

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	亀頭 晶子
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目 Histamine- or VEGF-induced tissue factor expression and gap formation between vascular endothelial cells are synergistically enhanced by LPS, TNF- α , IL-33 or IL-1 β （ヒスタミンまたはVEGFによる組織因子の発現および血管内皮細胞間隙の開大は、LPS、TNF- α 、IL-33またはIL-1 β によって相乗的に増強される）			
論文審査担当者			
主査	教授	保田 朋波流	印
審査委員	教授	杉山 英二	
審査委員	准教授	栗栖 智	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>【背景】慢性蕁麻疹は日常ありふれた皮膚疾患であり、何らかの機序で皮膚マスト細胞や好塩基球が活性化され、ヒスタミンやロイコトリエンなどのケミカルメディエーターが放出されることで、毎日のように紅斑、膨疹を生じる。近年、慢性蕁麻疹患者の血漿中では凝固・線溶反応のマーカーであるプロトロンビンフラグメント1+2、fibrin degradation product (FDP) やD-ダイマーが上昇し、疾患の重症度と相関することが報告されている。また、一部の難治性蕁麻疹患者では、抗凝固薬であるワルファリンやヘパリンなどの有効例が報告されていることから、慢性蕁麻疹の病態と凝固反応の間に深い関係があることが示唆される。さらに、慢性蕁麻疹患者では外因系の凝固ポテンシャルが増加していることも報告されている。また、これまでの報告で慢性蕁麻疹の重症度や疾患活動性を反映するバイオマーカーとして、血液中のヒスタミン、FDP、D-ダイマー、CRP の他、VEGF や TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-17、IL-33 などの炎症性サイトカインが挙げられている。しかし、慢性蕁麻疹において、どのように外因系凝固反応の開始因子である組織因子（TF）が産生されるのか、また慢性蕁麻疹で上昇することが報告されているそれらの炎症性サイトカインと凝固系との関係も明らかでない。これまで申請者らは、臍帯血由来血管内皮細胞（HUVECs）を用いた <i>in vitro</i> 研究でヘリコバクター・ピロリなどのグラム陰性桿菌の外膜に由来するエンドトキシンであるリポ多糖（LPS）とヒスタミンの同時刺激により、血管内皮細胞上の TF 発現が相乗的に増加し、局所における凝固反応が亢進し、活性化された凝固因子がプロテアーゼ活性化受容体（PAR）を介して血管透過性の亢進を引き起こすことを明らかにした。</p> <p>【目的】本研究では、LPS、ヒスタミンに加え、慢性蕁麻疹への関与が示唆されている TNF-α、IL-33、IL-1β、VEGF について、HUVECs における TF の発現、その後の外因系凝固経路の活性化と血管透過性亢進に及ぼす影響について検討した。</p> <p>【方法】血管内皮細胞として HUVECs を用い、LPS、ヒスタミン、TNF-α、IL-33、IL-1β、VEGF の各々単独または2種類を組み合わせ刺激し、血管内皮細胞の TF の発現と、TF による外因系凝固反応の活性化とその後の血管内皮細胞間の接着状態に及ぼす影響について検討した。血管内皮細胞での TF の発現は、RT-PCR 法、フローサイトメトリ法により、それぞれ mRNA レベル、膜発現レベルでの発現を評価した。また、血管内皮細胞上に発現した TF の外因系凝固反応の駆動</p>			

能は、ACTICHRONE® TF を用いて測定した。血管内皮細胞間接着状態に及ぼす影響については、電気抵抗の変化を使用してリアルタイムに細胞間接着状態（血管透過性）をモニタリングできるインピーダンス法を用いて評価した。また、LPS、ヒスタミン、TNF- α 、IL-33、IL-1 β 、VEGF 刺激による HUVECs の TF 発現における細胞内シグナル伝達経路を検討するため、NF- κ B 阻害剤（BAY--11-7082）と PKC 活性化剤（PMA）を用いて TFmRNA 発現に及ぼす影響を検討した。

【結果】HUVECs の TF 発現は、LPS、ヒスタミン、TNF- α 、IL-33、IL-1 β 、VEGF の各々単独の刺激によって引き起こされ、さらにそれらの刺激のうち 2 種類を組み合わせると相加的または相乗的に TF 発現が増強した。ここで、TF を誘導する刺激は、LPS、TNF- α 、IL-33、IL-1 β のグループ 1 と、ヒスタミン、VEGF のグループ 2 の 2 つのグループに分けられ、同じグループ内の組み合わせでは相加的効果、異なるグループの組み合わせでは相乗的效果が得られることを見出した。TF の外因系凝固反応の駆動能についても同様に、異なるグループの組み合わせによる刺激で相乗的に増強された。また、血管内皮細胞間の接着状態についても、異なるグループの組み合わせで刺激を行うと、血漿存在下でインピーダンスが低下（細胞間隙の面積が増加）し、血管透過性が亢進することが示された。上記の結果は、グループ 1 とグループ 2 の共刺激により、血管内皮細胞膜上の TF の発現が相乗的に増加し、血漿中の凝固因子が活性化され、それらが血管内皮細胞に働くことで血管透過性が亢進することを示している。TF の発現に対する NF- κ B 阻害剤と PKC 活性化剤の影響について検討した結果、NF- κ B 阻害剤はグループ 1 刺激による TF 発現を選択的に抑制し、PKC 活性化剤ではグループ 1 刺激による TF 発現を増強したが、グループ 2 刺激による TF 発現にはほとんど影響を与えなかった。これらの結果は、グループ 1 とグループ 2 の細胞内シグナル伝達経路が異なることを示しており、それぞれの刺激が同時に入ることにより相乗的な TF 発現を引き起こしていると考えられる。

【結論】ヒスタミンによる血管内皮細胞の TF 発現は LPS 以外にも種々のサイトカインにより増強され、外因系血液凝固反応を介して血管透過性を亢進させることが明らかとなった。今後の研究により TF が相乗的に増強する機序の詳細を解明することは、慢性蕁麻疹の新たな病態解明と効果的な薬物治療に繋がると期待される。

以上の結果から、本論文は、慢性蕁麻疹に関わる新たな病態を解明し、従来の治療に抵抗性の慢性蕁麻疹への治療開発の可能性を証明した点で高く評価される。

よって審査委員会委員全員は、本論文が亀頭晶子に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。