




学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 520 号	氏 名	足 立 育 子
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	横井 功 	
	副査氏名	吉岡 秀克 	
	副査氏名	加島 健司 	
<p>論文題目 Expressions of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are directly influenced by permeability barrier abrogation and inflammatory cytokines and depressed PPARα modulates expressions of chemokines and epidermal differentiation-related molecules in keratinocytes. (角化細胞におけるペルオキシソーム増殖剤活性化受容体の発現は、透過性バリア破壊と炎症性サイトカインにより影響を受け、α型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体の低下によってケモカインと分化関連分子の発現が変化する)</p> <p>論文掲載雑誌名 Experimental Dermatology 22, 599-608, 2013.</p> <p>論文要旨 核内受容体のひとつでありα、β/δ、γの3つのサブタイプが知られる peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs)の活性化は表皮角化細胞の分化や脂質合成を促進することにより皮膚バリア機能を強化すると共に、炎症反応を抑制することが判明し、PPARs はアトピー性皮膚炎(AD)の病態において重要な役割を担っている可能性が示唆された。本研究では AD の病態における PPARs の意義を探る目的で、皮膚バリア機能とアレルギー性炎症の両者に関与する表皮角化細胞を使用し、PPARs 発現に影響を与える因子、及び細胞機能に対する PPAR α 低下の影響を検討した。 <方法> 3次元培養皮膚の表面をアセトンで処理して皮膚バリアを破壊して刺激して表皮での PPARs の発現量を検討すると共に、培養表皮角化細胞を TNF-α、IFN-γ及び IL-4 で刺激して PPARs の発現変化を観察した。また、ケモカイン(TARCとRANTES)及び表皮分化関連分子(transglutaminase-1とloricrin)の発現に対する PPARαの影響を siRNA によって PPARαをノックダウンした培養表皮角化細胞を使用し検討した。PPARs、ケモカイン、及び表皮分化関連分子の発現は、半定量的 RT-PCR 法及びウェスタンブロッティング法又は ELAISA 法にて測定した。 <結果と考察> 皮膚バリア破壊刺激では PPARαと PPARγの発現が低下し、PPARβ/δの発現が亢進した。また、TNF-αと IFN-γにより PPARαと PPARβ/δの発現は亢進したが IL-4 は亢進を阻害した。一方、PPARγの発現は TNF-αと IFN-γの影響を受けなかったが、IL-4により亢進した。さらに、PPARαをノックダウンした培養表皮角化細胞では、TARCとRANTESの発現が増強し transglutaminase-1とloricrinの発現が低下した。 以上の結果は、AD患者の病変部で低下している PPARαの発現のみが、皮膚バリア機能破壊と Th2 サイトカインである IL-4 の両者から負の影響を受けていることから、AD 病変部での PPARαの発現低下は、AD の病態における皮膚バリア機能低下と Th2 の関与したアレルギー炎症という両側面により影響を受けた結果と推察される。また、PPARαの発現低下により、表皮角化細胞はケモカインの発現亢進を介して炎症反応を増強させる方向に機能変化すると同時に、皮膚バリア機能構築に重要な分化関連分子の発現低下を介して皮膚バリア機能を低下させる方向にも機能変化することが示唆された。 本研究は、AD で認められる表皮角化細胞での皮膚バリア機能異常とアレルギー性炎症の両側面間の悪循環に PPARαの低下が深く関与することを示したものであり、AD の新治療法開発戦略の標的を示唆する重要な知見である。このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
~~学力の確認~~

審査区分 課・論	第 520 号	氏名	足立 育子
審査委員会委員	主査氏名	横井 功 	
	副査氏名	吉岡 秀克 	
	副査氏名	加島 健司 	
<p>学位申請者は本論文の公开发表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. NC/Ngaマウスとはいかなる血統でその特徴は何か。 2. 正常のkeratinocyteとHaCaT細胞を使い分けた理由は何か。 3. 皮膚バリアを破壊するためにアセトンを2回に分けて塗布しているが、これはなぜか。 4. TNF-α、IFN-γを同時に作用させている理由は何か。 5. 使用したskin evaporative water recorder は皮膚透過水量をどのようにして測定するのか。 6. 測定時間を決定するために、mRNAおよびタンパク定量 (Western blot、ELISA) を経時的に調べた予備データはあるか。 7. 皮膚透過水量に変化は認められたのか。 8. MTT assay の結果細胞の生存率に変化は認められたのか。 9. 図1(c)~(e) と図1S(a)~(c) の違いは何か。 10. アトピー性皮膚炎において、皮膚バリア機能の破たんとアレルギー性炎症のどちらが先に起こるのか。 11. 皮膚組織におけるPPARα、PPARβ/δ、PPARγの機能の違いは何か。 12. PPARαの発現を抑制することで、他の表皮分化関連因子(desmoglein や desmocollin など)は変化しないのか？ 13. PPARs、transglutaminase-1、loricrin を表皮内のどの細胞が産生しているのか。 14. 表皮内局在があるなら、表皮上部と下部の比較、あるいは免疫組織化学などでその変化を観察できないか。 15. TNF-α、IFN-γ刺激群に比べると、さらに IL-4 刺激を加えることで PPARαの発現は抑制されているが、そのレベルは対照群(TNF-α、IFN-γ刺激なし)より決して低くなく、同等以上である。この結果は、IL-4 刺激に起因する PPARαの低下が皮膚バリア機能を障害する、という主張と合致しないのではないか。 16. 本文 <Result> 中ではPPARαの発現はIL-4単独では影響を受けないと記載しているが <Conclusion> 中ではIL-4により抑制されると結論付けているがなぜか。 <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。

