



Title	Expression of Heparin-binding EGF-like Growth Factor and CD9 in Normal and Psoriatic skin
Author(s)	東山, 眞里
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44509
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	ひがし やま ま り 東 山 真 里
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 7 9 7 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 15 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Expression of Heparin-binding EGF-like Growth Factor and CD9 in Normal and Psoriatic skin (正常及び乾癬皮膚における HB-EGF と CD9 の発現)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 吉 川 邦 彦 (副査) 教 授 細 川 互 教 授 谷 口 直 之

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

EGF ファミリーに属する TGF- α 、amphiregulin (AR)、heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF)、epiregulin などの細胞成長因子が表皮ケラチノサイトの増殖の制御に重要な働きを担っている。これらは表皮ケラチノサイトの培養系においてオートクリン増殖因子として EGF 受容体に結合し作用する。HB-EGF は TGF- α 、AR と同様に膜貫通ドメインをもった prepro 型として合成され pro 型 (膜結合型) として細胞表面に発現し酵素によるプロセッシングを受け s 型 (分泌型) となりオートクリン増殖因子として作用する。また HB-EGF は pro 型 (膜結合型) も CD9 と結合してジャクスタクリン (juxtacrine) 増殖因子として表皮ケラチノサイトの細胞増殖を促進することを培養系において明らかにした。(参考文献 2.) しかし in vivo における pro 型 HB-EGF の生物学的作用は明らかにされていない。この論文の目的は pro 型 HB-EGF を特異的に認識する抗体と pro 型と s 型の両者を認識する 2 種類の抗体を用いて 1. 正常ヒト皮膚における pro 型 HB-EGF、CD9 の局在を免疫組織学的に明らかにすること。2. 正常ヒト皮膚において pro 型 HB-EGF と CD9 の共存 (coexpression) を蛍光抗体二重染色を用いて調べる。3. HB-EGF と CD9 の発現を乾癬病変部、非病変部で免疫組織学的に比較検討することにより表皮の増殖亢進を特徴とする炎症性角化症の一つである尋常性乾癬における HB-EGF の意義を解明することである。

(方 法)

(試料) 10 名の正常ヒト皮膚及び 10 名の乾癬患者皮膚: 無治療の病変部と近傍の非病変部。半切して凍結ブロックとパラフィンブロックを作成。(抗体) 抗 HB-EGF 抗体: 抗体 H-1 は HB-EGF 前駆体の C 末端アミノ酸 (185~208 番目) からなる合成ペプチド H-1 で、抗体 H-6 は HB-EGF 前駆体の分泌部を含むアミノ酸 (54~73 番目) からなる合成ペプチド H-6 でウサギを免疫し作成。抗体 H-1 は proHB-EGF (膜結合型) を、抗体 H-6 は proHB-EGF (膜結合型) と s 型 (分泌型) を特異的に認識する。いずれも IgG 分画のみに精製し使用。抗 CD9 モノクローナル抗体: ME101 (The Binding Site Institute of Research & Development 社)

(1) 免疫組織染色

免疫組織染色は avidin-biotin streptavidin-alkaline phosphatase 法にて行った。

HB-EGF の検出にはパラフィン切片を、CD9 の検出には抗体の反応性から凍結切片を使用した。正常ヒト皮膚及び乾癬皮膚の薄切切片に 1 次抗体 (抗体 H-1、H-6、ME101) をそれぞれ反応させた後、2 次抗体と反応させ

avidin-biotin streptavidin-alkaline phosphatase 法にて発色検出した。反応の特異性は陰性対照として正常ウサギ IgG、マウス IgG との反応性及び予め過剰な抗原 (H-1、H-6) と反応させる吸収試験にて確認した。

(2) 蛍光抗体二重染色法

正常ヒト皮膚の凍結切片を用いて、抗 proHB-EGF 抗体 (H-1)、ローダミン標識抗ウサギ抗体、抗 CD9 モノクロナル抗体、FITC 標識抗マウス抗体の順に反応させた後蛍光顕微鏡にて観察した。

(成績)

1. 正常皮膚における proHB-EGF、CD9 の局在

抗体 H-1、抗体 H-6 を用いた染色結果は一致しており表皮全層に発現が認められた。このことから正常表皮では HB-EGF は pro 型で存在する。proHB-EGF の局在は基底層では細胞膜部に、分化した有棘層では細胞質に染色された。また CD9 も表皮全層に発現し、局在は細胞膜と細胞質であり基底層に強く表層に行くに従って減弱していた。また真皮の線維芽細胞、内皮細胞、立毛筋、汗腺にも proHB-EGF、CD9 の発現を認めた。

2. 蛍光抗体二重染色による proHB-EGF、CD9 の発現

蛍光抗体二重染色では proHB-EGF、CD9 の発現パターンは類似しており主として表皮の細胞間に認められた。細胞膜部に proHB-EGF と CD9 が共存していることを示唆する。

3. 乾癬病変部、非病変部における proHB-EGF、CD9 の発現

乾癬病変部では非病変部に比べて proHB-EGF の発現の増強がみられるが、CD9 は病変部、非病変部で明らかな差を認めなかった。

(総括)

乾癬病変部の細胞は *in vitro* に移すと正常化するため病態におけるケラチノサイト異常増殖と増殖因子との関係を調べるには患者組織を用いた研究が不可欠となる。

本研究では以上の結果より HB-EGF が正常皮膚において膜結合型として存在し CD9 と共通の局在性を示し *in vivo* においてもジャクスタクリン、オートクリン増殖因子としてケラチノサイトの細胞増殖の制御に関与している可能性を示唆すると共に乾癬病変部では HB-EGF の発現亢進を認め乾癬表皮ケラチノサイトの細胞増殖亢進に TGF- α や AR と共に一役を担っている可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨

HB-EGF は膜貫通ドメインをもった prepro 型として合成され pro 型 (膜結合型) として細胞表面に発現し酵素によるプロセッシングを受け s 型 (分泌型) となり EGF 受容体に結合しオートクリン増殖因子として作用する。また HB-EGF は pro 型 (膜結合型) も CD9 と共存してジャクスタクリン増殖因子として表皮ケラチノサイトの細胞増殖を促進することが培養系において明らかにされた。しかし *in vivo* における pro 型 HB-EGF の作用はまだ明らかでない。一方、尋常性乾癬は慢性難治性皮膚疾患の代表的存在の 1 つで、表皮の異常な増殖亢進を特徴とするが、その原因やメカニズムはまだ不明の点が多い。乾癬病変部の細胞は *in vitro* に移すと正常化するため病態におけるケラチノサイト異常増殖と増殖因子との関係を調べるには患者組織を用いた研究が不可欠となる。

この論文は pro 型 HB-EGF を特異的に認識する抗体と pro 型と s 型の両者を認識する 2 種類の抗体を用いて正常ヒト皮膚における pro 型 HB-EGF、CD9 の局在と共存を免疫組織染色と蛍光抗体二重染色を用いて明らかにし、HB-EGF と CD9 の発現を乾癬病変部、非病変部で免疫組織学的に比較検討したものである。

本研究では HB-EGF が正常皮膚において膜結合型として存在し CD9 と共通の局在性を示し *in vivo* においてもジャクスタクリン、オートクリン増殖因子としてケラチノサイトの細胞増殖の制御に関与している可能性を示唆すると共に乾癬病変部では HB-EGF の発現亢進を認め乾癬表皮ケラチノサイトの増殖亢進に TGF- α や amphiregulin と共に一役を担っている可能性を示した。以上の成果は乾癬病態の解明に新たな知見を加えたものとして学位論文に値すると考える。