

【課程一 2】

審査の結果の要旨

氏名 唐川 大

本研究は表皮特異的に発現し、皮膚の炎症形成に必須のケモカインである Cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) /CCL27 の表皮角化細胞における産生制御機構をあきらかにするため、正常ヒト表皮角化細胞 (NHK) および表皮角化細胞株 (HaCaT 細胞) を用いた *in vitro* 培養系を用いて解析を試みたもので、以下の結果を得ている。

1. 表皮角化細胞における CTACK 産生に対する $\text{TNF}\alpha$ および $\text{IFN}\gamma$ の作用につき、enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA) 法およびリアルタイム逆転写 polymerase chain reaction (リアルタイム PCR) 法にてタンパクレベル、messenger ribo nucleic acid (mRNA) レベルでの評価を行った。表皮角化細胞における CTACK 産生は $\text{TNF}\alpha$ により誘導、 $\text{IFN}\gamma$ によりタンパクレベル、mRNA レベル共に、その誘導が抑制された。化学的阻害

剤を用いて、そのシグナル伝達について検討を行った。TNF α による CTACK 産生誘導は、nuclear factor (NF) κ B あるいは p38 mitogen-activated protein (MAP) キナーゼの阻害により抑制された。また、extracellular signal-regulated kinase (ERK) の阻害により、IFN γ による CTACK 産生誘導抑制が解除された。しかし、既知の NF κ B 結合配列を有するルシフェラーゼベクター (pNF κ B-luc vector) を用いたルシフェラーゼアッセイにおいて、IFN γ は TNF α による NF κ B 活性化を抑制しなかった。

2. TNF α および IFN γ による CTACK 産生制御機構における Janus kinase (JAK) -signal transducers and activators of transcription (STAT) 系の関与について調べた。STAT1、3 のリン酸化を認識する抗体をもちいたウェスタンブロット法にて、IFN γ 刺激による STAT1、3 のリン酸化が確認された。既知の STAT1、3 結合配列を持つルシフェラーゼベクターを使用したルシフェラーゼアッセイで STAT1、3 の活性化が示された。アデノウイルスベクターにてドミナントネガティブおよびワイルドタイプの STAT1・3 を導入し CTACK の産生量を調べた。TNF α による CTACK 産生誘導はワイルドタイプ STAT3 の導入により抑制され、ドミナントネガティブ STAT1 の導入により IFN γ による CTACK 産生誘導抑制が解除された。化学的阻害剤を用いた JAK の広汎な阻害および JAK3 阻害により、

IFN γ による CTACK 産生誘導抑制が解除された。

3. リアルタイムPCR法を用いたトランスグルタミナーゼ1およびケラチン1の mRNA 量を指標とする評価にて、細胞密度の上昇、培地中カルシウムイオン濃度の上昇により表皮角化細胞の分化が引き起こされることを確認したのち、CTACK 産生制御における表皮角化細胞の分化の影響について検討したところ、IFN γ による CTACK 産生誘導抑制は表皮角化細胞の分化に伴って解除された。
4. 阻害剤を用いた検討にて TNF α および IFN γ による CTACK 産生制御機構における EGF 受容体の関与を明らかにした。ELISA 法を用いて IFN γ 刺激による EGF 受容体リガンドの産生が確認された。

以上、本論文は皮膚における炎症反応に重要な役割を果たすケモカインである CTACK の産生において、IFN γ が EGF 受容体を介して CTACK 産生を抑制する制御系を明らかにした。本研究は、IFN γ の表皮角化細胞からのケモカイン産生に対する新たな作用パターンを明らかにし、皮膚炎症の制御機構の解明に重大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。