

抄 録

第9回中国研究皮膚科セミナー

日時：平成25年10月26日（土）15：00～18：40

場所：ホテルJALシティ広島2階「シリウス」

共催：中国研究皮膚科セミナー
協和発酵キリン株式会社

情報提供

協和発酵キリン株式会社

研究発表1

座長 山口大学大学院医学系研究科 皮膚科学分野
准教授 一宮 誠 先生

1. 皮膚悪性腫瘍患者血中の循環腫瘍細胞：CTC
の検出と遺伝子異常の検索，および表面プラス
モン共鳴：SPRを用いた腫瘍細胞の機能評価法

広島大学大学院医歯薬保健学研究院
統合健康科学部門 皮膚科学

○柳瀬哲至，柳瀬雄輝，平郡隆明，川口智子，
秀 道広

【背景】 癌患者の末梢血中に存在する血中循環腫瘍細胞Circulating tumor cells：CTCは古くから議論されており，近年の分子生物学的報告や臨床研究の蓄積により，腫瘍形成の比較的早期の段階からCTCが存在することが明らかになってきた。また悪性黒色腫：MMでも既に多くの報告があり，CTCの研究により，転移メカニズムの解析や診断，予後予測や治療効果判定などへの応用が期待されている。CTCは末梢血1ml中に1～10個程しか含まれず，細胞の大きさや密度勾配遠沈，または免疫磁気法：MACSを用いて捕捉され，PCRやFlow Cytometry：FCMを用いて存在を確認される報告が多い。我々はMM患者の血液から，MM細胞に発現する黒色腫関連抗原HMW-MAA磁気ビーズを用いて，MACSによりCTCを捕捉，抽出しPCR法で

これを確認している。

【対象と方法】我々は予備実験としてMM細胞株MMGIを健常人血中に混和し，HMW-MAA磁気ビーズを用いたMACSでMMGIを特異的に採取し，qRT-PCR法でTyrosinase：TYRの増幅の確認を行った。また，FCMでMMGIをCD45-，MCSP+で捕捉可能かを確認した。同様に，病期Ⅱ以上のMM患者16名から血液を採取し，FCM，およびPCRで確認した。さらに，患者CTCから得られたcDNAを用いてPCRでBRAF exon15，KIT exon 11，13，17のシーケンスを行い，それぞれ遺伝子配列の異常の有無を調べた。さらにはMM患者群の原発巣，転移巣のパラフィン切片からgDNAを採取し，これらの遺伝子異常の有無を確認中である。

【結果】予備実験において，健常人2.5ml血液中にMMGIを10個以上混和したものではPCRでTYRの増幅がみられた。MM患者群の末梢血中から採取したCTCのcDNAからPCRでTYRの増幅がみられたのは16名中9名であった。そのうちPCRでBRAFの発現が見られたのは4名のみで，いずれもシーケンスではV600の変異は見いだせなかった。今後はCTCを用いて，SPRのシグナルを確認していく予定であるが，現時点では血管肉腫細胞株を用いたSPRのシグナルについてデータが得られつつあり，これについても言及する予定である。

2. 熱ショック因子HSF1によるメラノーマの制御

山口大学大学院医学系研究科 皮膚科学分野

○中村好貴，福島園子，中村有希子，武藤正彦

熱ショック応答は，進化の過程で保存された普遍的な生体防御機構である。この応答を制御するのが熱ショック因子（Heat shock factor 1：HSF1）である。HSF1は，構成的ならびに誘導性の熱ショック蛋白質（Heat shock proteins：Hsps）の発現を制御することで，熱ストレスをはじめとする様々なストレスに対する耐性獲得に働いている。

最近の研究から，HSF1は細胞内蛋白質ネットワークを調整することにより腫瘍形成を制御しており，癌の発生や維持において重要な役割を演じていることが報告されている。

これまでにわれわれは，メラノーマ細胞の増殖に

はHSF1が必要であり、HSF1をノックダウンしたメラノーマ細胞では、温熱処置に対する抵抗性が減弱することを明らかにしてきた。

今回われわれは、メラノーマ細胞のHSF1をノックダウンすることにより、メラノーマ細胞の遊走能、浸潤能が低下し、HSF1を再発現させると遊走能、浸潤能が回復することを明らかにした。また、HSF1をノックダウンしたメラノーマ細胞をヌードマウスに皮下注射したところ、腫瘍形成が抑制されることが判明した。

