

論文の内容の要旨

論文提出者氏名	高沢 裕子
論文審査担当者	主 査 駒津 光久 副 査 佐々木 克典 ・ 伊藤 研一
論文題目 Notch down-regulation in regenerated epidermis contributes to enhanced expression of interleukin-36 α and suppression of keratinocyte differentiation during wound healing (創傷治癒過程において、再生表皮での Notch の低下は IL-36 α の発現の増加と表皮細胞の分化抑制に寄与する)	
(論文の内容の要旨) <p>【背景】 Notch シグナルは、多くの多細胞生物で広く保存されたシグナル伝達系であり、細胞の運命決定、増殖、分化、細胞の生死などの調節を行っている。Notch は細胞表面に存在する一回膜貫通型のレセプタータンパク質であり、哺乳類では Notch 1 から 4 がある。リガンドも細胞表面に存在するタンパク質で、Jagged 1、2 と Delta-like 1、3、4 の 5 種類が知られている。Notch にリガンドが結合すると細胞内ドメインが切り離されて核内に移行し、他の核内分子と複合体を形成して転写因子として働く。Notch は隣接する細胞間での情報伝達を担っている。表皮細胞には Notch 1、2、Jagged 1、2 が発現しており、Notch は表皮細胞の増殖や分化の制御に深く関与していることが明らかになっているが、創傷治癒過程の皮膚における Notch の役割については知られていない。【目的】 創傷治癒過程における再生表皮の Notch の役割を明らかにする。【方法】 生後 8-10 週 ICR マウスの背部を電動シェーバーで剃毛した後 5mm パンチで皮膚潰瘍を作り、その 3-7 日後に潰瘍周囲の皮膚とともに採取し、免疫染色を行った。生後一日目の ICR マウスから表皮細胞の初代培養を行い、Notch シグナルのインヒビターである DAPT や siRNA を用いて Notch を抑制したり、アデノウイルスベクターを用いて Notch を過剰発現させ、mRNA、タンパクを回収し解析した。生後 8-10 週 ICR マウス背部に DAPT を塗布し、採取して免疫染色を行った。【結果】 免疫染色にて再生表皮の Notch1、Notch2 に加え、Notch の標的遺伝子である Hes1 の発現も低下しており、再生表皮では Notch シグナルが低下していることがわかった。再生表皮での Notch の発現低下の意義について、炎症、分化、増殖の 3 つの観点から検証した。＜炎症について＞創傷部位では表皮欠損がおこり組織が外界に直接さらされるため、生体防御を行う必要がある。そのため表皮から産生される炎症性サイトカインに変化が生じる可能性を考えた。初代培養細胞に DAPT を添加し IL-1 ファミリーサイトカインの mRNA 発現を調べたところ、IL-36 α のみが上昇した。タンパクレベルでも IL-36 α の発現が高まっており、IL-36 α に着目することとした。siRNA にて Notch1、Notch2 のそれぞれをノックダウンさせるといずれも IL-36 α の mRNA とタンパク発現が高まった。逆にアデノウイルスベクターを用いて Notch を過剰発現させると IL-36 α の発現は低下した。また免疫染色にて再生表皮の IL-36 α 発現は上昇していることがわかった。次に Notch と IL-36 α の因果関係を調べるため、マウスの背部皮膚に DAPT 塗布し、免疫染色を行った。DAPT を塗布した皮膚ではコントロールに比べ IL-36 α の発現は高まっていた。この結果から再生表皮では Notch が低下することにより IL-36 α の発現が高まると考えられた。＜増殖について＞初代培養細胞にアデノウイルスベクターを用いて Notch を過剰発現させると Brd-U 取り込みの陽性率は低下したが、DAPT 添加にて Notch シグナルを抑制しても陽性率に有意な変化を認めなかった。また再生表皮の Ki67 発現は正常表皮に比較し高まっていなかったことから、再生表皮における Notch の発現低下は増殖の制御には関与していないと考えられた。＜分化について＞初代培養細胞に DAPT を添加し Notch シグナルを抑制すると keratin1(K1)、keratin10(K10) の mRNA、タンパク発現が低下した。次に siRNA を用いて Notch1、Notch2 をノックダウンさせると K1、K10 の発現が低下した。また免疫染色にて再生表皮の K1、K10 発現は低下していることがわかった。DAPT を塗布したマウスの皮膚では K10 については明らかな低下はみられなかったが K1 の発現は低下していた。以上の結果より再生表皮では Notch の低下により K1、K10 の発現が低下すると考えられた。【結論】 創傷治癒過程における再生表皮では Notch シグナルが低下しており、それにより IL-36 α の発現が高まり、K1、K10 の発現が低下すると考えられた。【考察】 IL-36 α は外界にさらされた組織が外的病原体から身を守る生体防御に役立っていると考えられ、K1、K10 の減少は細胞強度を低下させるが細胞の形態を変化させやすくなり、組織の再構築に有利となっているのではないかと考えられた。</p>	