

氏名	田中義人
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第1292号
学位授与の日付	2022年3月13日
学位論文題名	Cutaneous ischemia-reperfusion injury is exacerbated by IL-36 receptor antagonist deficiency 「IL-36受容体アンタゴニスト欠損は、皮膚虚血再灌流障害における創傷治癒を悪化させる。」 Journal of the European Academy of Dermatology & Venereology. 2022;36:295-304
指導教授	杉浦一充
論文審査委員	主査教授 鈴木元 副査教授 鈴木敦詞 教授 吉川哲史

論文内容の要旨

【背景】

IL-36は、IL-1スーパーファミリーのメンバーであり、IL-36受容体と結合して炎症反応を引き起こす。また、IL-36受容体アンタゴニスト(IL-36Ra)をコードしている*IL36RN*遺伝子の機能欠失変異は、様々な皮膚疾患の病態に関与することが報告されている。しかし、皮膚虚血再灌流障害におけるIL-36Raの果たす役割については解明されていない。

【目的】

皮膚虚血再灌流障害におけるIL-36Raの果たす役割を解明する。

【方法】

IL-36Raを欠損したマウス(*IL36rn*^{-/-}マウス)と野生型マウスに皮膚虚血再灌流障害モデルを作成し、創傷面積、創傷組織に浸潤した好中球数とマクロファージ数、アポトーシス細胞、好中球細胞外トラップ(NET)の形成、創傷組織におけるサイトカイン、ケモカインのmRNA発現をリアルタイムRT-PCRを用いて解析した。また、内在性toll-like receptor (TLR)4のリガンドであるhigh mobility group box 1(HMGB1)の創傷組織での発現を免疫組織染色で評価し、さらに血清中HMGB1濃度を虚血前、再灌流4時間後、72時間後に測定した。J774A.1細胞およびHaCaT細胞を用いて細胞培養実験を行い、サイトカインのmRNA発現について解析した。TLR4阻害薬であるTAK-242、およびNET形成に不可欠なpeptidylarginine deiminase 4(PAD4)を阻害するCl-amidineを虚血再灌流障害前日から5日間腹腔内投与し、創傷治癒に与える影響を解析した。

【結果】

IL36rn^{-/-}マウスでは、皮膚虚血再灌流障害による創傷治癒は有意に遅延しており、再灌流4時間後の創傷組織に浸潤した好中球数、および再灌流72時間後の創傷組織に浸潤したマクロファージ数の有意な増加を認めた。また、*IL36rn*^{-/-}マウスでは創傷組織におけるCXCL1、CXCL2、CCL4、TNF- α 、TGF- β 、IL-1 β 、IL-6、およびIL-36 γ のmRNA発現が有意な増加を認めた。再灌流4時間後において、創傷部の表皮細胞にTUNEL染色に陽性を示すアポトーシスが認められた。表皮細胞と付属器細胞におけるHMGB1発現は、虚血前と比較して再灌流4時間後に減少しており、さらに血清中HMGB1濃度は、虚血前と比較して再灌流4時間後、72時間後に有意に上昇した。HMGB1で刺激したJ774A.1細胞は、IL-1 β を含む様々なサイトカインのmRNA発現を有意に増加したが、TAK-242により完全に抑制された。また、IL-1 β で刺激したHaCaT細胞は、CXCL1、TNF- α 、IL-6、IL-36 β 、およびIL-36 γ のmRNA発現を有意に増加した。さらに、*IL36rn*^{-/-}マウスでは、再灌流4時間後および72時間後の創傷組織中におけるNET形成の亢進が認められた。最後に、TAK-242によるTLR4シグナル伝達の阻害、およびCl-amidineによるNET形成の阻害は、*IL36rn*^{-/-}マウスの皮膚虚血再灌流障害による創傷治癒の遅延を正常化させた。

【結論】

今回の研究により、IL-36Ra欠損により皮膚虚血再灌流障害における創傷治癒が遅延することが明らかとなった。創傷治癒遅延の機序としては、創傷部の虚血に伴う表皮アポトーシス細胞から放出されたHMGB1によるTLR4シグナル経路の活性化を介して創傷組織に過剰な炎症細胞浸潤を来し、NET形成亢進と過剰なサイトカインおよびケモカイン産生に至る可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

近年、尋常性乾癬を伴わない膿疱性乾癬の原因遺伝子として、*IL36RN*遺伝子の機能欠損変異が同定された。*IL36RN*遺伝子はIL-36受容体拮抗因子をコードし、サイトカインIL-36 α 、IL-36 β 、IL-36 γ と拮抗することで炎症抑制性に働く。本研究は、*IL36RN*欠損マウスを用いて、皮膚虚血再灌流障害の病態を調べたものである。*IL36RN*欠損マウスにおいては、正常マウスと比較し、圧迫による皮膚虚血、再灌流障害における創傷程度の増加と、治癒の遅延が観察された。障害部位では、好中球、マクロファージの虚血部位での増加、各種炎症性サイトカインの増加に加え、表皮アポトーシス細胞から放出されたHMGB1によるTLR4シグナルの活性化、NET形成亢進と過剰なサイトカインおよびケモカイン産生を検出した。この結果は、創傷発生と治癒過程における*IL36RN*遺伝子産物IL-36受容体拮抗因子による炎症抑制効果の重要性を強く示唆するものであるとともに、レイノー症候群に伴う皮膚潰瘍や褥瘡など、一般的な難治性皮膚潰瘍の病態解明にも貢献する優れた研究である。実験方法、結果の解釈等に関わる質問に対して的確に解答を行った点も合わせ、早期学位授与にふさわしいと判断された。