



Title	Regulation of keratin 9 in non-palmoplantar keratinocytes by palmoplantar fibroblasts through epithelial-mesenchymal interactions
Author(s)	山口, 裕史
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41675
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	やま ぐち ゆう じ 山 口 裕 史
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 5 0 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平成11年3月25日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系専攻
学 位 論 文 名	Regulation of keratin 9 in non-palmoplantar keratinocytes by palmoplantar fibroblasts through epithelial-mesenchymal inter- actions. (上皮間葉系相互作用を介した掌蹠線維芽細胞による掌蹠外表皮細胞 におけるケラチン9の発現誘導)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 吉川 邦彦 (副査) 教 授 竹田 潤二 教 授 不二門 尚

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

掌蹠皮膚は掌蹠外表皮と比べて、毛包構造がない、厚い質感を呈する、独特の汗腺構造及び分泌メカニズムを有する、色素沈着を認めない、という外見上の特徴を示す。組織学的にも、生理的に角質増殖及び表皮肥厚を示す、表皮突起が延長している、表皮幹細胞が表皮突起の先端に位置する、という特徴を掌蹠皮膚は有する。更に掌蹠表皮では、マルピギー層全体にケラチン9と呼ばれる酸性タイプ1ケラチンが存在し、中・塩基性タイプ2ケラチンに属するケラチン1と2量体を作っている。掌蹠外では、ケラチン9は表皮内汗管に僅かに存在するのみである。ケラチン9は掌蹠表皮細胞の分化マーカーと考えられるが、その発現は内因的に制御されると考えられている。上皮間葉系相互作用を介して、掌蹠線維芽細胞が掌蹠外表皮細胞にケラチン9を誘導できるか及び掌蹠様皮膚を作成する能力があるかどうか調べた。

【方法ならびに成績】

まず最初に、in vitro でも、in vivo と同様に、掌蹠表皮細胞では、ケラチン9特異的 mRNA を発現し、掌蹠外表皮細胞では、発現しないかを調べた。表皮細胞の培養は MCDB153 無血清培地を用いた explant 法にて施行した。掌蹠由来表皮細胞は、RT-PCR 法にて調べた 7 例全てで、継代を 2 代から 6 代まで重ねても、ケラチン9 mRNA を発現し続けたが、掌蹠外表皮細胞は、調べた 17 例中 16 例で、ケラチン9 mRNA の発現を認めなかった。1 例はケラチン9 mRNA を発現したが、表皮内汗管由来表皮細胞が、PCR 増幅されたものとする。

次に、4 種の共培養系を利用し、掌蹠線維芽細胞が掌蹠外表皮細胞にケラチン9を誘導できるかを RT-PCR 法にて調べた。ここで挙げる 4 種の系とは、線維芽細胞と表皮細胞とを直接混合した (Mixed) 系、外プレートと内プレートと別々に培養した (Outer dish) 系、膜の上下に培養した (Membrane) 系、及びコラーゲンゲル上に内プレートを乗せた (Collagen gel) 系であり、Mixed 系以外では、両群細胞は直接接触しないと考えられる。両群細胞間距離が極めて短い培養系において、掌蹠線維芽細胞は掌蹠外表皮細胞にケラチン9 mRNA を誘導した (Mixed, Membrane, Collagen gel)。Outer dish 系では僅かの mRNA 発現を認めるのみであった。共培養に用いられた掌蹠外表皮細胞と同一細胞を単独培養したものは、ケラチン9 mRNA を発現しなかった。次に、掌蹠線維芽細胞はどの程度の接触時間でケラチン9 mRNA を掌蹠外表皮細胞に誘導できるかを Collagen gel 系の共培養で調べたところ、30分