以上の結果より、メラノーマ細胞においてHSF1は増殖能、遊走能、浸潤能の維持に関与しており、HSF1を制御することはメラノーマ治療の有望な標的の1つになりうることを示唆された。

3. 二酸化チタンナノ粒子の慢性皮膚曝露による形態学的影響の評価

鳥取大学医学部感覚運動医学講座 皮膚病態学分野
○足立孝司, 山田七子, 吉田雄一, 山元 修

我々は、工業用ナノ粒子の皮膚への影響を検討している。経皮曝露による二酸化チタン (TiO₂) ナノ粒子の亜慢性曝露後の局在や形態学的変化についての研究を行った。

ラットの背部皮膚15cm² (5 × 3 cm) に4 mg/cm² の10wt%TiO₂含有エマルジョンとコントロールエマルジョンを外用した。曝露2, 4, 8週間後の曝露皮膚を採取し、光学顕微鏡 (光顕) および透過型ならびに走査型電子顕微鏡 (透過ならびに走査電顕) による観察分析を行った。テープストリッピング法を用いて、皮膚表面の粒子の分布についての観察分析を行った。また、fluoresceine isothiocyanate (FITC) 標識した10wt%TiO₂含有エマルジョンも作製し、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。同時に、肝、腎、脾、脳、肺を摘出し、摘出した臓器について高分解能ICP 質量分解装置により組織内チタン濃度を測定した。

光顕的にTiO₂曝露群すべての角質層上層に粒状物質がみられた。TiO₂曝露群2, 4, 8週間曝露のいずれも一部に錯角化、海面状態がみられた。表皮や毛包の生細胞領域への侵入はみられなかった。

透過電顕では、TiO₂曝露群すべての角質層上層

と一部の毛包漏斗部に電子密な微細顆粒状物質あるいはその凝集体が観察された。表皮や毛包の生細胞領域への侵入は確認されなかった。

走査電顕ではTiO₂曝露群皮膚の角質層に粒状、球状物質がみられた。2週間、4週間曝露後の中等度剥離後では、粒状物質は毛包開口部にのみ分布していた。2週間、4週間曝露後では、高度剥離後も毛包開口部深部もしくは漏斗部上部にわずかに粒状物質を認めた。

摘出臓器中のチタン濃度を測定した結果、TiO₂曝露群8週間曝露の肺においてのみチタン濃度の上昇がみられた。

研究発表2

座長 山口大学大学院医学系研究科 皮膚科学分野

助教 中村好貴 先生

4. トシリズマブ投与後に前胸部に紅斑、膿瘍、潰瘍を生じたSAPHO症候群の検討

川崎医科大学 皮膚科学

○林 宏明, 内田雅子, 藤本 亘

SAPHO症候群はSynovitis, Acne, Pustulosis, Hyperostosis, Osteitisの頭文字をとった症候群であり、膿疱性皮膚病変と骨関節病変により構築される疾患である。病因は、病巣感染説や自己免疫説なども考えられているが、いまだに詳細不明である。未治療、不十分な治療によって前胸部の疼痛、紅斑、膿瘍を生じる症例は報告が散見されるが、今回、70歳代の男性に対してトシリズマブ (ヒト化抗ヒトIL-6レセプターモノクローナル抗体) 投与3週間後に発熱、前胸部に紅斑、膿瘍、潰瘍を生じたSAPHO症候群を経験した。当科入院時、WBC: 27,740/ μ l, CRP: 12.80mg/dlであった。血液培養、膿瘍部の培養は陰性であり、無菌性膿瘍と判断し、PSL20mg内服及びインフリキシマブの点滴により治療した。

今回の症例の病態について、トシリズマブが免疫系への影響、特に好中球を主体とした炎症細胞の異常集積、活性化をもたらした可能性が高いと考えた。IL-8, TNF- α などが病態と考えていたが、結果は全

く違っていた。しかしながら、MCP-1, G-SCF, IL-6などが病勢と一致して動いていた。トシリズマブ投与直後にWBC: 2,310/ μ lにまで低下したものがその後WBC: 37,930/ μ lまで上昇したという結果も踏まえると、上記のサイトカインが病態形成に関与したと考えた。

様々な領域で抗サイトカイン療法が近年、使用できるようになり、また、今後ますます使用されるように思われる。劇的な臨床症状の改善がみられる一方で、予想もしない副反応も生じる可能性もあろう。自験例はターゲット以外のサイトカインにも大きく影響を与えることによって皮膚にも副反応を生じたものと判断した。

