

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 藤岡 郁也

タイトジャンクション (TJ : 密着結合) は、細胞間を結合する細胞間接着構造の一つで、隣接する細胞の細胞膜をジッパーのように強固に連続的につなぎ合わせる特徴的な構造を示す。クローディン (CL) は TJ の形成ならびにそのバリア機能に関連する最も重要な TJ 構成タンパク質で、CL ファミリー分子はヒトやマウスの様々な上皮系の組織に発現が確認され、また組織によって異なる発現パターンを示す。TJ の結合強度ならびにバリア機能は発現する CL のサブタイプ、その発現量と比などによって決定され、各組織特有のバリア機能を構築すると考えられている。とくに、外部環境と直接的に接している皮膚におけるバリア機能は生体防御あるいは環境適応と密接に関連する。本論文は犬における皮膚の TJ の構成タンパク質分子である CL について検討したもので、緒論と総括を除いた以下の三章で構成されている。

第一章では、CL 遺伝子の同定とアミノ酸解析ならびにタンパク分子の同定を行っている。すなわち、犬の皮膚 TJ を構成する CL 遺伝子を同定し、CL1、CL2、CL3、CL4、CL8 について、Western Blot で犬の主要臓器における発現を検討した結果、犬の皮膚では CL1、CL4 の発現は認められるものの、CL2、CL3 ならびに CL8 は認められなかった。また、皮膚組織内の局在では、CL1 は、基底層に弱い発現が、有棘層、顆粒層では強い発現が認められ、角化層に発現は認められなかった。CL2 は基底層では有棘層との境界部に斑状に発現が、有棘層、顆粒層では強い発現が認められ、角化層に発現は認められなかった。CL4 は顆粒層のみに発現が認められ、CL8 は基底層、有棘層、顆粒層に発現が認められた。また、CL3 の発現は認められなかった。ヒトの皮膚における発現では、CL1 は基底層、有棘層と顆粒層に、CL4 は顆粒層に、CL7 は基底層、有棘層と顆粒層に発現していると報告されており、動物種によって皮膚における CL の発現パターンが異なっているものと推測された。またアレルギー性皮膚炎の皮膚について検討したところ、基底層ならびに有棘層における CL1 の発現が低下していたが、CL4 の発現には変化は認められなかった。したがって、犬の皮膚においては TJ 構成タンパク質のうち CL1 が重要と考えられた。

第二章では、犬の皮膚バリア機能を評価するため、犬由来株化ケラチノサイトを三次元培養し、*in vitro* モデルとして培養皮膚組織を作製し、TJ 関連タンパク質である CL1、CL2、CL3、CL4、CL8 の局在について検討している。作製した三次元培養皮膚組織の形態は、単層であった CPEK 細胞は培養 8 日目で数層の細胞シートを形成し、14 日目では、基底層、有棘層の形成および 2-3 層の錯角化層の形成が認められた。培養 21 日目ではさらに錯角化層の重層化 (5-7 層) が認められた。また参考にした培養 30 日目では顆粒層にはケラトヒアリン顆粒が、有棘層には有棘細胞が認められ、角化層が厚いものの皮膚上皮組織を構築した。培養皮膚組織における CL 分子の局在では、CL-1 は培養早

期の単層時では非常に弱い発現しか認められなかったが、培養 8 日目の培養皮膚組織においては細胞間に発現が認められ、培養 14 日目、21 日目では基底層に弱い発現が、有棘層、顆粒層で強い発現が認められた。CL2 は培養 8 日目では細胞間に斑状に、培養 14 日有棘層細胞間と顆粒層に、培養 21 日目には顆粒層と顆粒層に強い発現が認められた。CL-3 はいずれの時点でも発現が認められなかった。CL-4 は培養 8 日目では発現は認められなかったが、培養 14 日目、21 日目では顆粒層にのみ発現が認められた。CL8 は培養 8 日目では発現が認められなかったが、培養 14 日目、21 日目では有棘層細胞間に発現が認められた。なお、あわせて検討したオクルディン (Oc) は培養 14 日目、21 日目の顆粒層にのみ発現が認められた。これら CL の局在は、正常犬皮膚組織におけるそれぞれの発現とほぼ一致した。したがって、CPEK 細胞を分化させ作製した皮膚培養組織は、TJ を介した皮膚バリア機能の評価に適しており、*in vitro* モデルとして有用であると考えられた。

第三章では、CL1 ノックダウンの培養皮膚組織におけるバリア機能を検討している。すなわち、CL1 ノックダウン培養皮膚 (miR-CL1) における CL1 の発現を Western Blot で検討した結果、培養 8 日目、14 日目、21 日目のいずれの時点においても対照 (ベクターのみを導入した CPEK 細胞による培養皮膚 : miR-cont) に比較して、発現が低下していた。miR-CL1 培養皮膚の CL1 発現量を miR-cont 培養皮膚の CL1 の発現量との比で表すと、培養 8 日目は 0.35、培養 14 日目は 0.19、培養 21 日目は 0.10 と、培養日数が増すとともに減少し、RNA 干渉により、CL1 の発現量が抑制できたと考えられた。一方、miR-CL1 培養皮膚における CL の局在では、CL1 は培養 8 日目には細胞間に、培養 14 日目、21 日目では全層 (基底層、有棘層、顆粒層) に発現が認められたが、その発現は miR-cont 培養皮膚のそれと比較して弱いもので、とくに有棘層で著しかった。CL4 は培養 8 日目ではいずれの培養皮膚にも発現が認められなかったが、培養 14 日目、21 日目には基底層、有棘層、顆粒層の全層に発現が認められ、miR-cont 培養皮膚ならびに健康犬皮膚では顆粒層に限定して発現するのに対し、異なった局在を示した。また、Oc は培養 21 日目の miR-cont 培養皮膚ならびに健康犬皮膚では顆粒層に局限して発現するのに対し、miR-CL 培養皮膚では全層に発現していた。また、miR-CL 培養皮膚の皮膚バリア機能はカルシウムイオンの透過性では細胞内から細胞外への透過性が低下する傾向が、低分子物質では細胞外から細胞内への透過性の増加する傾向が、経上皮電気抵抗 (TER) ではやや低下する傾向が窺われたが、いずれも有意なものでは無かった。したがって、犬ケラチノサイトを用いて CL1 ノックダウン培養皮膚を作製することが出来、またバリア機能の評価することが可能であった。また、CL 分子の局在、Oc の局在の変化から考えると、CL1 は皮膚バリア機能に関連すると考えられた。

このように、本論文はこれまで明らかでなかった皮膚 TJ を構成する CL の局在を明らかにし、また *in vitro* モデルとして有用な犬ケラチノサイトを用いた培養皮膚組織を作製するとともに CL1 ノックダウン培養皮膚の検討で犬の皮膚バリア機能には CL1 が関与することを明らかにしたものである。その内容は、獣医学の学術上貢献するものであり、よって、審査委員一同は、本論文が博士 (獣医学) の学位論文として価値あるものと認めた。