

氏名・(本籍)	佐藤 貴彦 (秋田県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第 1108 号
学位授与の日付	令和 6 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Eosinophil-derived galectin-10 upregulates matrix metalloproteinase expression in bullous pemphigoid blisters (好酸球由来ガレクチン-10 は水疱性類天疱瘡におけるマトリックスメタロプロテアーゼ発現を上昇させる)
論文審査委員	(主査) 海老原 敬 教授 (副査) 山田 武千代 教授 大森 泰文 教授

学位論文内容要旨

論文題目

Eosinophil-derived galectin-10 upregulates matrix metalloproteinase expression in bullous pemphigoid blisters

(好酸球由来ガレクチン-10は水疱性類天疱瘡におけるマトリックスメタロプロテアーゼ発現を上昇させる)

申請者氏名 佐藤 貴彦

研究目的

水疱性類天疱瘡 (BP) は、表皮下水疱を生じる皮膚自己免疫疾患のひとつである。膜貫通型コラーゲンである BP180 と、ヘミデスモソームの主成分である BP230 に対する自己抗体が真皮表皮接合部を損傷させる。

マウスの BP モデルでは、細胞外マトリックス中のコラーゲンやタンパク質の分解に関与するプロテアーゼである、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-9 が活性化しており、病変部の好中球はエラスターゼを放出する。MMP-9 とエラスターゼのいずれもヘミデスモソームを損傷し、水疱形成を誘導する。また、活性化された好酸球から放出される細胞傷害性タンパク質が水疱形成に関連していることが知られているが、詳細はこれまで不明であった。

好酸球には様々な脱顆粒過程がある。その中でも細胞死を伴う好酸球の脱顆粒様式は、糸状クロマチン構造の放出を特徴とし、好酸球細胞外トラップ細胞死 (EET cell death, EETosis) と呼ばれ、多くの好酸球性疾患で報告されている。BP の水疱でも EETosis は好酸球に豊富に存在しているガレクチン-10 (G10) の放出と関連していることが知られている。また、一般的にガレクチンファミリーは MMP の産生を誘導することも知られている。

そこで本研究では、BP 病変部において、好酸球が G10 を放出し、その G10 が真皮-表皮接合部の破壊に関与する MMP の産生を誘導して水疱形成する、という仮説を立て、以下の実験で検討した。

研究方法

まず、BP 患者の水疱中の EETosis と G10 を免疫蛍光法と透過型電子顕微鏡を用いて観察し、患者の血清および BP 水疱液中の G10 濃度を ELISA 法で測定した。つぎに、BP 患者の水疱における MMP ファミリーの発現を免疫組織化学にて検討し、G10 刺激による正常ヒト表皮角化細胞 (NHEK) と正常ヒト皮膚線維芽細胞 (NHDF) に

おける MMP ファミリーの mRNA およびタンパク発現を検討した。さらに G10 により活性化されたシグナル伝達経路を検討するため、各経路の阻害剤を用いた in vitro アッセイを NHDF で行った。

研究成績

(1) BP 患者の水疱部における EETosis による G10 の放出

BP 水疱部で EETosis が起こり、G10 が放出されていることを免疫蛍光法と透過型電子顕微鏡を用いて初めて観察した。また、G10 が患者血清と比較して水疱中で有意に増加していることを明らかにした。

(2) BP 患者の水疱部における MMPs の発現

免疫組織化学により、水疱部の表皮有棘層と真皮繊維芽細胞から MMP-1、MMP-3、MMP-10 が強発現していることを明らかにした。

(3) G10 によって刺激された NHEK と NHDF は、MMPs の発現を増強した

G10 は NHEK における MMP-1、MMP-3、MMP-9、MMP-10 の発現を mRNA とタンパク質の両方で有意に増強し、NHDF では MMP-1 の発現を mRNA で有意に、MMP-1、MMP-3、MMP-10 の発現はタンパク質で有意に増強することを in vitro で示した。

