

学 位 論 文 題 名

Identification of insulin-like growth factor binding proteins cultured human epidermal keratinocytes. (ヒト皮膚角化細胞におけるインスリン様成長因子結合蛋白の同定)

学位論文内容の要旨

I 研究目的

インスリン様成長因子 (Insulin-like growth factor ; IGF)系は、IGF-I, IGF-IIとその受容体、およびIGF 結合蛋白 (IGF binding protein ; IGFBP) からなり、細胞分化、成長調節に重要な役割を演じている。IGFはendocrine 的、さらには paracrine/autocrine 機序でも、その作用を発揮していると考えられている。成長ホルモン過剰状態では皮膚の角化層が厚くなる事が知られている。従来の研究により、ヒト皮膚において、真皮線維芽細胞はIGF-Iを産生し表皮角化細胞の成長を促進するが、表皮角化細胞自身はIGF-Iの産生やGH受容体の発現はないが、IGF-I受容体を有する事から、真皮線維芽細胞から分泌されたIGF-Iが表皮角化細胞を調節していると推測されている。一方、IGFBPはIGFの作用に対し、促進あるいは抑制的に働き、細胞の成長、分化に関与していると考えられている。現在までに6種類のIGFBP(1-6)が発見されているが、真皮線維芽細胞ではそのうち少なくとも4種類のIGFBPを産生している。しかし、表皮角化細胞におけるIGFBPの産生については未だ明らかではない。本研究は、ヒト表皮角化細胞におけるIGFBPの産生の有無、また皮膚の成長調節におけるIGFBPの役割を明らかにすることを目的とした。

II 方法

ヒトの前思春期男児の包皮より得た組織を用い、牛下垂体抽出物 (bovine pituitary extract ; BPE) 及び上皮成長因子 (epidermal growth factor ; EGF) 含有の無血清培養液 (以下 complete medium) により表皮角化細胞培養系列を確立した。培養液中のIGFBPの解析は Western ligand blot (WLB) 法で行い、さらにIGFBP-2, -3についてそれぞれの特異抗体で免疫沈降後に WLB 法を行い蛋白の同定を行った。またIGFBP-1, -3, -6に関しては radioimmunoassay (RIA) 法を用いて定量した。Messenger RNA (mRNA) の検出は培養細胞を用い、IGFBP-1から-6のcDNAを probe として Northern blot 法で行った。また一部のIGFBPの存在を確認するためにBPE, EGF除去培養液 (以下 growth factor-free medium) で同じく無血清下で表皮角化細胞を培養した。

III 結果

Complete medium で培養した表皮角化細胞の培養液を WLB 法で IGFBP の解析を行ったところ、分子量 24 kD, 32 kD, 34 kD および 37-42 kD の複数の IGFBP の band が認められた。またその band の出現パターンは継代培養の回数で変化した。すなわち early passage (primary - 4th passage) では 24kD, 32kD 及び 34 kD の IGFBP の band が主に認められ、また late passage (7th - 10th passage) では 24kD, 32kD, 34 kD に加え 37-42kD の band が特に強く認められた。IGFBP-2, -3 の特異抗体を用いて band の同定をしたところ、early passage の 32kD の band は IGFBP-2 と同定された。しかし 37-42kD に相当する IGFBP-3 は認められなかった。さらにより感度の高い RIA 法で IGFBP-1, -3, -6 について検討したところ early, late とともに IGFBP-3, -6 が検出され、特に late passage に著明に検出されたが、IGFBP-1 は

early, late 共に検出されなかった。IGFBP-3 の存在を明確にするため growth factor-free の条件下で early passage の培養液をWLB法で調べたところ、明らかな 37-42kD (IGFBP-3) と 24kD (IGFBP-4) の蛋白を認め、IGFBP-3 の存在が確認された。mRNA に関しては、complete medium にて培養した early passage の培養細胞において IGFBP-1, -2, -4, -6 の mRNA は検出され、特に IGFBP-2, -4 mRNA を強く認めたが、IGFBP-3, -5 に関しては認められなかった。

IV 考案

ヒト表皮角化細胞における IGFBP の産生及びその mRNA の存在を、WLB, 免疫沈降, RIA と Northern blot 法との組み合わせで検討し、ヒトの表皮角化細胞は4種類の IGFBP (-2, -3, -4, -6) を産生することを今回の研究で初めて明らかにした。

