

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 川 嶋 智 彦

本研究は、今まで痛風の原因物質であること・皮膚疾患においては乾癬でしかその報告がなかった尿酸結晶の、皮膚免疫応答や多くの皮膚疾患への関与を明らかにするために、表皮内での形成沈着の有無・表皮内に唯一局在する抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞に対する影響を検討したものであり、以下のような結果を得ている。

1. マウスの耳の皮膚搔破刺激後に、4～6時間をピークとして表皮内に尿酸結晶形成が認められることが偏光顕微鏡による観察により示された。
2. 精製したランゲルハンス細胞を尿酸結晶と *in vitro* で共培養したものを電子顕微鏡にて観察を行なうことで、ランゲルハンス細胞は尿酸結晶を細胞質内に貪食作用により取り込み消化していることが示された。
3. 皮膚搔破刺激後の皮膚を電子顕微鏡にて観察することにより、表皮内に形成した尿酸結晶が *in vivo* においても実際にランゲルハンス細胞に取り込まれていることが示された。
4. 逆転写PCR・免疫ブロットを用いてランゲルハンス細胞がNALP3 inflammasomeの構成要素を発現していること、ELISAによる測定にてMSU刺激によりランゲルハンス細胞からNALP3 inflammasomeを介してIL-18分泌は促進されるが、IL-1 β 分泌は影響を受けないことが示された。
5. 貪食阻害剤サイトカラシンD・細胞膜プリン受容体P2Y₆選択的阻害剤により、それぞれ尿酸結晶刺激によるランゲルハンス細胞からのIL-18分泌がほぼ完全に抑制されたことから、尿酸結晶刺激のランゲルハンス細胞への刺激受容においては少なくとも貪食作用と細胞膜P2Y₆受容体の関与があることが示された。
6. 成熟型IL-18は脾臓bulk細胞からIFN- γ 産生誘導作用があることを利用したバイオアッセイと免疫ブロットから、尿酸結晶刺激によりランゲルハンス細胞から産生誘導されたIL-18は成熟型であることが示された。
7. ランゲルハンス細胞のIL-18 mRNA発現は、IL-18産生分泌とともに逆に発現低下が認められ、負のフィードバックによる調節を受けている可能性が示された。
8. ランゲルハンス細胞の表面分子発現に関しては、尿酸結晶刺激単独ではCD39の発現低下促進・CXCR4発現促進、TNF- α と尿酸結晶の共刺激下ではCD54・CCR7の発現促進が認められたが、MHC-classII・CD40・CD80・CD86はその発現に尿酸結晶は影響を与えな

いことが示された。

9. ランゲルハンス細胞はIL-18受容体 α 鎖・ β 鎖両方を発現しており、ランゲルハンス細胞の成熟とともに α 鎖は発現上昇・ β 鎖は発現低下していること、尿酸結晶刺激によりランゲルハンス細胞から分泌されたIL-18がランゲルハンス細胞自身に自己分泌・傍分泌形式で作用しうることが示された。
10. IL-18ノックアウトマウス・野生型マウスから精製したランゲルハンス細胞をそれぞれ尿酸結晶で刺激・無刺激で培養したものを野生型マウスのhind padへ皮下注射し、同側の鼠径・膝窩リンパ節への遊走数を比較したところ、IL-18ノックアウトマウス由来のランゲルハンス細胞では尿酸結晶刺激による遊走促進作用が9割ほど抑制されていた。よって、IL-18はランゲルハンス細胞自身に自己分泌・傍分泌形式で作用し遊走促進作用を誘導することが示された。
11. IL-18ノックアウトマウス・野生型マウス由来のランゲルハンス細胞におけるEカドヘリン発現の差異・野生型由来のランゲルハンス細胞における尿酸結晶刺激の有無によるEカドヘリン発現低下速度の差異をフローサイトメトリーによって評価したところ、尿酸結晶刺激はIL-18分泌促進を介してランゲルハンス細胞のEカドヘリン発現低下作用を有することが示された。
12. IL-18ノックアウトマウス・野生型マウス由来のランゲルハンス細胞を尿酸結晶刺激下・無刺激下培養し、そのRhoA・Rac1発現量を半定量的逆転写PCRにて評価したところ、尿酸結晶刺激はIL-18分泌促進を介してランゲルハンス細胞のRhoA発現促進・Rac1発現低下作用を呈することが示された。
13. DNFBを用いた皮膚接触過敏反応モデル(Th1型)において、惹起相にて尿酸結晶を追加塗布することにより、接触過敏反応が増強することが示された。
14. 尿酸結晶刺激により、ランゲルハンス細胞からはIL-6・IL-10・活性型TGF- β が濃度依存的に分泌促進されること・抗CD40抗体共存下においてのみ尿酸結晶濃度5~50 μ g/mlを極大としてIL-12p40・IL-23・IL-27p28が分泌促進されることがわかり、尿酸結晶刺激50 μ g/ml付近を境として、低濃度ではTh17+Th1・高濃度ではTh17+Th2を誘導する可能性があることが示された。
15. マウスケラチノサイトの細胞株であるPAM212から、尿酸結晶刺激により濃度依存的にIL-1 α 分泌促進が認められることが示された。

以上、本論文は搔破刺激という単純な外部からの物理刺激により、容易に表皮内に尿酸結晶が沈着すること、沈着した尿酸結晶はランゲルハンス細胞に作用し所属リンパ節への遊走を促進し、皮膚接触過敏反応の増幅などの皮膚免疫応答に影響を与えることを明らかにした。本研究は今までほとんど未知に近かった、傷害細胞由来の尿酸結晶形成の皮膚免疫応答へ与える影響・皮膚疾患への関与の解明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。