

学 位 論 文 題 名

ミンク皮膚の細胞外マトリックスに関する研究

ー成長および換毛に伴う変化ー

学位論文内容の要旨

本研究は、毛の発生・成長・退化を季節換毛という形で年に2回も現出する代表的毛皮動物であるミンクを実験動物として用い、成長や毛周期に伴う細胞外マトリックスの変化、すなわち、ミンク皮膚の機能状態の変化に伴う細胞外マトリックス構成成分の立体構造の変化、組織化学的变化および生化学的变化を追究し、ミンクの毛衣産生に伴う皮膚細胞外マトリックスの変化を明らかにすると共に細胞外マトリックスの生理機能を検討したものである。

本研究で得られた主な成果は以下のように要約される。

(1)ミンク真皮表面のコラーゲン細線維の立体構造は成長や毛周期に伴って顕著に変化し、活性期には表皮と真皮の接触面積を増加させ、活性期におけるより活発な真皮ー表皮相互作用を促進している走査電子顕微鏡像が観察された。また真皮断面のコラーゲン細線維の走査電子顕微鏡像は、休止期には堅くてコンパクトにまとまっている静的な構造を呈している反面、活性期にはのびのびと活動的な構造を呈していた。しかし、休止期の方がコラーゲン含量が多いことから、活性期におけるコラーゲンの活動的な立体構造は量的な変化ではなく質的な変化に起因しているものと推測された。

一方、成長に伴うコラーゲン細線維個々の肥大化と細線維束の高密度化が観察され、外部からの機械的および化学的刺激に対する抵抗力、すなわち成長に伴う支持機能の増加をコラーゲンが担っていることも確認された。

これらのコラーゲンをタイプ別に分けて見ると、I型コラーゲンは活性期、休止期にかかわらず真皮全体にほぼ均一に存在しており、SDS-PAGE像においてもミンク皮膚中に最も多いことと、密性結合組織においてはI型コラーゲンがその主体を構成するというよく知られた事実からミンク皮膚総体を構造的に支えているのはI型コラーゲンであることが確認された。一方、III型コラーゲンの局在は特徴的であった。創傷治癒時など急速にコラーゲンの蓄積を必要とする時にIII型コラーゲンが多く合成されることと同様に、皮脂腺以下の活性期肥厚部にIII型コラーゲンが集中して存在している免疫染色像が確認され、活性期における活動的なコラーゲン細線維の立体構造の一因はIII型コラーゲンであり、III型コラーゲンはミンク真皮コラーゲンの機能状態を構造的に左右する因子と考えられた。

ミンク皮膚に含まれているコラーゲン量は活性期より休止期の方が高く、総タンパク質量に占めるコラーゲン量の割合も冬毛休止期に最も高かったので、剥皮期の安定した真皮はコラーゲンの存在量によっても支えられていると考えられた。さらに、これらのコラーゲンは熱安定性やグアニジン塩酸に対する溶解性の実験結果から、成長に伴って、また休止期の方が安定していることが明らかとなり、このことはコラーゲン分子間の非還元性架橋（成熟架橋）結合が増加するためと考えられた。しかし、ペプシンによる溶解性は活性期に非常に低く、コラーゲンのテロペプチドがペプシンに消化され難かったのは、コラーゲン自体だけの問題ではなく他の細胞外マトリックスとコラーゲンの相互作用によりコラーゲンに安定性が与えられたからであると考えられた。

(2)弾性線維はミンク真皮中の基底膜直下および毛包周辺部での存在が認められた。特に毛包の発達の著しい活性期には総エラスチン含量や α -エラスチン含量も増加し、毛包の発達の際、結合組織性毛包と真皮を連結することにより毛包を支えたり、毛包の周りに伸縮性を与えたりしていると考えられた。また、総エラスチン量に占める α -エラスチン量が加齢に伴い減少した

のは、熱酢酸処理でも可溶化されない架橋結合が成長に伴って増加し、量的には減少しても質的な変化がその機能を支えているものと考えられた。さらに、ギ酸消化法による走査電子顕微鏡像においては、光学顕微鏡での観察結果と同じくエラスチンは少量ではあるが、真皮層全体に散在しており、特に毛包周辺部に密集して存在していることが確認された。しかし、大動脈に存在するような板状構造は観察されなかったので大動脈中のエラスチンとは異なった働きをしているものと考えられた。

基底膜中に存在するIV型コラーゲンとラミニンおよびその周辺に存在するフィブロネクチンは多少染色パターンは違うが、表皮直下、毛包周辺および皮脂腺など表皮系細胞由来の器官に接して存在することが確認され、血管や毛乳頭での局在も確認された。特に基底膜周辺でのこれらの細胞外マトリックスは毛包組織の分化や毛の形態形成はもちろん、表皮系細胞の真皮組織への接着に深く関与していると考えられた。

さらに、弾性繊維、エラスチン、IV型コラーゲン、ラミニンおよびフィブロネクチンは総体的には表皮系器官と真皮組織が接触する領域に局在しており、毛周期に伴う変化もまた毛包の伸長・拡大に伴うものであって、真皮層全体の細胞外マトリックスに影響をおよぼす要因ではなく、真皮コラーゲンの変化と毛包の変化を連結し調節する役割を担っているものと考えられた。

(3)休止期および活性期のミンク真皮全体、活性期の毛包周囲にはプロテオグリカンが局在し、その含量は活性期に多いことが明らかになった。一般に線維性結合組織においては、コラーゲンの存在量に比べプロテオグリカン量が多いほど密性度が低いことから、活性期真皮の方が休止期より疎性であることが示唆されたが、個々のプロテオグリカンは各々特有の機能や特性を有していることが知られている。個々のプロテオグリカン特にグリコサミノグリカンに関する検討を行うとともに、コラーゲンや他の細胞外マトリックスとの相互作用について観察してみると、活性期のミンク皮膚では、コラーゲンとプロテオグリカンの相互作用は緊密化し、コラーゲン細繊維の立体構造

