

Title	Effect of 12-0-tetradecanoyl-phorbol ester and incisional wounding on neuropsin mRNA and its protein expression in murine skin
Author(s)	北吉, 光
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/42806">https://hdl.handle.net/11094/42806</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	北 吉 光 <small>きた よし ひかる</small>
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 5 6 8 5 号
学位授与年月日	平成12年 8 月 7 日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Effect of 12-0-tetradecanoyl-phorbol ester and incisional wounding on neuropsin mRNA and its protein expression in murine skin (12-0-tetradecanoyl-phorbol ester 塗布及び切創によるマウス皮膚ニューロプシン発現増強)
論文審査委員	(主査) 教授 細川 互  (副査) 教授 遠山 正彌 教授 吉川 邦彦

#### 論 文 内 容 の 要 旨

皮膚プロテアーゼは細胞外マトリックスの分解と再構築を通して、発達、炎症、創傷治癒、角質化など皮膚の重要な機能に関係している。創傷治癒過程においては創を一時的に閉鎖する痂皮の融解と細胞外マトリックスの分解により、創縁への表皮細胞の遊走に関係し、さらには血管新生にも関係する。同時に、創近傍の基底層では盛んな細胞分裂が行われるとともに、その上層では活発な細胞分化と表層への細胞遊走が認められ、これらの現象にも皮膚プロテアーゼの関与が考えられる。ニューロプシンは1995年 Chen らによってクローニングされたセリンプロテアーゼである。Inoue らによって行われた皮膚組織における免疫組織化学によるその分布の研究によりニューロプシン蛋白質は表皮有棘層、顆粒層に最も豊富に見いだされた。本研究では皮膚ニューロプシンの機能を探る目的でニューロプシンが①細胞遊走、②細胞分化、あるいは③細胞分裂のいずれに関わるかをホルボールエステルによる化学的刺激および外傷による機械的刺激の2つの皮膚病態モデルを作成し、in situ ハイブリダイゼーション法および免疫組織化学法を用いて検討した。

##### (方法並びに成績)

化学的刺激： アセトン100  $\mu$ l に溶解した10nmolTPA (12-0-tetradecanoyl-phorbol ester) を、ヌードマウスの背部に塗布した。対照として同量のアセトンのみを塗布した。施術後、1 および 3 日目にマウスを屠殺し背部皮膚を採取、厚さ20  $\mu$ m の凍結切片を作製し、35S でラベルした cRNA で、in situ ハイブリダイゼーション法を行った。

外傷： 成熟した18ddY マウスの足底に5 mm 長の皮膚全層にわたる傷を付け、そのままの状態に創傷治癒させた。1、6、36時間後また3、8、16日後に屠殺し、Non-R1 プローブを用いた、in situ ハイブリダイゼーション法を行った。さらに、ニューロプシンモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学法を行った。

また、上記 in situ ハイブリダイゼーション法による結果をさらに半定量的に検証するため成熟マウスの背部皮膚に上記と同様の創を作成したのち、1、2、3、4 日後周囲の1.5mm $\times$ 20mm $\times$ 0.8mmの皮膚を採取し、ノザンプロット法を行った。

##### 結果

ホルボールエステルの単回塗布により、表皮の過形成が観察された。同時に、顆粒層及び有棘層において急激なニューロプシン mRNA の増加が in situ ハイブリダイゼーション法により観察された。また同様に創形成により顆粒層及び有棘層においてニューロプシン mRNA の増加が観察され、この増加は約2週間続いた。しかし、活発に分裂して

いる基底細胞には遺伝子発現が認められず、その分布様式からも細胞分裂に関わるとは考えがたい。また、ノザンプロットによってもニューロブシン mRNA は、受傷後 3～4 日と比較的遅く増加する。従って、むしろ創傷治癒過程に重要であることが示された。一方、創縁へ遊走しつつある epithelial tongue には遺伝子及びその蛋白質の発現がなかったことから、ニューロブシンは細胞遊走には関係しないと考えられた。一方、過形成および角化亢進が見られる薬物塗布領域、あるいは創近傍の領域ではニューロブシン mRNA の増加が限局して観察され、これらのことからニューロブシンは最終分化に深く関わるということが推察された。

#### 総括

炎症あるいは創傷治癒過程においては上皮細胞の様々な防御反応が身体の保護のため重要な意味を持つ。創形成後の再上皮化過程においては表皮細胞の遊走が活発となり、この過程においては urokinase 型プラスミノーゲンアクチベータが epithelial tongue に発現し、フィブリンなど細胞外蛋白質を分解することにより細胞の遊走を行わせることが知られる。今回の私の成績から、ニューロブシンは創傷治癒過程の比較的遅い時期に発現し、角化亢進に伴うこと、また、Inoue らの成績 (J. Invest. Dermatol, 110: 923, 1998) から発生の角化時期に同調することから、ニューロブシンは終末分化に関係するものと見られる。ニューロブシンの基質はまだ不明であるが、このプロテアーゼが細胞外に分泌されること、角化亢進した有棘層、顆粒層の細胞間に網目状に免疫反応が強く見られることから、デスモゾーム構成蛋白質を分解することにより、細胞間結合の離反せしむことから、最終分化を誘導するとともに、角層剥離などにも関与するものと推察される。

#### 論文審査の結果の要旨

ニューロブシンは、マウスにおいて海馬、消化管、子宮などに分布するが、皮膚にも高濃度に発現するセリンプロテアーゼである。皮膚におけるセリンプロテアーゼの中でその働きが知られているものは多くなくこのニューロブシンの役割もまた不明であった。この研究は皮膚においてニューロブシンが表皮の細胞遊走・増殖・分化のいずれかに関与しているのではないかという仮説のもとに行われた。実験は、マウスの皮膚に炎症または切創という刺激を与えてその際のニューロブシン遺伝子及び蛋白の発現を in situ ハイブリダイゼーション法や免疫組織化学法で調べるという手法で行われた。その結果ニューロブシンは細胞増殖や遊走ではなく表皮の分化に関与することが示唆された。この研究は、皮膚における各種の蛋白の役割を解明していく上でも、また創傷治癒の機序を解明する上でも、一つの重要な研究として十分に学位に値するものと認められる。