

|          |   |
|----------|---|
| 氏名       | こいずみ みちこ<br>小泉 美智子  |
| 学位の種類    | 博士(農学)  |
| 学位記番号    | 甲第374号  |
| 学位授与年月日  | 平成17年 3月15日   |
| 学位授与の要件  | 学位規則第4条第1項該当  |
| 学位論文題目   | 新生児期ラット皮膚創傷の再上皮化に関する研究<br>(Studies on reepithelialization during wound healing<br>in neonatal rat skin) |
| 学位論文審査委員 | (主査) 猪原節之介<br>(副査) 宮田浩文 山野好章 黒田正明<br>松崎 貴   |

## 学位論文の内容の要旨

皮膚創傷治癒は一般に、血液凝固とそれに続く炎症反応、肉芽形成、再表皮化といった過程が時間的に重複しながら進み、多くの異なる組織や細胞型の協調した作用を必要とする複雑な過程である。古くから研究が進められてきた創傷治癒であるが、その仕組みの全貌は未だ明らかになっておらず、しばしば傷跡(瘢痕)が残り、失われた上皮付属器も再生されない。ゆえに創傷治癒研究の目標の一つは、どのようにしたら損傷を負った領域をもっと完璧に再構成できるかを理解することである。さらに、基礎生物学的視点からとらえると、個体発生の過程や組織に依存した治癒様式の違いが、どのように構築してきたのかという問題が浮かび上がる。また、創の再上皮化過程と形態形成運動の間には、シグナル伝達や細胞性応答にいくつかの共通点が見受けられる。

著者は、創傷治癒過程で起こる事象の中でも特に、再上皮化と呼ばれる欠損を覆う表皮の再生機構について解析を行っている。表皮は体表面を覆う皮膚の最外層にある上皮組織であり、互いに細胞間結合により接着し合った表皮細胞が層を成す。最内層の基底細胞層で分裂した細胞は、有棘細胞、顆粒細胞を経て細胞内小器官を失った角化細胞へと終末分化しながら皮膚表面に上方移動する。損傷後、表皮細胞は創周囲表皮から欠損に動員され、創床上を移動し、創域を再び表皮によって覆う。つまり、再上皮化過程は、細胞接着とそれに伴う細胞間や細胞—細胞外マトリックス間相互作用、分化、移動といった、多細胞生物体の構築に必須のいくつかの要素が複合して行われる、細胞生物学的に非常に興味深い現象と言える。

そこで、皮膚創傷治癒過程における再上皮化の機構を明らかにするため、本学位論文では、新

生児期ラットの背部皮膚に全層欠損創を施し、治癒過程における表皮の形態学的解析を行った。一つ目の焦点は、創への表皮細胞の動員、つまり表皮細胞がどこから供給され、どのような特徴を獲得することで欠損部へ移動するようになるのかを明らかにすること。二つ目の焦点は、創部を覆うまで続く協調した表皮細胞の移動はどのようにおこなわれているのか、この機構への理解を得ることである。これら2つの要素は、再上皮化全体の機構を知る上で重要な位置を占める。

再上皮化に動員される表皮細胞について、上皮特異的中間径フィラメントであるケラチンフィラメントを構成する、いくつかのケラチンタンパク質に対する抗体を用いて、免疫組織化学的解析を行った。その結果、移動が始まる前の創周囲表皮において、ケラチンの発現制御に変化が生じた。これは、欠損部へ供給され得るための表皮細胞の能力の獲得に、ケラチンが影響を及ぼしている可能性を示唆する。準備期を経た後、二種類の表皮細胞が欠損に動員された。keratin14 (K14)を発現するが、K6やK10は発現していない細胞"leading edge cells"と、K14およびK6を発現し、K10を発現しない細胞"immature spinous cells"である。leading edge cellsは、基底細胞層から供給されたと考えられ、これに続き、ケラチンの発現制御の変化に伴い出現したK14とK6が発現する有棘層下層からimmature spinous cellsが欠損に動員され、多層の"migrating epithelium"を形成した。K10が発現するsuprabasal細胞は、欠損に向かって移動しないことが示された。

次に、欠損に向かって表皮細胞が移動するとき、どのように多層の細胞シートを維持して移動するのかを知るために、細胞間接着構造 adherens junctions (AJs)を構成するカドヘリンの発現を調べた。準備期において、E-, P-cadherin 両者の発現パターンに変化が見られ、結果として創周囲基底細胞間には、点状パターンのP-cadherinの介在するAJsによってつながっていた。このようなAJsの変化は基底細胞間の接着を緩め、可動性を増した基底細胞層の細胞の欠損に向かった移動に帰着した。また、通常基底細胞層に限局するP-cadherinの発現が、創周囲suprabasal層において見られ、P-cadherinが終末分化の遅延に関与し、immature spinous cellsを欠損に動員することに役割を果たしていることが示唆された。本実験は、再上皮化過程の表皮細胞が、cadherinの発現レベルだけでなく、細胞境界におけるAJsパターンも変化させることを示し、組織再構築におけるAJの重要な関与の可能性を提示した。また、再上皮化過程におけるE-cadherin, P-cadherinの異なる挙動は、それぞれが別個の役割を果たしていることを示唆する。今回示唆されたP-cadherinの表皮細胞終末分化の再プログラミングにおける役割についてさらに解析を進めることで、未だはっきりと分かっていない表皮におけるP-cadherinの役割を明らかにすることが期待できる。

