

学 位 論 文 題 名

Localization of annexin I(lipocortin I,p35)mRNA in normal and diseased human skin by in situ hybridization.

(組織内ハイブリダイゼーションによるヒト正常皮膚および病的皮膚におけるアネキシン I (リポコルチン, p 53) mRNA の局在)

学位論文内容の要旨

アネキシン 1 は、可溶性のカルシウム依存性リン脂質結合蛋白で、様々な組織での存在が示され、現在、少なくとも 20 の類似蛋白が同定され、アネキシファミリーを形成している。発見当初、アネキシン 1 は、グルココルチコステロイドによって誘導され、フォスホオリパーゼ A2 の阻害作用を示したため、ステロイド誘導性の抗炎症作用の発現との関わりについて注目されていたが、最近の研究では、細胞内カルシウム濃度上昇に依存して細胞膜に細胞質側から結合する構造蛋白であることがわかり、細胞外分泌や細胞内取り込みに際しておこる膜融合に際して重要な働きを担っていることがわかってきている。また、有棘細胞癌の株化培養細胞の研究でアネキシン 1 を添加すると角化がおこることが観察されているため、表皮の分化、角化誘導との何らかの関わりがあることが推測されている。

皮膚においてのアネキシン 1 の蛋白は、免疫組織学的に検討され、既に数グループから報告されている(Fava et al., Kitajima et al., Ikai et al., Ma et al., Bastian et al.)。しかし、抗原の認識部位の違いからか、皮膚のどの部位に発現しているかについては、一致した意見が得られていない。in situ hybridization法を用いてアネキシン 1 の蛋白の合成をより反映する mRNA の発現を検討した。

寺岡 宏博士から供与されたアネキシン 1 の cDNA のうち EcoRI-hindIII フラグメント 852 ベースペアを両端に RNA プライマー の T7 と Sp6 をもつプラスミド pSPT 19 に組み込み、RNA ポリメラーゼを用いてジゴキシゲニンで標識した検出用のアンチセンス、およびネガティブコントロールの用のセンスプローブを作成した。生検組織を燐酸緩衝液中性化した 4% パラフォルムアルデヒドで 24 時間固定したのち、3 μ m のパラフィン切片を作成する。脱パラフィン後、100mg/ml のプロテイナーース k と 0.2M 塩酸で処理し、核

酸を露出させる。無水酢酸でアセチル化し、42℃で16時間ハイブリダイゼーションさせる。60℃の50%フォルムアミド、2xSSCで過剰のプローブを洗い、アルカリフォスファターゼ化抗ジゴキシゲニン抗体で免疫学的検出を行い、ニトロブルーテトラゾリウムとx 燐酸でシグナルを可視化する。

正常皮膚ではシグナルは、汗管に一致して検出された。その他の表皮、真皮成分には、シグナルは検出されなかった。乾癬の健常部病変部の境界部では病変部位の顆粒層直下に弱いシグナルが検出された。病変の中央部と周辺部を比較すると境界部により強いシグナルの発現をみた。ダリエ病の病変部位ではラクネー周辺、病的角化を呈する部位に一致してシグナルが検出された。角化型の脂漏性角化症の病変部では角化性のスクアモイドセルにシグナルが検出された。高分化型の有棘細胞癌では腫瘍全体に弱いシグナルがみられた。特に癌真珠近傍では強いシグナルが見られた。基底細胞腫では腫瘍細胞にシグナルは見られなかった。

正常皮膚では、汗管にのみ検出されたことは過去の免疫染色で一致して強い発現が見られており、蛋白量のみならず蛋白合成も活発であることが予想される。正常表皮でのアネキシン1の蛋白は、基底層、および角層付近のどちらでも大量には産生されていないことが予想される。検討した疾患皮膚で、発現がみられたものは、いずれも正常皮膚より角化が亢進した状態であり、これらの疾患の角化部位では正常時に見られない活発なアネキシン1の合成が行われていることが予想される。角化が亢進しているところで、一時的にあるいは、持続的にアネキシン1が動員されることも推測される。

今回の実験により、アネキシン1が表皮の角化においても重要な働きを担っていることが示唆された。病的な角化亢進状態である乾癬、ダリエ病、脂漏性角化症、有棘細胞癌でアネキシン1が強く発現されることは、種々の角化異常症の病因の解明にも役立つと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 大 河 原 章

学 位 論 文 題 名

Localization of annexin I(lipocortin I,p35)mRNA in normal
and diseased human skin by in situ hybridization.

