

学 位 論 文 題 名

皮膚構成細胞の分化と機能に関する研究

－細胞外マトリックスと培養細胞の相互作用－

学位論文内容の要旨

本研究は、皮膚各組織の主要構成細胞である線維芽細胞、脂肪細胞および角化細胞と細胞外マトリックス（ECM）との相互作用を培養系を用いて組織学的観点から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様に要約される。

（1）単層培養した線維芽細胞の免疫染色像から、最も早く細胞外におけるネットワークを形成するのはフィブロネクチンであることが明らかとなった。I 型コラーゲンの細胞外への分泌は最も遅かったが、最終的に形成される ECM の主体は I および III 型コラーゲンであった。一方、最初に発達したフィブロネクチンのネットワークは、最終的には退化していた。また、リジンおよびプロリンの水酸化酵素の補酵素であるアスコルビン酸非存在下において、細胞外のネットワーク形成が最も阻害されたのは I 型コラーゲンであった。I 型コラーゲンは、アスコルビン酸の添加時には立体的に発達した緻密なネットワークを形成していたにもかかわらず、無添加時には非常に粗雑な線維状の網目構造しか形成しなかった。逆に、アスコルビン酸の無添加時に細胞外のネットワークが発達したのはラミニンであった。これらのことから、元来存在していた真皮の ECM から単離された線維芽細胞は脱分化した状態にあり、潜在していたタンパク質の合成能を発現するが、アスコルビン酸の添加は生体内での本来の機能である I 型コラーゲンの産生を増大させ、単層培養時にも生体内に類似した

分化状態に線維芽細胞を戻すものと推測された。すなわち、細胞が産生した細胞外マトリックスは、細胞が生体内において保持していた機能を取り戻す作用を細胞に及ぼしていると考えられた。

コラーゲンゲル内で線維芽細胞を培養した場合、明確に細胞外に線維状のネットワークを形成していたのはフィブロネクチンのみであった。また、線維芽細胞がコラーゲンゲルの線維の立体構造を変化させていることが、SEM像によって確認された。これらのことから、コラーゲンゲル中における細胞外環境の再構築にはフィブロネクチンが関与していることが推測された。

(2) 前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化に伴う細胞外マトリックスと細胞との相互作用が明らかとなった。免疫染色像から単層培養時に前駆脂肪細胞が構築する最初の細胞外環境は、フィブロネクチン、ラミニンを骨格として、ここにIII、IV、VおよびVI型コラーゲンが付随するものであった。分化過程の初期段階まではフィブロネクチンのネットワーク形成が続き、この骨格にI、III、V、VI型コラーゲンによるECMの蓄積が進んでいった。一方、当初は細胞外のネットワーク形成に参加していた基底膜構成成分は分化を開始した細胞の周囲に移行した。脂肪細胞への分化が進み細胞外マトリックスが安定した状態では、III型コラーゲンを主体とし、そこにV、VIそしてI型コラーゲンが加わったECMが細胞周囲に存在したが、新たな蓄積は行われなかった。フィブロネクチンはコラーゲンを主体としたECMの形成に伴い、その蓄積量が減少した。基底膜構成成分の局在は分化に伴って球形となった細胞周囲に限定され、また、III、V、VI型コラーゲンも基底膜の構造を支持するように細胞周囲に密に存在した。このことから、脂肪細胞の基底膜は、まず細胞外にネットワーク状に構築されたものが分化の進行に伴って細胞膜の周囲へと移行し、最終的に個々の細胞を取り囲むように形成されることが明らかとなった。

一方、未分化の状態で維持した場合、型別コラーゲンの中で特異的に細胞層に蓄積されていたのはVI型コラーゲンであり、VI型コラーゲンがフィブロネ

クチンと並んで初期の細胞外マトリックスの構築に重要な役割を担っていることが示唆された。

コラーゲンゲル内での脂肪細胞が構築したネットワークで最も発達していたのはフィブロネクチンであった。また、III、IV、V、VI型コラーゲンやラミニンも分泌していた。しかし、I型コラーゲンの分泌は行わず、コラーゲンゲルの再構築を含むI型コラーゲンとの相互作用はフィブロネクチンを介して行うものと考えられた。

