proudfoot, L., Pramanik, R., Mellerio, J. E. & McGrath, J. A. Serum levels of high mobility group box 1 correlate with disease severity in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Exp. Dermatol.* **22**, 433–435 (2013).
 35. Yanai, H. Statcel-The useful add-in software forms on Excel. OMS, 2004.
 36. Singer, A. J. & Clark, R. A. Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.* **341**, 738–746 (1999).
 37. Rot, A. & Von Andrian, U. H. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Annu.*

- Rev. Immunol.* **22**, 891–928 (2004).
38. Damås, J. K., Smith, C., Øie, E., Fevang, B., Halvorsen, B., Wæhre, T., Boullier, A., Breland, U., Yndestad, A., Ovchinnikova, O., Robertson, A. K. L., Sandberg, W. J., Kjekshus, J., Taskén, K., Frøland, S. S., Gullestad, L., Hansson, G. K., Quehenberger, O. & Aukrust, P. Enhanced expression of the homeostatic chemokines CCL19 and CCL21 in clinical and experimental atherosclerosis: Possible pathogenic role in plaque destabilization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 614–620 (2007).
 39. Johnson, L. A. & Jackson, D. G. Inflammation-induced secretion of CCL21 in lymphatic endothelium is a key regulator of integrin-mediated dendritic cell transmigration. *Int. Immunol.* **22**, 839–849 (2010).
 40. Förster, R., Davalos-Missslitz, A. C. & Rot, A. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 362–371 (2008).
 41. Kaur, D., Saunders, R., Berger, P., Siddiqui, S., Woodman, L., Wardlaw, A., Bradding, P. & Brightling, C. E. Airway smooth muscle and mast cell-derived CC chemokine ligand 19 mediate airway smooth muscle migration in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **174**, 1179–1188 (2006).
 42. Pierce, E. M., Carpenter, K., Jakubzick, C., Kunkel, S. L., Evanoff, H., Flaherty, K. R., Martinez, F. J., Toews, G. B. & Hogaboam, C. M. Idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts migrate and proliferate to CC chemokine ligand 21. *Eur. Respir. J.* **29**, 1082–1093 (2007).
 43. Christopherson, K. W. 2nd, Hood, A. F., Travers, J. B., Ramsey, H. & Hromas, R. A. Endothelial induction of the T-cell chemokine CCL21 in T-cell autoimmune diseases. *Blood* **101**, 801–806 (2003).
 44. Weninger, W., Carlsen, H. S., Goodarzi, M., Moazed, F., Crowley, M. A., Baekkevold, E. S., Cavanagh, L. L. & von Andrian, U. H. Naive T cell recruitment to nonlymphoid tissues: a role for endothelium-expressed CC chemokine ligand 21 in autoimmune disease and lymphoid neogenesis. *J. Immunol.* **170**, 4638–4648

- (2003).
45. Yndestad, A., Finsen, A. V., Ueland, T., Husberg, C., Dahl, C. P., Øie, E., Vinge, L. E., Sjaastad, I., Sandanger, Ø., Ranheim, T., Dickstein, K., Kjekshus, J., Damås, J. K., Fiane, A. E., Hilfiker-Kleiner, D., Lipp, M., Gullestad, L., Christensen, G. & Aukrust, P. The homeostatic chemokine CCL21 predicts mortality and may play a pathogenic role in heart failure. *PLoS One* **7**, e33038 (2012).
 46. Damås, J. K., Landrø, L., Fevang, B., Heggelund, L., Frøland, S. S. & Aukrust, P. Enhanced levels of the CCR7 ligands CCL19 and CCL21 in HIV infection: correlation with viral load, disease progression and response to highly active antiretroviral therapy. *AIDS* **23**, 135–138 (2009).
 47. Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., Barrera, J. L., Mohar, A., Verastegui, E. & Zlotnik, A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* **410**, 50–56 (2001).
 48. Wiley, H. E., Gonzalez, E. B., Maki, W., Wu, M. T. & Hwang, S. T. Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **93**, 1638–1643 (2001).
 49. Till, K. J., Lin, K., Zuzel, M. & Cawley, J. C. The chemokine receptor CCR7 and alpha4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. *Blood* **99**, 2977–2984 (2002).
 50. Wang, W., Chen, Y., Zhang, Y. & Hu, T. The regulatory mechanism of CCR7 gene expression and its involvement in the metastasis and progression of gastric cancer. *Tumour Biol.* **34**, 1865–1871 (2013).
 51. Sallusto, F., Mackay, C. R. & Lanzavecchia, A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 593–620 (2000).
 52. Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B. & Palucka, K. Immunobiology of dendritic cells.