以上の結果を総じると、ラット新生児期皮膚の再上皮化が、欠損周囲の広域な表皮における終末分化と細胞間接着の速やかな改変によって達成されると結論づけられる。基底細胞層の細胞は、AJsによる細胞間接着をおそらく緩めることで、互いに接触を保ちつつも欠損への可動性を獲得すると考えられる。さらに、基底細胞層由来の細胞に続いて、通常の終末分化過程からはずれたimmature spinous cellsが欠損に動員される。今後証明すべきことであるが、K14, K6, そしてP-cadherinが、終末分化を制御してこの細胞を創に供給することに役割を果たしている可能性が強いと思われる。これら二種類の表皮細胞が集団で、多層のシートとして移動することは、再上皮化過程の表皮の機械的強度維持と、表皮の機能回復に有利に働くであろう。今後、創周囲の表皮細胞に、今回観察されたような形態変化を引き起こし、創から離れた細胞にまで情報を伝達するシグナルや、細胞シートの移動の動力の探索によって、再上皮化の機構がさらに詳細に明らかになるだろう。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、創傷治癒における再上皮化の過程を形態学的、免疫組織化学的解析を行うことにより、最上皮化に主体的に関与する表皮細胞集団を特定し、かつ、そのような表皮細胞運動の最大の特徴である多層細胞シートを維持した運動の制御に細胞接着分子カドヘリンが密接に関与することを明らかにした。

申請者は、新生児期ラットの背部皮膚に全層欠損創を施し、再上皮化に動員される表皮細胞について、上皮特異的中間径フィラメントであるケラチンフィラメントを構成する、いくつかのケラチンタンパク質に対する抗体を用いて、免疫組織化学的解析を行った。その結果、移動が始まる前の創周囲表皮において、ケラチンの発現制御に変化が生じることを見出した。これより、欠損部へ供給され得るための表皮細胞の能力の獲得に、ケラチンが影響を及ぼしている可能性が示唆された。準備期を経た後、二種類の表皮細胞が欠損に動員された。keratin14 (K14) を発現するが、K6 や K10 は発現していない細胞"leading edge cells"と、K14 および K6 を発現し、K10 を発現しない細胞"immature spinous cells"である。leading edge cells は、基底細胞層から供給されたと考えられ、これに続き、ケラチンの発現制御の変化に伴い出現した K14 と K6 が発現する有棘層下層から immature spinous cells が欠損に動員され、多層の"migrating epithelium"を形成した。K10 が発現する suprabasal 細胞は、欠損に向かって移動しないことが示された。

次に、欠損に向かう表皮細胞の移動において、いかに多層の細胞シートが維持され、細胞移動に関わるかを知るために、細胞間接着構造 adherens junctions (AJs)を構成するカドヘリンの発現を解析した。準備期において、E-, P-cadherin 両者の発現パターンに変化が見られ、結果として創周囲基底細胞間には、点状パターンの P-cadherin の介在する AJs によってつながっていた。このような AJs の変化は基底細胞間の接着を緩め、可動性を増した基底細胞層の細胞の欠損に向かった移動に帰着した。また、通常基底細胞層に限局する P-cadherin の発現が、創周囲 suprabasal 層において見られ、P-cadherin が終末分化の遅延に関与し、immature spinous cells を欠損に動員することに役割を果たしていることが示唆された。本実験は、再上皮化過程の表皮細胞が、cadherin の発現レベルだけでなく、細胞境界における AJs パターンも変化させることを示し、組織再構築における AJ の重要な関与の可能性を提示した。また、再上皮化過程における E-cadherin, P-cadherin の異なる挙動は、それぞれが別個の役割を果たしていることを示唆する。今回示唆された P-cadherin の表皮細胞終末分化の再プログラミングにおける役割についてさらに解析を進めることで、未だはっきりと分かっていない表皮における P-cadherin の役割を明らかにすることが期待できる。

以上の解析結果を総合すると、ラット新生児期皮膚の再上皮化が、欠損周囲の広域な表皮における終末分化と細胞間接着の速やかな改変によって達成されるのではないかと結論づけることができる。基底細胞層の細胞は、AJs による細胞間接着をおそらく緩めることで、互いに接触を保ちつつも欠損への可動性を獲得すると考えられる。さらに、基底細胞層由来の細胞に続いて、通常の終末分化過程からはずれた immature spinous cells が欠損に動員される。今後証明すべきことであるが、K14, K6, そして P-cadherin が、終末分化を制御してこの細胞を創に供給することに役割を果たしている可能性が高いと思われる。上述の二種類の表皮細胞が集団で、多層のシートとして移動することは、再上皮化過程の表皮の機械的強度維持と、表皮の機能回復に有利に働くであろう。今後、創周囲の表皮細胞に、今回観察されたような形態変化を引き起こし、創から離れ

た細胞にまで情報を伝達するシグナルや、細胞シートの移動の動力の探索によって、再上皮化の機構がさらに詳細に明らかになるだろう。

本論文は、以上のように、*in vivo* 系の厳正な解析と論証を展開し、創傷治癒あるいは再上皮化の解明はもとより、生物科学の発展のために多くの重要な知見と示唆をもたらしたと評価し、博士（農学）の学位論文に値するものであることを認める。