5. Cathelicidin (LL-37) は表皮角化細胞において2本鎖RNAによる抗ウイルス作用を増強する

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 皮膚科学分野¹⁾,

浜松医科大学 形成外科²⁾,

川崎医科大学 皮膚科³⁾

○瀧口徹也^{1, 2)}, 森実 真¹⁾, 山本剛伸³⁾,

梶田 愛¹⁾, 池田佳寿子¹⁾, 岩月啓氏¹⁾

【背景】抗菌ペプチドの一種であるcathelicidin (LL-37) は抗菌活性の他に宿主の免疫、血管新生、創傷治癒に対する調整因子として働くことが知られている。最近我々のグループはLL-37とDNAによりToll like receptor (TLR) 9を介した1型IFNの産生が増強されることを報告した。一方2本鎖RNAの受容体であるTLR3に対するLL-37の影響に関しては十分に知られていない。

【目的】今回我々はLL-37がTLR3のシグナルまた抗ウイルス作用に対してどのような影響を与えるかを検討した。

【方法】表皮角化細胞をLL-37, poly (I:C) (TLR3のリガンド) と共培養しIFN- β の産生量をreal-time quantitative PCR (RT-qPCR), ELISA法を用いて調べた。さらにHSV-1を用いたvirus plaque assayにてLL-37とpoly (I:C) のウイルス感染に与える影響を調べた。またLL-37によるpoly (I:C) の細胞内への取り込みに与える影響をFITCで標識したpoly (I:C) を用いて調べた。

【結果】表皮角化細胞においてLL-37とpoly (I:C)

の共刺激によりIFN- β の産生は相乗的に増強された。その産生はpoly (I:C), LL-37の濃度依存性であった。またIFN- β のmRNA, タンパクの発現のピークはそれぞれ刺激後6時間と24時間で観察された。さらにHSV-1を用いたvirus plaque assayではpoly (I:C), LL-37それぞれの単独刺激よりも共刺激により有意にvirus colonyの形成を抑制した。またLL-37はTLR3の発現量に影響を与えなかった。一方LL-37はpoly (I:C) の細胞内への取り込みを増強した。免疫染色ではHSV-1感染巣周囲のTLR3の発現量の増強を認めた。

【結語】LL-37が表皮角化細胞において2本鎖RNAにより誘導される抗ウイルス作用を増強することが示された。LL-37がヘルペス感染症における自然免疫応答に貢献する可能性が示唆された。

6. アトピー性皮膚炎の局所炎症マーカーとしてのIL-8

島根大学医学部 皮膚科学

○村田 将, 達 夏, チョウ・ゾウ・ヘイン,

森田栄伸

アトピー性皮膚炎は好発部位があり、皮疹は肘窩、膝窩、頸部、額、眼囲、耳介などに左右対称性に繰り返り慢性的に出現する。アトピー性皮膚炎の重症度評価や治療は医師による皮疹の重症度判定とともに、客観的な血液検査 (TARCなど) の値を参考に行われている。しかしながら既存血液検査項目は、局所の皮疹よりも平均された全身の皮疹の重症度を反映すると考えられる。現在、局所の皮疹の重症度を分子レベルで定量的に評価できる検査方法はない。局所皮疹の定量的評価が可能になれば、その病勢に合わせたきめの細かい治療が可能になると考えられる。当教室ではこれまでに、非侵襲的なテープストリッピング法を用いて、局所病変の角層を採取し、その中の種々のサイトカイン量を定量した。その結果IL-8が局所病変の重症度を最もよく反映することを明らかにした。今回、アトピー性皮膚炎患者の治療前後にて角層中IL-8を測定し、症状の経過との相関を検討した。

局所皮疹重症度 (紅斑, 浮腫, 滲出液, 掻破, 苔癬化, 乾燥), 水分蒸散量 (TEWL) 水分保持量 (SWC)

および血液重症度マーカー (total IgE, LDH, TARC) の変化を検査し, 角層IL-8との関連について検討した結果 (現在研究の途中段階の考察においては), 角層中IL-8は局所重症度を良く反映するマーカーとなり得ると考えられた.

特別講演

座長 山口大学大学院医学系研究科 皮膚科学分野
教授 武藤正彦 先生

「ペア型IgレセプターファミリーLMIR (CD300) の 生体内での機能の解明」

東京大学医科学研究所 先端医療研究センター
細胞療法分野

教授 北村俊雄 先生