

## 学位論文審査結果の要旨

氏名	宇都宮 亮
審査委員	主査 増本 純也
	副査 安川 正貴
	副査 北澤 理子
	副査 田内 久道
	副査 小林 剛

論文名 ヘパリン類似物質の抗炎症作用の解析

### 審査結果の要旨

【研究内容のまとめ】 皮膚のケラチノサイトは免疫担当細胞と協働して皮膚炎症を惹起する。アトピー性皮膚炎では、皮膚のバリア機能が破綻しており、ハウスダストなどの環境刺激に暴露されやすい。申請者らは先行論文において、ハウスダストがケラチノサイトで炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$ のプロセッシングに関わる NLRP3 インフラマソームを活性化して、炎症性サイトカインの産生に関わることを報告している。一方、ヘパリン類似物質は保湿剤外用薬の有効成分であり、乾燥皮膚の治療に広く用いられている。しかし、ヘパリン類似物質軟膏によって乾燥の関与しない疾患である扁平苔癬が治癒した報告がある。また、ヘパリン類似物質が関節リウマチの軟骨細胞からの炎症性サイトカインの放出を抑制することが報告されている。そこで、申請者は、ヘパリン類似物質に抗炎症作用があると考え、そのメカニズムを解明する目的で実験を行なった。

実験は、ヒト皮膚から採取したケラチノサイトの一次培養細胞と、living skin equivalent モデルという表皮の分化を模倣したケラチノサイトの3次元培養系を用いて行なった。ケラチノサイトから IL-1 $\beta$ を産生させる刺激は、コナヒョウヒダニ由来のアレルゲンである Der p を用いた。培養上清中の IL-1 $\beta$ 量は ELISA 法で測定した。また、この時のケラチノサイト内の IL-1 $\beta$ メッセンジャーRNA 量をリアルタイム PCR 法で測定した。ケラチノサイトの増殖能は MTT アッセイ

法で評価し、死細胞の評価はトリパンプルー色素排除試験法で行なった。シグナル伝達機構に関わるタンパク質のリン酸化の評価はウェスタンブロット法によって行なった。

その結果、Der p 刺激に対するケラチノサイト培養上清中の IL-1 $\beta$ 濃度は、ヘパリン類似物質の添加後 1 時間で有意に抑制された。一方で、カスパーゼ 1 の培養上清中濃度は Der p 刺激で上昇したが、ヘパリン類似物質添加の有無で、有意な違いはみられなかった。また、Der p 刺激に対するケラチノサイトの IL-1 $\beta$ メッセンジャーRNA の発現量はヘパリン類似物質の添加容量依存性に低下した。Der p 刺激を受けたケラチノサイトでは、ERK、MAPK、p38 のリン酸化は抑制されていたが、JNK、Ik-B のリン酸化に有意な違いはみられなかった。Der p 刺激によるケラチノサイトからの IL-1 $\beta$ 産生は MEK 阻害剤である U0126、p38 阻害剤である SB203580 で有意に抑制された。

以上の結果から、Der p 刺激によるケラチノサイトからの IL-1 $\beta$ 産生に対するヘパリン類似物質の作用は、インフラマソームへの直接作用ではなく、IL-1 $\beta$ の転写を制御する ERK、MAPK、p38 の活性化の抑制によるものと結論した。

本論文に対する公開審査会は平成 30 年 2 月 6 日に開催された。申請者から研究内容が英語で口頭発表された後に、審査委員から本研究に関連する以下の質問がなされた。1)ヘパリン類似物質の皮膚への浸透性をどう評価しているか。2) *in vivo* の実験で、ヘパリン類似物質の保湿効果と抗炎症効果をどのように区別して評価しているのか。3) Living skin equivalent モデルでのヘパリン類似物質のデリバリーはどうなっているのか。4) ヘパリン類似物質は均一な物質なのか。5) 細胞傷害のアッセイ方法を複数使っているが、違いは何か。6) ヘパリン類似物質の抗炎症作用は抗凝固作用と関係はないのか。7) ヘパリン類似物質は表皮のどの層のケラチノサイトに作用しているのか。8) どのような受容体を介した IL-1 $\beta$ 産生を抑制しているのか。9) 後発品などの製造元による作用の違いはあるのか。10) ハウスダストのアレルゲンはどのようにケラチノサイトに取り込まれるのか。11) IL-1 $\beta$ 欠失マウスではアトピー性皮膚炎にならないのか。12) マクロファージでは IL-1 $\beta$ 産生の際、ピロプトーシスという細胞死を伴うが、ケラチノサイトではどうか。13) ヘパリン類似物質の糖鎖の長さの違いや製品のエンドトキシンの混入による影響を見ている可能性は考えられるか。14) ヘパリン類似物質の抗炎症作用として IL-1 $\beta$ 以外のサイトカインが重要である可能性は考えられるか。

これらに対して申請者は、質問の意図を十分に理解した上で、詳細かつ明解に応答した。本論文は、ケラチノサイトでの IL-1 $\beta$ 産生の新しい制御系を示した上で、その制御系に作用するヘパリン類似物質の抗炎症作用を初めて明らかにした。アトピー性皮膚炎の病態解明と治療に重要な知見を含んでおり、今後の研究の発展が期待される。審査委員は一致して本論文を高く評価し、博士(医学)の学位論文に値するものと結論した。