(4) MMPs 発現における G10 の細胞内シグナル伝達経路

NHDF において、G10 は p38 MAPK、ERK、JNK、NF- κ B、p65 を活性化して、MMP-1 と MMP-9 の産生を促進し、経路阻害によりそれらの産生を阻害することをから、G10 は皮膚においてこれらの経路を介して MMPs の産生を促進していることが示唆された。

結論

BP 病変部において、G10 が MMP-9 を含む MMP の発現を増強することを明らかにした。本研究によって、好酸球が EETosis を起こして G10 を放出し、その G10 が表皮細胞および線維芽細胞による MMP の産生を誘導し、BP の水疱を形成する可能性を示した。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主査：海老原敬

申請者：佐藤貴彦

論文題名：英文 Eosinophil-derived galectin-10 upregulates matrix metalloproteinase expression in bullous pemphigoid blisters

(和訳) 好酸球由来がガレクチン-10 は水泡性類天疱瘡におけるマトリックスメ
タロプロテアーゼ発現を上昇させる

要旨

水泡性類天疱瘡 (BP) は表皮下水泡を生じる皮膚自己免疫疾患の一つで、膜貫通型コラーゲンである BP180 とヘミデスモゾームの主成分である BP230 に対する自己抗体が真皮表示接合部の損傷を誘導する疾患である。本研究では、BP 発症における好酸球細胞外トラップ細胞死 (Eosinophil Extracellular Trap cell death: EETosis) の重要性を検討した。結果、BP 水泡部において、好酸球の蓄積、EETosis の存在、ガレクチン-10 の放出、Matrix metalloproteinase (MMP) -1/-3/-10 の発現上昇を認めた。また、ガレクチン-10 刺激を受けた表皮角化細胞や繊維芽細胞では、p38 MAPK、ERK、JNK 活性が起こり、MMP-1/-9 の産生が誘導された。以上より、BP の炎症誘導機構において、EETosis を介したガレクチン-10 の重要性が明らかになった。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

1) 斬新さ

マウスモデルを用いてマトリックスメタロプロテアーゼ-9 (MMP-9)、エラスターゼを発現する好中球、好酸球の脱顆粒の重要性が明らかになっていたが、好酸球による BP 誘導機序の詳細は不明であった。EETosis は好酸球細胞死の一形態で、intact な顆粒を多量放出す

る迅速な細胞死、糸状クロマチン構造の放出、ガレクチン-10 の放出を特徴とする。アレルギー一性気管支肺アスペルギルス症、好酸球性副鼻腔炎、好酸球性中耳炎などがアレルギー性疾患で EETosis の存在が確認されており、アレルギー発症機序における EETosis の重症性が示唆されている。本研究は、EETosis による BP 誘導メカニズムを検討したものであり、新規性を認める。

2) 重要性

水泡性類天疱瘡はステロイドによく反応する疾患であり、ステロイドにより自己抗体の産生を抑えることがその作用点と考えられる。しかし、炎症が誘導されるメカニズムにはまだ不明点が多い。本研究により明らかになったガレクチン-10 による炎症誘導機構は、治療の標的になる可能性があり、臨床上も重要な発見と考えられる。

3) 研究方法の正確性

水泡の組織学検討、水泡内ガレクチン-10 の濃度測定、表皮角化細胞や繊維芽細胞から産生される MMPs の測定、Western blotting によりシグナル解析、各阻害剤による実験など、統計学的に正確かつ適正に行われている。

4) 表現の明瞭さ

BP 患者の臨床サンプルの検証と in vitro 細胞培養系を用いて、EETosis によるガレクチン-10 産生が、表皮角化細胞や繊維芽細胞からの MMPs 産生を誘導し、炎症に寄与するメカニズムを検討している。その研究目的、実験方法、実験結果、考察は明瞭に記載されている。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。