学 位 論 文 要 旨

氏名 足立育子

論 文 題 目

Expressions of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are directly influenced by permeability barrier abrogation and inflammatory cytokines and depressed PPAR α modulates expressions of chemokines and epidermal differentiation-related molecules in keratinocytes

(角化細胞におけるペルオキシソーム増殖剤活性化受容体の発現は、透過性バリア破壊と炎症性サイトカインにより影響を受け、 α 型ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体の低下によってケモカインと分化関連分子の発現が変化する)

要 旨

<背景> Peroxisome proliferator-activated receptors (以下、PPARs) は、核内受容体のひとつであり、 α 、 β/δ 、及び γ の3つのサブタイプがある。生理的なりガンドは脂質或いはその代謝物であり、種々の合成リガンドも開発されている。皮膚においては、表皮角化細胞、ランゲルハンス細胞、脂肪細胞、更には炎症時に浸潤するリンパ球やマクロファージなどの炎症細胞にも発現している。近年、PPARsの活性化が、表皮角化細胞の分化や脂質合成を促進することにより皮膚バリア機能を強化する方向に作用する一方、炎症反応を抑制する方向にも作用することが判明してきた。皮膚バリア機能異常とアレルギー性炎症の両側面からなるアトピー性皮膚炎 (以下、AD) では、1. 患者病変部での PPAR α の発現が低下している、2. PPAR α 欠損マウスでは、AD様皮膚炎が生じ易い、3. PPAR α と PPAR β/δ の合成リガンドがAD様皮膚炎マウスで治療効果を示すことなどが明らかとなってきた。以上より、

PPARs は、AD の病態において重要な役割を担っている可能性がある。

<目的> 皮膚バリア機能とアレルギー性炎症の両者に関与し得る細胞としての表皮角化細胞に着目し、表皮角化細胞における PPARs の AD の病態における意義を探る目的で、1. 表皮角化細胞における PPARs の発現はどのような因子によって影響を受けるか？2. 表皮角化細胞の機能は PPAR α の低下によりどのように変化するか？を検討する。

<方法> 目的の1においては、バリア機能破壊刺激と Th1・Th2 サイトカインの影響を検討した。前者では、3次元培養皮膚の表面をアセトンで処理しその表皮での PPARs の発現を未処理の場合と比較した。後者では、培養表皮角化細胞を、TNF- α 、IFN- γ 及び IL-4 で刺激し、PPARs の発現変化を観察した。目的の2においては、PPAR α がその siRNA によってノックダウンされた培養表皮角化細胞でのケモカイン (TARC と RANTES) 及び表皮分化関連分子 (トランスグルタミナーゼ1 とロリクリン) の発現をコントロール RNA が導入された角化細胞と比較検討した。PPAR、ケモカイン、及び分化関連分子の発現は、半定量的 RT-PCR 及びウェスタンブロットティング又は ELISA 法にて解析した。

<結果> 1. 皮膚バリア破壊刺激により、PPAR α と PPAR γ の発現が低下し、PPAR β/δ の発現が亢進した。2. TNF- α と IFN- γ により PPAR α と PPAR β/δ の発現が亢進し、その亢進は IL-4 により阻害された。PPAR γ の発現は、TNF- α と IFN- γ の影響を受けなかったが、IL-4 により亢進した。3. PPAR α がノックダウンされた培養表皮角化細胞では、TARC と RANTES の発現が増強し、トランスグルタミナーゼ1 とロリクリンの発現が低下した。

<考察> 1. 3つのサブタイプのうち、AD 患者の病変部で低下している PPAR α の発現のみが、皮膚バリア機能破壊刺激と Th2 サイトカインである IL-4 の両者から負の影響を受けていた。従って、AD 病変部での PPAR α の発現低下は、AD の病態における皮膚バリア機能低下と Th2 の関与したアレルギー性炎症という両側面により影響を受けた結果と推察される。2. PPAR α の発現低下により、表皮角化細胞はケモカインの発現亢進を介して炎症反応を増強させる方向に機能変化すると同時に、皮膚バリア機能構築に重要な分化関連分子の発現低下を介して皮膚バリア機能を低下させる方向にも機能変化することが示唆される。

<結語> 表皮角化細胞での PPAR α の低下は、AD の病態において、皮膚バリア機能異常とアレルギー性炎症の両側面間の悪循環に深く関与し、両側面を同時に制御する治療戦略の標的となり得る。