

(様式第 13 号)

学 位 論 文 要 旨

氏名: 新井 美存

題目: ラット新生児皮膚における再上皮化過程の形態学的解析

(Morphological analyses of the reepithelialization process in neonatal rat skin)

創傷治癒過程における再上皮化は、生物が生きていくために必要不可欠な能力である。再上皮化過程には創部及び創周囲では多くの性質が異なる細胞や組織が動員され、それぞれが複雑に絡み合いながら作用すること、そして創傷治癒の様式は個体発生の段階によって異なることが知られている。しかし、その仕組みには未だ解明されていない部分が多く、特に表皮に注目した *in vivo* 実験系の研究は少ない。そこで、本研究では、再上皮化過程における表皮の再生のメカニズムを形態学的に解析した。

創周囲皮膚切片のヘマトキシリンエオシン染色および上皮特異的中間径線維であるケラチン抗体染色の結果から、生後 1 日齢ラット新生児の背部皮膚に全層切創を施すと、まず創縁表皮がシートの状態を保ったまま這い出し、傷つけ後 48 時間までに創部を被覆した。その後、創部を塞いだ表皮は一度真皮の方向へ肥厚してから薄化するという過程を経て、正常状態を回復した。これまで、創閉鎖後の表皮については殆ど研究されていないことから、著者はまずこの創閉鎖後に創部の表皮の厚さが変動する現象に着目し、その原因の究明を試みた。

創部を被覆した表皮の厚さは、傷つけ後 96 時間で最大値に達し、その後薄化していった。この肥厚した創部表皮では細胞数が増加していたことから、まず、創部の表皮において細胞増殖とアポトーシスについて解析した。すると、TUNEL 陽性細胞の割合の変化から、肥厚した表皮が薄化し始めている傷つけ後 120 時間の表皮上層でアポトーシスが増加することが明らかになった。続いて、表皮ケラチノサイトの分化マーカーである *loricrin*, *involucrin*, *filaggrin* を免疫組織染色したところ、傷つけ後 96 時間から 120 時間の創部肥厚化表皮の有棘層から顆粒層への転換点において、ケラチノサイトの終末分化に遅延、あるいは分化速度の変動が起きていることが示唆され、これが創部表皮の肥厚の原因である可能性が高まった。そして、創部表皮が肥厚している傷つけ後 96 時間では、表皮ケラチノサイトの終末分化の後期で働く *caspase 14* の抗体で染色されない領域が表皮下部で広く観察されたが、一転して、薄化し始めた傷つけ後 120 時間では同抗体の染色範囲がより表皮下層まで拡大し、染色強度も増加した。以上の結果から、表皮ケラチノサイトの終末分化および角質化の遅延と加速の調和が、新生児ラットの創部表皮の厚さが変動する一要因であると結論づけた。

続いて、著者は創閉鎖過程における表皮の役割や振る舞いを調査するために、真皮の損傷をできる限り小さく抑えた“微小創”を施した。この傷は全層切創と異なり、表皮全層と真皮の上部 3 分の 1 程度のみを切断してそれ以下の皮膚は結合を保ち正常なまま残されるため、より簡素化された表皮創閉鎖の実験系となり、本質的な表皮の動向を解析できることが期待された。ラット新生児皮膚にこの微小創をつけ、細胞の移動に関与する *actomyosin* 細胞骨格系や、アクチン線維を細胞骨格とするアドヘレ

ンスジャンクションを構成する膜貫通型細胞間接着分子であるカドヘリン、ケラチン等に注目して、創縁表皮の動きや形態変化を経時的に解析した。

ラット新生児皮膚に施した微小創は、傷つけ後 12 時間までに創部表皮の移動によって創閉鎖が完了し、この移動する創縁表皮では P-カドヘリンの発現パターンの変化、正常な皮膚ではみられない K6 ケラチンや活性型のみオシン (p-MLC) が観察された。一方、創部の真皮では、創閉鎖完了後の傷つけ後 18 時間でもまだ間隙が残されたままであり、本研究のような小さな傷でも、表皮と比較して真皮の修復は遅れることが示された。また、ミオシンのリン酸化に關与する Rho-associated protein kinase (ROCK) を創部局所的に阻害したところ、創縁表皮における p-MLC は検出されず、傷つけ後 12 時間では創閉鎖が完了しなかった。一方で、ミオシンのリン酸化と拮抗する経路の Rac 1 を阻害すると、傷つけ後 8 時間で観察された p-MLC が 12 時間では消失し、創閉鎖も 12 時間ではおこらなかった。以上の結果から、ラット新生児皮膚の創閉鎖は、主に Rac 1 や Rho A に依存した actomyosin 細胞骨格系を介した、真皮に依存しない表皮のみの能動的な運動によって遂行される過程であることが示唆された。

さらに、微小創を成体ラットに施すと、傷つけ後 18 時間でも創閉鎖には至らなかった。新生児皮膚は成体と比べて真皮の物理的な影響が小さく、創閉鎖過程における純粋な表皮の動向を解析するのに有利であると考えられる。上皮治癒様式は個体発生の段階によって異なり、成体と比較して新生児や胎児ではより迅速な創閉鎖が起こることが知られているが、本研究もこれを支持する結果といえる。

過去の多くの研究から、皮膚創傷治癒である再上皮化は、多様な細胞や組織が参加する複雑な過程であるといわれている。しかし、その内の表皮創閉鎖という事象に限ると、純粋に表皮のみによる、Rho small GTPases を介した actomyosin 細胞骨格による能動的な移動だけで説明ができるイベントなのかもしれない。そして創閉鎖後にも、真皮が再構成されている間に、表皮はケラチノサイトの終末分化等を変動させることによって劇的な厚さの変化を遂げる。本研究は、*in vivo* 実験系において、受創に対する表皮の動態を明らかにし、表皮の持つ潜在能力を示唆した。