単層培養で分化誘導した脂肪細胞のSEM像では、成熟した脂肪細胞が細い線維により構成されている2、3層の薄膜で覆われたような像が観察された。この線維は脂肪細胞間を連結する様に走行しており、脂肪細胞の細胞間ネットワークを形成していた。脂肪細胞の表面には細い線維が密集しており、細胞自身が構築した基底膜と思われた。

発生由来を同じくする線維芽細胞と前駆脂肪細胞は単層培養時の初期において自身の細胞外環境の構築のためECM構成成分の産生を行っており、その様式は類似していることが示された。いずれの場合もまず、ECM構築の最初に関与していたのはフィブロネクチンであり、フィブロネクチンのネットワーク構築が、その後のコラーゲンのネットワーク形成の足場となっていた。しかし、コラーゲンを中心としたECMの構築が進むとその役割を終えたフィブロネクチンのネットワークは減退していった。これは細胞外マトリックスから細胞への影響であり、細胞と細胞外マトリックスとが双方向的に影響しあっているものと考えられた。

(3) 単層培養した角化細胞の免疫染色像から、単離した角化細胞がIV型コラーゲン、VII型コラーゲン、ケラチンおよびトランスグルタミナーゼを同時に合成していることが明らかになった。このことは、培養系においては、生体の細胞が分化過程で段階的に発現する多くの機能を同時に発現していることを示しており、この要因としては生体内における細胞外環境からの分離が大きく影

響したものと考えられた。

線維芽細胞を含むコラーゲンゲル上で角化細胞を重層化した皮膚モデルからは、生体内での角化細胞の機能を反映している結果が得られた。すなわち、角化細胞の重層化、核の消失、基底膜の形成、トランスグルタミナーゼの発現による細胞分化の実行である。さらに、VII 型コラーゲンがごく一部ながら基底膜部に局在していたことから、この皮膚モデルが扁平重層上皮の特性を有することを確認した。また、線維芽細胞のゲル内培養のみでは観察されなかった抗ラットI 型コラーゲン抗体に対する陽性反応が確認されたことから、角化細胞の存在により線維芽細胞がI 型コラーゲンの分泌を行うようになった可能性が示唆された。

以上の結果から、本来、生体内における細胞は機能的に特殊化し分化した状態にあるが、これを単離、すなわち生体での細胞外環境である細胞外マトリックスから隔離すると脱分化した状態になることが明らかとなった。脱分化した細胞は生体内では見られない潜在的な機能をも発現し、この脱分化した細胞は自身の環境の再構築のため細胞外マトリックスを産生、分泌した。一方、細胞により構築された細胞外マトリックスは逆に細胞に働きかけ、本来の生体内での挙動を取り戻させた。しかし、このことは単層培養時における細胞と細胞外マトリックスとの相互作用であり、コラーゲンゲル内培養では様相が一変した。コラーゲンゲル内では、細胞外マトリックスの産生は抑制され、これは、より生体に近い環境であるコラーゲンゲル内に置かれた細胞が、本来の分化した状態に戻ることに由来したものと思われた。

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 助 教 授 中 村 富 美 男

学 位 論 文 題 名

皮膚構成細胞の分化と機能に関する研究

－細胞外マトリックスと培養細胞の相互作用－

本論文は図43，引用文献80を含み，5章からなる総頁数120の和文論文である．別に，参考論文2編が添えられている．

動物皮の主成分であるコラーゲンは皮革やゼラチンへの利用にとどまらず，食品包装剤，塗料配合剤，化粧品配合剤へとその用途を広げている．さらに，近年急速に進展してきたコラーゲンに関する生理・生化学的基礎研究の成果をふまえた生体材料としての利用が期待されている．コラーゲンを生体に移植すると周辺組織から細胞が進入し，移植コラーゲンの吸収と生体による組織の再構築が進行する．この組織再構築は細胞と細胞外マトリックスの相互作用に基づくものであるが，その詳細は未だ不明な点が多い．