でケラチン9 mRNA が誘導され、2 時間、6 時間、1 日と時間経過に伴い発現が増強し、3 日後も誘導し続けた。

次に、ケラチン9 の誘導能に関して、掌蹠の真皮乳頭層と網状層との不均一性 (heterogeneity) が認められるかを、各々の層由来線維芽細胞を実体顕微鏡下にて分離培養し、Collagen gel 系を用いて掌蹠外表皮細胞と共培養することで調べた。掌蹠真皮乳頭層由来線維芽細胞は、調べた7 例全てでケラチン9 mRNA を掌蹠外表皮細胞に誘導したが、網状層由来線維芽細胞は、調べた8 例中3 例で誘導を認めず、残り5 例には mRNA 強度が薄い例も存在した。掌蹠外では真皮乳頭層由来線維芽細胞でも、ケラチン9 mRNA の誘導を認めなかった。ケラチン9 mRNA の PCR 産物を DNA シークエンサーにて確認したところ、Langbein らのグループの示す塩基配列と rod 領域では違いはなかったが、V1 ドメインにて2 塩基対の違いがあった。ケラチンは、head, rod, tail より構成されているが、V1 ドメインは head に位置し、近年報告されている掌蹠角化症における点突然変異が rod に存在することにより、更に追跡が必要ではあるが、2 塩基対の相違はケラチン9 の polymorphism であると考えられる。

次に、3 次元培養を様々の組み合わせで施行し、抗ケラチン9 抗体を用いて免疫組織染色した。体幹由来線維芽細胞と共培養した体幹由来表皮細胞には、ケラチン9 陽性細胞を認めなかったが、足底由来線維芽細胞と共培養した体幹由来表皮細胞には陽性細胞を認めた。更に、足底由来線維芽細胞と体幹由来表皮細胞との3 次元培養を SCID マウスに植皮し、組織を調べた。HLA Class I 抗体陽性であるヒト由来の移植片は、HE 染色にて角質増殖及び表皮肥厚を認め、免疫組織染色にてケラチン9 陽性細胞を認めた。この結果は、内因的制御を示した Limat らのグループが報告した手掌由来線維芽細胞及び表皮細胞の共培養の結果と同一であった。

最後に臨床応用が可能か否かを調べた。足底の脂肪層が露出した皮膚欠損創に対し、ドナーとして腹部分層皮膚を採取し、ディスパーゼを使用して表皮成分のみを植皮した。1 週後の生着は良好で、時間経過につれ、徐々に掌蹠タイプの硬い質感を呈する皮膚へと変化した。HE 染色にて、掌蹠表皮に類似した角質増殖及び表皮肥厚を認め、免疫組織染色にて、ケラチン9 陽性細胞は3 週後でまばらに、更に5 週後にはマルピギー層全体に本来の掌蹠と同程度に認められた。

【総括】

表皮細胞におけるケラチン9 の発現は、部位特異的な内因性コントロールのみではなく、特に真皮乳頭層由来の掌蹠線維芽細胞によっても外因性制御を受けていることが明らかとなった。掌蹠線維芽細胞にて掌蹠様培養皮膚の作成が可能であることが証明されたが、真皮成分を除いた掌蹠外表皮の掌蹠への植皮は、熱傷、外傷、及び肢端悪性黒色腫切除後の掌蹠皮膚欠損創に対する新たな治療法となることが示唆された。今後人工真皮等を用いた臨床応用を進めながら、掌蹠線維芽細胞由来ケラチン9 誘導物質をプロモーター解析しつつ、同定していきたい。

論文審査の結果の要旨

本論文は、従来内因的制御を受けるとされていた掌蹠に特有のケラチンが、掌蹠線維芽細胞による外因的制御を受けることを証明した最初の論文である。上皮間葉系相互作用については、従来より胎生期における角膜、粘膜、毛包、及び歯牙組織の形成について研究されているが、成体における相互作用については毛包の誘導以外には報告が少ない。本論文は、成体ヒト皮膚において掌蹠及び掌蹠外に着目し、部位特異的ケラチンの制御に関した表皮真皮相互作用について述べている。更に、外傷、熱傷、及び肢端悪性黒色腫切除後の掌蹠皮膚欠損創に対する治療は、従来足底非荷重部或いは腫部よりの植皮及び皮弁にて施行されていたが、ドナーが制限されているという問題点があった。本論文で施行された掌蹠外皮膚より表皮成分のみを植皮する方法は、ドナーの制限無く、機械的刺激に強い掌蹠型皮膚を作成できる新しい術式であり、今後の臨床応用が期待される。以上より本論文は、学位の授与に値すると考えられる。