

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 機械的伸展刺激が表皮角化細胞に及ぼす変化と
シグナル伝達に関する研究

指導教官 玉置 邦彦 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 矢野 正一郎

皮膚、特に表皮細胞は、常に外界からの物理的、化学的、光学的な刺激にさらされて様々な生物学的反応を呈している。今回著者は表皮細胞に対する物理的な刺激に注目した。表皮は擦過・圧迫といった形で刺激を受けると増殖・肥厚することが経験的に知られており、こうした刺激によって増悪する皮膚疾患も存在する。Tissue expander や創傷治癒にも物理的刺激が関与しているものと思われる。細胞に物理的な刺激を加える研究は血管平滑筋や血管内皮細胞や骨組織などに対して盛んに行われており、いくつかの知見が得られているが、皮膚科領域で表皮角化細胞に物理的刺激を加える実験はほとんど行われておらず、上記で述べた現象を理論的に説明できないのが現状である。そこでこれらの問題を解決することを目的とし、表皮角化細胞に対して機械的伸展刺激を加えることによってどのような変化・反応が生じるかについて詳細に検討を加えた。伸縮可能なシリコン製培養皿に表皮角化細胞を接着・培養させることで細胞に伸展刺激を加えることを可能にした。

まず、表皮内皮膚腫瘍によって圧排・伸展されていると考えられる腫瘍巣周辺部表皮細胞及び基底細胞にケラチン 6 と Ki-67 と PCNA の発現を免疫染色にて確認した。次いで *in vitro* で表皮角化細胞に伸展刺激を加えた結果、BrdU を用いた細胞増殖アッセイにて 24 時間後に伸展刺激による BrdU の取り込み増加を認めた。さらに、

伸展刺激開始から 1 分–5 分のうちに ERK1/2 と Akt のリン酸化が認められた。このリン酸化は伸展開始後 5 分–15 分で最大に達し、30 分以降はほぼ伸展前のレベルに戻っていった。ERK1/2 のリン酸化、Akt のリン酸化ともに MEK inhibitor である U0126 と PI 3-K inhibitor である Wortmannin で阻害された。一方で EGF 刺激による ERK1/2 のリン酸化は Wortmannin で阻害されず、Akt のリン酸化は U0126 で阻害されなかったことから伸展刺激によるシグナル伝達は EGF によるものとは若干異なるものと思われた。また、EGF レセプターのリン酸化を阻害する AG1478 によって ERK1/2, Akt のリン酸化が抑制されたことから、伸展刺激の伝達に EGF レセプターのリン酸化が関与しているものと思われた。更に、カルシウムチャンネル阻害薬 Gadolinium によっても ERK1/2, Akt のリン酸化が抑制されることから、細胞膜上のカルシウムチャンネルも伸展刺激を受容・伝達している可能性がある。更に、伸展刺激 6 時間後から 24 時間後にかけてまで AP-1 による転写活性が上昇していることを、AP-1-ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて確認した。これらの結果は伸展刺激によって表皮角化細胞が増殖促進刺激を受けていることを支持している。さらに、伸展刺激 24 時間後には細胞増殖を示すケラチン 6 の増強、細胞分化を示すケラチン 10 の減弱を認めた。

以上から、機械的伸展刺激を表皮角化細胞に加えることにより細胞の増殖が反応性に促進されることが考えられ、それには EGF レセプターがリン酸化され、カルシウムチャンネルが作動し、ERK1/2 のリン酸化を経て AP-1 が活性化されることやケラチン 6 が発現することを著者は機序として初めて見いだした。また、細胞分化の抑制がケラチン 10 の減弱によって示され、細胞死の抑制のシグナルも作動していることが EGF レセプターのリン酸化→Akt のリン酸化→Akt の活性化によって示されたことも著者が初めて見いだした。これらの結果は皮膚科の臨床領域における腫瘍進展防御のための周辺部表皮細胞増殖、あるいは Tissue expander による皮膚伸張、あるいは創傷治癒における表皮増生、といった現象の有力な理論的裏付けとなると著者は考えており、皮膚に対する伸展刺激という機械的刺激による生物学的変化について多少とも新しい知見が得られたことで、今後のさらなる機序解明、臨床応用に向けての研究の一助となるものと考えている。