(組織内ハイブリダイゼーションによるヒト正常皮膚および病的皮膚
におけるアネキシン I (リポコルチン, p 53) mRNA の局在)

アネキシンIは、可溶性のカルシウム依存性リン脂質結合蛋白で、様々な組織での存在が示され、現在、少なくとも20の類似蛋白が同定され、アネキシンファミリーを形成している。発見当初、アネキシンIは、グルココルチコイドによって誘導され、フォスホオリパーゼA₂の阻害作用を示したため、ステロイド誘導性の抗炎症作用の発現との関わりについて注目されていたが、最近の研究では、細胞内カルシウム濃度上昇に依存して細胞膜に細胞質側から結合する構造蛋白であることがわかり、細胞外分泌や細胞内取り込みに際しておこる膜融合に際して重要な働きを担っていることが分かってきている。また、有棘細胞癌の株化培養細胞の研究で、アネキシンIを添加すると角化がおこることが観察されているため、表皮の分化、角化誘導との何らかの関わりがあることが推測されている。

皮膚においてのアネキシンIの蛋白は、免疫組織学的に検討され、既に数グループから報告されている。しかし、抗原の認識部位の違いからか、皮膚のどの部位に発現しているかについては、一致した見解が得られていない。そこでin situ hybridization法を用いてアネキシンIの蛋白の合成をより反映するmRNAの発現を検討した。

アネキシンIのcDNAをpSPT19に組み込み、RNAポリメラーゼを用いてジゴキシゲニンで標識したプローブを作成した。生検組織を固定し、3μmのパラフィン切片を作成した。脱パラフィン後、プロテインースkで核酸を露出させ、42℃で16時間ハイブリダイゼーションさせた。アルカリフォスファターゼ化抗ジゴキシゲニン抗体で免疫学的検出を行い、ニトロブルーテトラゾリウムとx 燐酸でシグナルを可視化した。

正常皮膚でのシグナルは、汗管に一致して検出された。その他の表皮、真皮成分に

は、シグナルは検出されなかった。乾癬の健常部・病変部の境界部では病変部位の顆粒層直下に弱いシグナルが検出された。病変の中央部と周辺部を比較すると境界部により強いシグナルの発現をみた。ダリエ病の病変部位ではラクネー周辺、病的角化を呈する部位に一致してシグナルが検出された。角化型の脂漏性角化症の病変部では角化性のスクアモイドセルにシグナルが検出された。高分化型の有棘細胞癌では腫瘍全体に弱いシグナルが検出され、特に癌真珠近傍では強いシグナルが検出された。基底細胞腫では腫瘍細胞にシグナルは検出されなかった。

正常皮膚では、汗管にのみ検出されたことは過去の免疫染色で一致して強い発現が見られており、蛋白量のみならず蛋白合成も活発であることが予想される。正常表皮でのアネキシンIの蛋白は、基底層、および角層付近のどちらでも大量には産生されていないことが予想される。検討した皮膚疾患で、発現がみられたものは、いずれも正常皮膚より角化が亢進した状態であり、これらの疾患の角化部位では正常時に見られない活発なアネキシンIの合成が行われていることが予想される。角化が亢進しているところで、一時的にあるいは、持続的にアネキシンIが動員されることも推測される。

今回の実験により、アネキシンIが正常表皮の分化・角化のみならず、皮膚疾患、特に角化に関わる疾患においても重要な働きを担っていることが示唆された。

公開發表に際し、副査の長嶋教授よりアネキシンIと皮膚疾患の発症要因としての関わりについて、汗腺由来の腫瘍での発現について、遺伝子レベルでの知見について、大河原教授より皮膚における他のアネキシンファミリーとその機能について、フォスホオリパーゼA₂の阻害作用について、汗腺の分泌部での所見について、主査の吉木より角化傾向を持たない腫瘍での発現について、粘膜、食道上皮での発現について、表皮角化細胞以外の細胞での発現および共通の機能について、アネキシンのノックアウトマウスについての質問があった。申請者は最新の情報を混じえ、大概適切な解答をなし得た。

本研究の手法を応用し、さらにアネキシンファミリーに属する相同蛋白についても蛋白およびmRNAの発現を調べることによりまだ明らかにされていないアネキシンファミリーの機能を解明することが期待される。

審査員一同は、これらヒト正常皮膚および病的皮膚におけるアネキシンI mRNAの局在についての先端的研究成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。