IGFBP-1 に関しては、28 kD の位置に弱い band が、また mRNA がわずかに認められたが、感度の高い RIA 法では検出されなかった。IGFBP-1 の産生の有無について今後の検討が必要である。WLB 法で見られた 32kD の band は、免疫沈降法にて IGFBP-2 と同定し、さらに mRNA の発現も確認しえた。IGFBP-4 は分子量が 24kD と、他の IGFBP よりかけ離れて小さいこと、また mRNA を検出しえたことより IGFBP-4 は存在すると考えられた。IGFBP-5 に関しては、通常 30kD の分子量を示すが、WLB 法では band が確認できず、さらに mRNA も検出できなかったため、角化細胞は IGFBP-5 を産生しないと考えられた。WLB 法での 34 kD の band は分子量から IGFBP-6 が考えられ、RIA 法と mRNA の存在から確認しえた。IGFBP-3 に関しては、complete medium を用いた際、WLB 法で early passage で band が認められず、また免疫沈降法でも同定できず、mRNA も認められなかったが、感度の高い RIA 法では検出できた。さらに growth-factor free medium を用いて検討したところ、WLB 法にて early passage に IGFBP-3 を確認できた。このことは medium 中の growth factor が IGFBP-3 の産生を調節していることを示唆する。

以上、ヒト皮膚において、表皮角化細胞は IGFBP-2, -3, -4, -6 を産生する事が明らかとなった。一方、真皮線維芽細胞は IGFBP-3, -4, -5, -6 を産生することが既に知られており、このことから IGFBP-2 は角化細胞に、IGFBP-5 は線維芽細胞に特徴的な分子で、他の IGFBP は両者に共通して存在するといえる。この事実をふまえると、共通の IGFBP-3, -4, -6 は真皮線維芽細胞で産生される IGF-I を表皮角化細胞へ輸送するという役割を担い、IGFBP-2 と IGFBP-5 はそれぞれ表皮、真皮の細胞表面で、IGF-I の IGF 受容体への結合に何らかの関与をしている可能性が考えられる。

今回の実験で角化細胞は独自の IGFBP を産生し、その産生は培養条件、継代培養の回数に依存することが示された。この継代回数依存性の IGFBP の変化は細胞の加齢による変化に起因するものか、また同じく継代培養の回数に依存し、角化細胞表面に存在するインテグリン接着分子発現との間に何らかの関係があるか否かの研究が必要と思われる。IGFBP の働きはヒト皮膚において IGF-I の輸送、また細胞表面での IGF-I の受容体への引き渡しなどに関与していると考えられるが、ヒト皮膚において EGF, fibroblast growth factor, transforming growth factor など様々な成長因子が細胞の分化に関与していると思われる、それらの growth factor と IGFBP との関連は興味深い。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 西 信 三
副 査 教 授 石 橋 輝 雄

学 位 論 文 題 名

Identification of insulin-like growth factor binding proteins cultured human epidermal keratinocytes. (ヒト皮膚角化細胞におけるインスリン様成長因子結合蛋白の同定)

インスリン様成長因子 (Insulin-like growth factor ; IGF)系は、IGF-I, IGF-IIとその受容体、およびIGF 結合蛋白 (IGF binding protein ; IGFBP) からなり、細胞分化、成長調節に重要な役割を演じている。従来の研究により、ヒト皮膚において、真皮線維芽細胞はIGF-Iを産生し表皮角化細胞の成長を促進することが知られているが、表皮角化細胞自身はIGF-Iの産生やGH受容体の発現はない。しかし、IGF-I受容体を有する事から、真皮線維芽細胞から分泌されたIGF-Iが表皮角化細胞を調節していると推測されている。一方、IGFBPはIGFの作用に対し、促進あるいは抑制的に働き、細胞の成長、分化に関与していると考えられている。現在までに6種類のIGFBP(1-6)が発見されているが、真皮線維芽細胞ではそのうち少なくとも4種類のIGFBPを産生している。しかし、表皮角化細胞におけるIGFBPの産生については未だ明らかではない。本研究は、ヒト表皮角化細胞におけるIGFBPの産生の有無、また皮膚の成長調節におけるIGFBPの役割を明らかにすることを目的とした。

