

氏名	たかはし としや 高橋 隼也
学位の種類	博士 (医学)
学位授与年月日	平成 25 年 3 月 27 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学位論文題目	In vivo imaging demonstrates ATP release from murine keratinocytes and its involvement in cutaneous inflammation after tape-stripping (テープストリッピング後のケラチノサイトから放出される ATP の生体内イメージングおよびその皮膚炎症への作用)
論文審査委員	主査 教授 相場 節也 教授 柴原 茂樹 教授 一ノ瀬正和

論文内容要旨

テープストリッピングは皮膚基礎研究において表皮傷害を引き起こす手技であり、乾癬やアトピー性皮膚炎、エリテマトーデスなどの疾患モデルマウスや、乾癬患者にテープストリッピングを施行すると皮膚病変を生じること(ケブネル現象)が知られている。しかし、テープストリッピングがこれらの反応を引き起こす機序は明らかでない。一方、アデノシン三リン酸(ATP)は傷害された細胞から放出される内在性アジュバントで炎症惹起作用をもつ。特に danger signal としてインフラマソームを活性化し、インターロイキン(IL)-1 β や IL-18 の分泌を誘導することが知られている。これまで、生体外(in vitro)における角化細胞からの ATP 放出は様々なストレスモデルにおいて観察されているが、生体内(in vivo)での放出を実証する報告は限られている。

細胞外 ATP (eATP) を生体内で視覚化し、その皮膚炎症への作用を調べるために、私たちは、緑色発光性ルシフェラーゼ (Eluc) を樹脂により固相化し、拡散を防いだ固相化ルシフェラーゼ (Eluc-agarose) を開発した。

まず BALB/c マウス (8-12 週) の背部皮膚を剃毛し、ルシフェリンを腹腔内投与した後、Eluc-agarose と ATP を混合しごく浅く皮下注射したうえで IVIS imaging system (Xenogen) で観察したところ、安定した発光が観察できた。これにより Eluc-agarose の信頼性が確認された。次に我々は、マウス背部皮膚にテープストリッピングを行った後に Eluc-agarose を皮下注射し、傷害された角化細胞から放出された eATP の観察を試みたところ、経表皮水分損失 (TEWL) が 100-140g/m²h の範囲にまで上昇する程度のテープストリッピングを施行したとき、ストリッピング後 1 分から約 20 分後にかけて強い発光が観察された。この発光はアデノシン・ジフォスファターゼであるアピラーゼの局所投与によって抑制された。興味深いことに、より多い回数 of テープストリッピングを施

行し、TEWL が $140\text{g}/\text{m}^2\text{h}$ 以上となった部位では発光を認めなかった。病理組織学的検討を加えたところ、良好な発光を観察した皮膚では角層への炎症細胞集積、表皮の残存、真皮への密な炎症細胞浸潤を認めた。アピラーゼを投与した部位では、この炎症細胞浸潤も抑制されていた。浸潤している炎症細胞の大部分は好中球であった。一方、TEWL が $140\text{g}/\text{m}^2\text{h}$ 以上となった皮膚では角層への炎症細胞集積は認めず、表皮は壊死または消失し、真皮浅層には炎症細胞浸潤を欠いていた。このことより、テープストリッピング後に放出された eATP により、炎症細胞浸潤が起こっている可能性が示された。最後に我々は、マウスにおける好中球の代表的な走化因子である CXCL1, 2, 3, 5 がテープストリッピングにより誘導されるかを定量 PCR により調べた。TEWL が $100\sim 140\text{g}/\text{m}^2\text{h}$ となった皮膚では、CXCL1, 2, 3 の発現が有意に上昇していた。CXCL5 は変化しなかった。TEWL が $140\text{g}/\text{m}^2\text{h}$ 以上となった皮膚では発現上昇を認めなかった。さらにアピラーゼ投与した後にストリッピングを施行すると TEWL が $100\sim 140\text{g}/\text{m}^2\text{h}$ となっても発現上昇はみられなかった。このことは CXCL1, 2, 3 発現上昇が eATP の上昇に依存することを示すものである。

以上の結果より、Eluc-agarose が生体内での ATP イメージングに有用なデバイスであること、eATP がテープストリッピング後の走化因子の誘導、および引き続いて起こる炎症細胞浸潤に重要な役割を果たすことが示された。

審査結果の要旨

博士論文題目 **In vivo imaging demonstrates ATP release from murine keratinocytes and its involvement in cutaneous inflammation after tape-stripping**

(テープストリッピング後のケラチノサイトから放出される ATP の生体内イメージングおよびその皮膚炎症への作用).....

