

## 審査の結果の要旨

氏名 服部尚子

本研究は、強力な細胞増殖抑制因子である Interferon- $\gamma$ が、炎症性および増殖性ケラチンであるケラチン K6 の発現をどのような機序で増加させるかを検討している。培養表皮角化細胞の系では、炎症性ケラチンの増加の証明が困難なので、正常ヒト皮膚の *ex vivo* の系を用いて、その発現の仕方を検討し、また、正常表皮角化細胞の cell line である HaCaT 細胞を利用して、発現の機序を検討し、以下の結果を得ている。

1. 正常ヒト皮膚 *ex vivo* 標本のケラチン発現様式は、無刺激では 48 時間まで正常ヒト皮膚と同様であり、IFN- $\gamma$ 刺激による K17 の発現誘導を免疫染色、ウェスタンブロット法、mRNA の RT-PCR にて検証できた。このことから、正常ヒト皮膚 *ex vivo* 標本は炎症性ケラチン発現の実験系に適していることが実証された。
2. IFN- $\gamma$ で刺激した正常ヒト皮膚 *ex vivo* 標本の免疫染色では、K6 は suprabasal に発現がみられた。また、正常ヒト皮膚 *ex vivo* 標本および HaCaT 細胞より抽出したケラチン蛋白のウェスタンブロット法により、K6 が IFN- $\gamma$ 刺激により有意に増加していることが示された。
3. HaCaT 細胞、DJM 細胞、正常ヒト培養表皮角化細胞を IFN- $\gamma$ で刺激すると細胞の増殖が抑制されることが示された。
4. ドミナントネガティブ STAT1 遺伝子を HaCaT 細胞にトランスフェクションすると IFN- $\gamma$ による K6/K17 の発現誘導は有意に抑制され、細胞増殖は抑制されなかった。これにより、IFN- $\gamma$ の K6 誘導および細胞増殖抑制に STAT1 が関与していることが示された。
5. HaCaT 細胞上清中の IL-1 $\alpha$ 濃度は、IFN- $\gamma$ 刺激により 50pg/ml まで上昇したが、この濃度の IL-1 $\alpha$ 単独では、K6 は誘導されなかった。しかしながら、上清中の IL-1 $\alpha$ をブロックすると、IFN- $\gamma$ で刺激しても K6 は誘導されなかった。これにより、IFN- $\gamma$ と IL-1 $\alpha$ とは K6 の誘導に関してシナジスティックに働いている可能性が示唆された。
6. NF $\kappa$ B のアンチセンスオリゴヌクレオチドを HaCaT 細胞に加えると、IFN- $\gamma$ による

K6 の誘導が抑制された。これにより、IFN- $\gamma$ による K6 の誘導の経路に NF $\kappa$ B が関与していることが示唆された。

7. IFN- $\gamma$ で刺激した正常ヒト皮膚 *ex vivo* 標本より抽出した RNA 中の K6 の mRNA は、RT-PCR 法により増加していることが示された。
8. 正常ヒト培養表皮角化細胞を IFN- $\gamma$ で刺激すると、K6 のプロモーター活性が濃度依存的に上昇することが示された。

以上、本論文は正常ヒト皮膚 *ex vivo* システムが、炎症性ケラチンの発現誘導の系として有用であることを実証し、IFN- $\gamma$ が正常ヒト皮膚 *ex vivo* システム、正常ヒト培養表皮角化細胞および HaCaT 細胞で K6 を誘導することを蛋白レベル、mRNA レベルおよびプロモーターレベルで証明した。さらに、IFN- $\gamma$ による K6 の発現誘導には NF $\kappa$ B と STAT1 の両者が必要であり、両者がシナージスティックに働いていることが示唆された。本研究は表皮角化細胞におけるケラチン発現の機序の解明、および炎症性皮膚疾患の治療に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。