〔方法〕 ヒトの前思春期男児の包皮より得た組織を用い、牛下垂体抽出物 (bovine pituitary extract ; BPE) 及び上皮成長因子 (epidermal growth factor ; EGF) 含有の無血清培養液 (以下 complete medium) により表皮角化細胞培養系列を確立した。培養液中のIGFBPの出現パターンの解析は Western ligand blot (WLB) 法で行い、それぞれのIGFBPの同定には特異抗体で免疫沈降後のWLB法で行った。またIGFBP-1, 3, 6に関しては radioimmunoassay (RIA)法を用いて定量した。Messenger RNA (mRNA) の検出は培養細胞を用い、IGFBP-1から-6のcDNAを probe として Northern blot 法で行った。一部のIGFBPの存在を確認するためにBPE, EGF除去培養液 (以下 growth factor-free medium) で同じく無血清下で表皮角化細胞を培養した。

〔結果〕 Complete medium で培養した表皮角化細胞の培養液のWLB法で、分子量24 kD, 32 kD, 34 kD および 37-42 kDの複数のIGFBPのbandを認めた。その band の出現パターンは継代培養の回数で変化した。すなわち early passage (primary-4th passage)

では 24kD, 32kD 及び 34 kD の IGFBP の band が主に認められ、また late passage (7th - 10th passage) では 24kD, 32kD, 34 kD に加え 37-42kD の band が特に強く認められた。IGFBP-2, -3 の特異抗体の免疫沈降法で、early passage の 32kD band は IGFBP-2 と同定したが、37-42kD に相当する IGFBP-3 は認めなかった。さらにより感度の高い RIA 法で IGFBP-1, -3, -6 について検討したところ early, late とともに IGFBP-3, -6 が検出され、特に late passage に著明に検出されたが、IGFBP-1 は early, late 共に検出されなかった。しかし、growth factor-free の条件下で early passage の培養液を WLB 法で調べたところ、明らかな 37-42kD (IGFBP-3) と 24kD (IGFBP-4) の蛋白を認め、IGFBP-3 の存在が確認された。mRNA に関しては、complete medium にて培養した early passage の培養細胞において IGFBP-1, -2, -4, -6 の mRNA は検出され、特に IGFBP-2, -4 mRNA を強く認めたが、IGFBP-3, -5 に関しては認められなかった。以上をまとめると、ヒト皮膚において、表皮角化細胞は IGFBP-2, -3, -4, -6 を産生する事が明らかとなった。また、IGFBP-3 に関しては、complete medium の培養系ではその存在は同定できないが、growth-factor free medium 培養の early passage 発現することを見いだした。このことは medium 中の growth factor が IGFBP-3 の産生を調節していることを示唆する現象で、新しい発見である。

本研究はヒト表皮角化細胞の培養系を確立し、その細胞における IGFBP の産生及びその mRNA の存在を、WLB, 免疫沈降, RIA ならびに Northern blot 法の組み合わせで検討し、ヒトの表皮角化細胞は 4 種類の IGFBP (-2, -3, -4, -6) を産生することを初めて明らかにした。さらに、IGFBP-3 の発現には medium 中の growth factor がその産生を調節していることを示唆する現象を見いだした。従来から、真皮線維芽細胞は IGFBP-3, -4, -5, -6 を産生することが既に知られていることから、IGFBP-2 は角化細胞に、IGFBP-5 は線維芽細胞に特徴的な分子であることを示唆する。

以上、本研究は皮膚角化細胞の IGFBP 産生、およびその同定を行い、真皮線維芽細胞とは異なる産生系であることを明らかにした。また、ある種の IGFBP の発現が growth factor の影響を受けることを見いだした。IGFBP の働きはヒト皮膚において IGF-I の輸送、また細胞表面での IGF-I の受容体への引き渡しなどに関与していると考えられるが、そのほか EGF、fibroblast growth factor, transforming growth factor など様々な成長因子との関連が示唆され、皮膚における IGFBP の意義について新しい展開を加えた点で、本論文は一般的かつ普遍的な評価に耐えるもので、博士 (医学) に値すると判定いたしました。