所属専攻・分野名 医科学専攻 皮膚科学 分野.....

学籍番号 氏名 高橋 隼也.....

テープストリッピングは皮膚基礎研究において表皮傷害を引き起こす手技であり、乾癬やアトピー性皮膚炎、エリテマトーデスなどの疾患モデルマウスや、乾癬患者にテープストリッピングを施行すると皮膚病変を生じること(ケブネル現象)が知られている。しかし、テープストリッピングがこれらの反応を引き起こす機序は明らかでない。一方、アデノシン三リン酸(ATP)は傷害された細胞から放出される内在性アジュバントで炎症惹起作用をもつ。特に danger signal としてインフラマソームを活性化し、インターロイキン(IL)-1 β やIL-18の分泌を誘導することが知られている。これまで、生体外(in vitro)における角化細胞からのATP放出は様々なストレスモデルにおいて観察されているが、生体内(in vivo)での放出を実証する報告は限られている。細胞外ATP(eATP)を生体内で視覚化し、その皮膚炎症への作用を調べるために、私たちは、緑色発光性ルシフェラーゼ(Eluc)を樹脂により固相化し、拡散を防いだ固相化ルシフェラーゼ(Eluc-agarose)を開発した。

まずBALB/cマウス(8-12週)の背部皮膚を剃毛し、ルシフェリンを腹腔内投与した後、Eluc-agaroseとATPを混合しごく浅く皮下注射したうえでIVIS imaging system (Xenogen)で観察したところ、安定した発光が観察できた。これによりEluc-agaroseの信頼性が確認された。次に我々は、マウス背部皮膚にテープストリッピングを行った後にEluc-agaroseを皮下注射し、傷害された角化細胞から放出されたeATPの観察を試みたところ、経表皮水分損失(TEWL)が100~140g/m²hの範囲にまで上昇する程度のテープストリッピングを施行したとき、ストリッピング後1分から約20分後にかけて強い発光が観察された。この発光はアデノシン・ジフォスファターゼであるアピラーゼの局所投与によって抑制された。興味深いことに、より多い回数のテープストリッピングを施行し、TEWLが140g/m²h以上となった部位では発光を認めなかった。病理組織学的検討を加えたところ、良好な発光を観察した皮膚では角層への炎症細胞集積、表皮の残存、真皮への密な炎症細胞浸潤を認めた。アピラーゼを投与した部位では、この炎症細胞浸潤も抑制されていた。浸潤している炎症細胞の大部分は好中球であった。一方、TEWLが140g/m²h以上となった皮膚では角層への炎症細胞集積は認めず、表皮は壊死または消失し、真皮浅層には炎症細胞浸潤を欠いていた。このことより、テープストリッピング後に放出されたeATPにより、炎症細胞浸潤が起こっている可能性が示された。最後に我々は、マウスにおける好中球の代表的な走化因子であるCXCL1, 2, 3, 5がテープストリッピングにより誘導されるかを定量PCRにより調べた。TEWLが100~140g/m²hとなった皮膚では、CXCL1, 2, 3の発現が有意に上昇していた。CXCL5は変化しなかった。TEWLが140g/m²h以上となった皮膚では発現上昇を認めなかった。さらにアピラーゼ投与した後にストリッピングを施行するとTEWLが

100~140g/m²h となっても発現上昇はみられなかった。このことは CXCL1, 2, 3 発現上昇が eATP の上昇に依存することを示すものである。

以上の結果より、Eluc-agarose が生体内での ATP イメージングに有用なデバイスであること、eATP がテープストリッピング後の走化因子の誘導、および引き続いて起こる炎症細胞浸潤に重要な役割を果たすことが示された。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。