は疎性結合組織様となり、細胞外マトリックスはタンパク質分解酵素や変性剤の影響を受け難くなっていた。そして、活性期における活動的なコラーゲン細繊維の立体構造の形成にはIII型コラーゲンとデルマタン硫酸プロテオグリカンが関与しており、休止期の静的で安定した立体構造の形成にはI型コラーゲンとヒアルロン酸が関与しているものと考えられ、活性期に増加したプロテオグリカンはより緊密な相互作用をコラーゲンと保っていることが明らかとなった。

以上の結果からミンク皮膚の細胞外マトリックスは成長や毛周期に伴って絶え間なく変化し、特に活性期における毛衣の産生に伴って個々のマトリックス構成成分が顕著な変化を示すことが明らかとなった。また、細胞外マトリックスの機能の場に着目すると本研究で追究したマトリックス成分は、I型、III型、V型、VI型コラーゲン、ヒアルロン酸、デルマタン硫酸プロテオグリカンの様に主に真皮全体の機能に関わるもの、IV型コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカンの様に主に基底膜成分として機能しているもの、さらにエラスチン、フィブロネクチン、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの様に基底膜周辺や毛乳頭の機能に関与しているものに分類された。そして、それぞれの機能の場における個々の細胞外マトリックスは共存する成分間での相互作用はもとより、連続した組織とのより大きな共同作用により細胞外マトリックスは多様でユニークな生理機能をミンク真皮で発揮していることが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 近 藤 敬 治
副 査 教 授 高 橋 興 威
副 査 教 授 島 崎 敬 一
副 査 助 教 授 中 村 富 美 男

学 位 論 文 題 名

ミンク皮膚の細胞外マトリックスに関する研究

—成長および換毛に伴う変化—

本論文は、図表57、引用文献110を含み、6章からなる総頁数148の和文論文である。別に、参考論文3編が添えられている。

ミンクは季節換毛によって、毛の発生から成長や老化（退化）までの一連の過程を年に2回現出するため、哺乳類に於ける毛衣の産生機序を解明する上で恰好な実験動物である。換毛に関する従来の研究は主に表皮系器官を対象としたものであり、真皮細胞外マトリックスとの関連を本格的に追究したものはほとんどない。本研究はミンクの成長および換毛に伴う皮膚細胞外マトリックスの動態を形態学的、生化学的に追究したものである。主な研究成果は以下のよう

1. アルカリ細胞消化法によって作製した試料の走査電子顕微鏡観察から、コラーゲン細線維の立体構造は換毛周期に伴って顕著に変化することを明かにした。すなわち、休止期の真皮表面は平坦であるが、活性期の真皮表面には表皮と真皮の接触面を増加させる凹凸や多くの皺が観察され、活性期には表皮と真皮の相互作用が促進されていることを形態学的に確認した。真皮断面の観察像から、休止期ではコラーゲン細線維が密に詰まった静的な構造を呈するが、活性期では活発な活動を窺わせる動的な構造に変化することを明らかにした。また、皮膚組織に存在するタイプ別コラーゲンの局在を調べ、活性期にはⅢ型コラーゲンが真皮下部に集中することを観察した。一般に創傷治癒時に多く合成されるⅢ型コラーゲンはミンク真皮の生理機能、特に換毛時における新たな毛の産生とも深く関わっ

ていることを明かにした。

2. 換毛に伴うミンク皮膚中の細胞外マトリックスの量的および質的变化を追究し、①活性期においてコラーゲン含量は少ないが、ペプシンに対する溶解性は極度に低下すること、②デルマトン硫酸プロテオグリカンの主成分とする総プロテオグリカン量は活性期で増加することを見いだしている。活性期におけるコラーゲンの溶解性の低下は活性期に疎となったコラーゲン細線維間をプロテオグリカンが埋めることによってコラーゲンに対するペプシンの作用を抑制するため、特にコラーゲンのテロペプチドがプロテオグリカンによって保護されるためとしている。また、活性期における弾性線維が毛包周辺で発達することを観察すると共にその主成分であるエラスチン含量の増加も確認し、活性期における弾性線維の発達は結合組織性毛包と表皮とを連結することにより毛包を支持する役割を担うためと推察している。さらに、Ⅳ型コラーゲン、ラミニンおよびフィブロネクチンが表皮系器官と真皮との接触領域に局在することを観察し、これらの細胞外マトリックスは活性期における表皮系器官と真皮の相互作用を調節するものと考察している。

3. 成長に伴う細胞外マトリックスの主な変化として①コラーゲン細線維直径の増加と細線維束の高密度化、②コラーゲンやエラスチンの安定化、③ヒアルロン酸の増加を確認している。これら加齢に伴う線維性タンパク質の安定化は成熟架橋が形成されることによるものであり、増加したヒアルロン酸の寄与による立体構造の安定化と相俟って剥皮期における真皮の成熟化をもたらすとしている。

以上のように、本研究は季節換毛動物であるミンクを実験材料として毛の発生・成長・老化に伴う皮膚細胞外マトリックスの動態を初めて明らかにすると共に、細胞外マトリックスの生理機能そのものの解明に寄与するものとして学術上高く評価される。

よって、審査委員一同は本論文の提出者 朴 在仁 は最終試験の結果と合わせ博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格があるものと認定した。