- Annu. Rev. Immunol.* **18**, 767–811 (2000).
53. Yoshida, R., Nagira, M., Kitaura, M., Imagawa, N., Imai, T. & Yoshie, O. Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7. *J. Biol. Chem.* **273**, 7118–7122 (1998).
 54. Weber, M., Hauschild, R., Schwarz, J., Moussion, C., de Vries, I., Legler, D. F., Luther, S. a, Bollenbach, T. & Sixt, M. Interstitial dendritic cell guidance by haptotactic chemokine gradients. *Science* **339**, 328–332 (2013).
 55. Wang, H. HMG-1 as a Late Mediator of Endotoxin Lethality in Mice. *Science* **285**, 248–251 (1999).
 56. Celona, B., Weiner, A., Di Felice, F., Mancuso, F. M., Cesarini, E., Rossi, R. L., Gregory, L., Baban, D., Rossetti, G., Grianti, P., Pagani, M., Bonaldi, T., Ragoussis, J., Friedman, N., Camilloni, G., Bianchi, M. E. & Agresti, A. Substantial Histone reduction modulates Genomewide nucleosomal occupancy and global transcriptional output. *PLoS Biol.* **9**, e1001086 (2011).
 57. Andersson, U. & Tracey, K. J. HMGB1 Is a Therapeutic Target for Sterile Inflammation and Infection. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 139–162 (2011).
 58. Tang, D., Kang, R., Zeh, H. J. & Lotze, M. T. High-mobility group box 1, oxidative stress, and disease. *Antioxid. Redox Signal.* **14**, 1315–1335 (2011).
 59. Sundén-Cullberg, J., Norrby-Teglund, A., Rouhiainen, A., Rauvala, H., Herman, G., Tracey, K. J., Lee, M. L., Andersson, J., Tokics, L. & Treutiger, C. J. Persistent elevation of high mobility group box-1 protein (HMGB1) in patients with severe sepsis and septic shock. *Crit. Care Med.* **33**, 564–573 (2005).
 60. Allonso, D., Belgrano, F. S., Calzada, N., Guzmán, M. G., Vázquez, S. & Mohana-Borges, R. Elevated serum levels of high mobility group box 1 (HMGB1) protein in dengue-infected patients are associated with disease symptoms and secondary infection. *J. Clin. Virol.* **55**, 214–219 (2012).

61. Kalinina, N., Agrotis, A., Antropova, Y., DiVitto, G., Kanellakis, P., Kostolias, G., Ilyinskaya, O., Tararak, E. & Bobik, A. Increased expression of the DNA-binding cytokine HMGB1 in human atherosclerotic lesions: Role of activated macrophages and cytokines. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**, 2320–2325 (2004).
62. Porto, A., Palumbo, R., Pieroni, M., Aprigliano, G., Chiesa, R., Sanvito, F., Maseri, A. & Bianchi, M. E. Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques secrete and proliferate in response to high mobility group box 1 protein. *FASEB J.* **20**, 2565–2566 (2006).
63. Taniguchi, N., Kawahara, K. ichi, Yone, K., Hashiguchi, T., Yamakuchi, M., Goto, M., Inoue, K., Yamada, S., Ijiri, K., Matsunaga, S., Nakajima, T., Komiya, S. & Maruyama, I. High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum.* **48**, 971–981 (2003).
64. Jin, D., Wu, Y., Zhao, L., Guo, J., Zhang, K. & Chen, Z. Atorvastatin reduces serum HMGB1 levels in patients with hyperlipidemia. *Exp. Ther. Med.* **4**, 1124–1126 (2012).
65. Straino, S., Di Carlo, A., Mangoni, A., De Mori, R., Guerra, L., Maurelli, R., Panacchia, L., Di Giacomo, F., Palumbo, R., Di Campli, C., Uccioli, L., Biglioli, P., Bianchi, M. E., Capogrossi, M. C. & Germani, A. High-mobility group box 1 protein in human and murine skin: involvement in wound healing. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 1545–1553 (2008).
66. Schiraldi, M., Raucci, A., Muñoz, L. M., Livoti, E., Celona, B., Venereau, E., Apuzzo, T., De Marchis, F., Pedotti, M., Bachi, A., Thelen, M., Varani, L., Mellado, M., Proudfoot, A., Bianchi, M. E. & Uguccioni, M. HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4. *J. Exp. Med.* **209**, 551–563 (2012).
67. Zou, Y. R., Kottmann, a H., Kuroda, M., Taniuchi, I. & Littman, D. R. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* **393**, 595–599 (1998).

68. Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H. & Kishimoto, T. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* **382**, 635–638 (1996).
69. Sierro, F., Biben, C., Martí, L., Woehl, B., Leung, H., Groom, J., Batten, M., Harvey, R. P., Martí, C., Mackay, C. R., Mackay, F., Martínez-Muñoz, L., Mellado, M., Ransohoff, R. M., Li, M., Woehl, B., Leung, H., Groom, J., Batten, M., Harvey, R. P., Martínez-A, C., Mackay, C. R. & Mackay, F. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 14759–14764 (2007).
70. Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E. & Berger, E. A. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**, 872–877 (1996).
71. Bleul, C. C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J. & Springer, T. A. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* **382**, 829–833 (1996).
72. Hu, C., Yong, X., Li, C., Lü, M., Liu, D., Chen, L., Hu, J., Teng, M., Zhang, D., Fan, Y. & Liang, G. CXCL12/CXCR4 axis promotes mesenchymal stem cell mobilization to burn wounds and contributes to wound repair. *J. Surg. Res.* **183**, 427–434 (2013).
73. Landry, Y., Le, O., Mace, K. A., Restivo, T. E. & Beausejour, C. M. Secretion of SDF-1alpha by bone marrow-derived stromal cells enhances skin wound healing of C57BL/6 mice exposed to ionizing radiation. *J. Cell Mol. Med.* **14**, 1594–1604 (2010).
74. Morales, J., Homey, B., Vicari, a P., Hudak, S., Oldham, E., Hedrick, J., Orozco, R., Copeland, N. G., Jenkins, N. a, McEvoy, L. M. & Zlotnik, a. CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 14470–14475 (1999).

75. Reiss, Y., Proudfoot, A. E., Power, C. A., Campbell, J. J. & Butcher, E. C. CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J. Exp. Med.* **194**, 1541–1547 (2001).
76. Moed, H., Boorsma, D. M., Tensen, C. P., Flier, J., Jonker, M. J., Stoof, T. J., von Blomberg, B. M. E., Bruynzeel, D. P., Scheper, R. J., Rustemeyer, T. & Gibbs, S. Increased CCL27-CCR10 expression in allergic contact dermatitis: Implications for local skin memory. *J. Pathol.* **204**, 39–46 (2004).
77. Campanati, A., Goteri, G., Simonetti, O., Ganzetti, G., Giuliodori, K., Stramazzotti, D., Morichetti, D., Bernardini, M. L., Mannello, B., Fabris, G. & Offidani, A. CTACK /CCL27 expression in psoriatic skin and its modification after administration of etanercept. *Br. J. Dermatol.* **157**, 1155–1160 (2007).
78. Kakinuma, T., Saeki, H., Tsunemi, Y., Fujita, H., Asano, N., Mitsui, H., Tada, Y., Wakugawa, M., Watanabe, T., Torii, H., Komine, M., Asahina, A., Nakamura, K. & Tamaki, K. Increased serum cutaneous T cell-attracting chemokine (CCL27) levels in patients with atopic dermatitis and psoriasis vulgaris. *J. Allergy Clin. Immunol.* **111**, 592–597 (2003).
79. Goteri, G., Rupoli, S., Campanati, A., Zizzi, A., Picardi, P., Cardelli, M., Giantomassi, F., Canafoglia, L., Marchegiani, F., Mozzicafreddo, G., Brandozzi, G., Stramazzotti, D., Ganzetti, G., Lisa, R., Simonetti, O., Offidani, A., Federici, I., Filosa, G. & Leoni, P. Serum and tissue CTACK/CCL27 chemokine levels in early mycosis fungoides may be correlated with disease-free survival following treatment with interferon alfa and psoralen plus ultraviolet A therapy. *Br. J. Dermatol.* **166**, 948–952 (2012).
80. Pan, J., Kunkel, E. J., Gossler, U., Lazarus, N., Langdon, P., Broadwell, K., Vierra, M. A., Genovese, M. C., Butcher, E. C. & Soler, D. Cutting Edge: A Novel Chemokine Ligand for CCR10 And CCR3 Expressed by Epithelial Cells in Mucosal Tissues. *J. Immunol.* **165**, 2943–2949 (2000).

81. Ezzat, M. H. M., Sallam, M. A. & Shaheen, K. Y. A. Serum mucosa-associated epithelial chemokine (MEC/CCL28) in atopic dermatitis: A specific marker for severity. *Int. J. Dermatol.* **48**, 822–829 (2009).
82. Kagami, S., Kakinuma, T., Saeki, H., Tsunemi, Y., Fujita, H., Sasaki, K., Nakamura, K., Takekoshi, T., Kishimoto, M., Mitsui, H., Komine, M., Asahina, A. & Tamaki, K. Increased serum CCL28 levels in patients with atopic dermatitis, psoriasis vulgaris and bullous pemphigoid. *J. Invest. Dermatol.* **124**, 1088–1090 (2005).
83. Hansson, M., Hermansson, M., Svensson, H., Elfvin, A., Hansson, L. E., Johnsson, E., Sjöling, Å. & Quiding-Järbrink, M. CCL28 is increased in human *Helicobacter pylori*-induced gastritis and mediates recruitment of gastric immunoglobulin A-secreting cells. *Infect. Immun.* **76**, 3304–3311 (2008).