本研究は皮膚構成細胞である線維芽細胞，脂肪細胞，角化細胞による細胞外マトリックス（以下マトリックスと略記）の構築を単層培養およびコラーゲンゲルを用いた3次元培養で追究すると共に，表皮の重層化を試みたものである．得られた主な成果は以下のようにまとめられる．

1．線維芽細胞の単層培養におけるマトリックスの構築状況を追究し，細胞によって最初に形成されるネットワークはフィブロネクチンであるが，最終的に形成されるマトリックスではI，Ⅲ型コラーゲンが主体をなし，フィブロネクチンは退化することを観察している．一方，ゲル内培養ではフィブロネクチンのみが分泌されることを観察し，培養系において線維芽細胞がマトリックスを構築する際にはフィブロネクチンが重要な役割を果たしているとしている．また，リジン，プロリンの水酸化酵素の補酵素であるアスコルビン酸無添加の培養実験から，ラミニンによるネットワークの発達を観察している．このことは生体内で上皮系の細胞によって発現される基底膜構成成分であるラミニン合成能が線維芽細胞にも潜在的に存在することを実証したものである．

2. 前駆脂肪細胞から脂肪細胞への分化に伴うマトリックスと細胞との相互作用を明らかにしている。すなわち、前駆脂肪細胞が構築する最初の細胞外環境は基底膜成分であるフィブロネクチン、ラミニンを骨格として、これにⅢ、Ⅳ、ⅤおよびⅥ型コラーゲンが付随したものであること、それらの中基底膜成分は分化に伴い細胞周囲に移行し、個々の細胞を取り囲むように基底膜を構成することを観察している。分化した脂肪細胞のマトリックスはⅢ型コラーゲンを主体とし、そこにⅤ、Ⅵ、Ⅰ型コラーゲンが加わったもので構築されることを明らかにしている。一方、未分化の状態で維持した場合、コラーゲンの中で発達の良かったものはⅥ型であることを見だし、マトリックスの初期の構築にはⅥ型コラーゲンがフィブロネクチンと共に重要な役割を担うと考察している。

線維芽細胞、脂肪細胞いずれの場合も、初期のマトリックス構築に関与するものはフィブロネクチンであり、そのネットワークがその後のコラーゲンによるネットワーク構築の足場を提供するものと結論している。また、コラーゲンを中心としたマトリックスの形成に伴うフィブロネクチンネットワークの退化はマトリックスが細胞へ働きかけたものと解され、細胞とマトリックスの間には双方向的に影響しあう関係があると考察している。

3. 単層培養した角化細胞は生体内とは異なりⅣ、Ⅶ型コラーゲン、ケラチンおよびトランスグルタミナーゼを同時に合成することを明らかにしている。一方、線維芽細胞を含むコラーゲンゲル上で角化細胞を重層化させた皮膚モデルの培養では生体での角化細胞の機能を反映した結果を得ている。すなわち、基底膜の形成、角化細胞の重層化、トランスグルタミナーゼの発現および核の消失を確認している。また、線維芽細胞のみのゲル内培養では観察されなかった抗ラットⅠ型コラーゲン抗体に対する陽性反応を確認し、角化細胞の存在が線維芽細胞にⅠ型コラーゲンの分泌を促す可能性を指摘している。

以上のように、本研究は皮膚の主要構成細胞と細胞外マトリックスとの双方向的な関係を培養系を用いて明らかにしたものであり、コラーゲンを生体材料として利用する上での貴重な知見を与えるものとして学術上高く評価される。

よって審査員一同は最終試験の結果と合わせ本論文の提出者 久保康明 は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格あるものと認定した。