

審査の結果の要旨

氏名 仙田 尚之

本研究は炎症制御において重要な役割を果たしている HMGB1 タンパク質の、表皮細胞における役割を解析することを目的としたものであり、下記の結果を得ている。

1. **Keratin5-Cre** マウスおよび **HMGB1-flox** マウスを交配することで、**Keratin5** プロモーターの働く表皮細胞でのみ **HMGB1** がノックアウトされるマウス (**K5-HMGB1 cKO** マウス) を作製した。このマウスでは表皮細胞で特異的に **HMGB1** 発現が欠損していること、および **Keratin5-Cre** を有しないマウス (コントロールマウス) では **HMGB1** 発現が保たれていることをイムノブロット法および **qRT-PCR** 法で示した。
2. このマウスに対し、**Th1** 系の炎症である **DNFB** 誘発アレルギー性接触皮膚炎、**Th17** 系の炎症であるイミキモド誘発乾癬様皮膚炎、**Th2** 系の炎症であるオキサゾン誘発接触皮膚炎、またクロトン油誘発刺激性接触皮膚炎の各皮膚炎モデルを施行したところ、全てのモデルにおいて **K5-HMGB1 cKO** マウスではコントロールマウスと比べ、有意に耳厚の肥厚が増加することを示した。
3. **DNFB** 誘発刺激性接触皮膚炎モデルを用いて解析を進め、**K5-HMGB1 cKO** マウスではコントロールマウスと比べ、炎症惹起 24 時間後の耳皮膚検体で好中球浸潤が増加していたことを示した。また、同検体のタンパク質をイムノブロット法で解析し、**K5-HMGB1 cKO** マウスでは炎症に際して **HMGB1** が細胞内に再取り込みされることはなく、またコントロールマウスと比べオートファジー活性に差が認められないことを示した。
4. **DNFB** 誘発アレルギー性接触皮膚炎、イミキモド誘発乾癬様皮膚炎、クロトン油誘発刺激性接触皮膚炎の各皮膚炎モデルにおける炎症惹起時の耳皮膚検体の **mRNA** を解析し、3つの皮膚炎モデル全てにおいて **K5-HMGB1 cKO** マウスではコントロールマウスと比べ、**IL-24** 遺伝子の発現が亢進していたことを **qRT-PCR** 法で示した。また **K5-HMGB1 cKO** マウスから単離培養した表皮細胞では、コントロールマウス由来のものとは比べ、定常状態および **IL-4** 刺激した際に **IL-24** 遺伝子の発現が亢進していたことを **qRT-PCR** 法で示した。

5. CRISPR-Cas9 系を用いた遺伝子編集技術により、マウス角化細胞株である PAM212 細胞に対し HMGB1 の発現を欠損させたクローン (HMGB1 KO クローン)、およびコントロールとして HMGB1 の発現が欠損しなかったクローン (HMGB1 WT クローン) を単離し、イムノブロット法および qRT-PCR 法で確認した。

6. HMGB1 KO クローンでは HMGB1 WT クローンと比べ、定常状態および IL-4 刺激した際に IL-24 遺伝子の発現が亢進していることを qRT-PCR 法で示し、IL-4 刺激した際に IL-24 遺伝子のプロモーター活性が上昇していることをルシフェラーゼアッセイで確認した。また HMGB1 KO クローンでは HMGB1 WT クローンと比べ IL-4 刺激時には STAT6 のリン酸化が亢進していることをイムノブロット法で示した。

以上、本論文は表皮細胞において、HMGB1 が欠損することで種々の異なる刺激に対し共通して炎症が亢進すること、および IL-24 遺伝子発現が亢進することをそのメカニズムの一部まで明らかにしたものである。すなわち本論文は、表皮細胞における HMGB1 の役割ならびにその IL-24 との関係を初めて示したものであり、今後の皮膚炎症制御における HMGB1 の作用機序の全貌解明を通じて、皮膚疾患の新たな治療法の創出に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。