

学 位 論 文 要 旨

I型およびIV型コラーゲン再構成会合体上での ヒト表皮角化細胞の接着様式と細胞挙動 Human keratinocyte adhesion styles and behaviors on the reconstituted type I and type IV collagen gels

藤崎ひとみ

Hitomi Fujisaki

生体で皮膚はI型コラーゲン線維束からなる真皮層、IV型コラーゲンやラミニン等で形成される基底膜、さらに体表側に分化状態の異なる表皮角化細胞の稠密な細胞層で構成されている。皮膚でコラーゲンは主に会合体を形成している。基底層の表皮角化細胞は基底膜に接しているがその接着装置はヘミデスモソームと呼ばれる特徴的な構造を形成している。真皮層と基底膜もまた、アンカリングフィブリルと呼ばれるVII型コラーゲンで構成される構造で繋ぎ止められており、表皮角化細胞と複数の細胞外マトリクスが協調して皮膚組織の形態、機能維持に関与している。正常組織では表皮角化細胞はI型コラーゲン線維に直接接着することはないが、表皮が破損した創傷治癒時には周囲の表皮角化細胞は真皮のI型コラーゲン線維上を遊走し、遊走した表皮角化細胞と真皮細胞とで、基底膜を再構築する。基底膜を含む皮膚構造の再構築に関する多くの研究は、I型コラーゲン線維ゲルを用いた実験系を用いており、実際に人工皮膚が実用に供されている。しかし基底膜構造構築のためには線維芽細胞と表皮角化細胞の共培養等複雑な過程が必要で、個々の要素の関与は明らかになっていない。通常培養皿上での培養では基底膜構造は構築されず、I型コラーゲン線維ゲルの役割が大きいことが推測できるが、構造形成に果たす詳細な機序は不明である。そこで本研究は、表皮角化細胞が基底膜構造を構築する際、コラーゲン会合体が果たす役割を明らかにすることを目的とし、培養系でI型あるいはIV型コラーゲン会合体上に、表皮角化細胞が形成する接着装置及び細胞挙動の解析を行った。

表皮角化細胞をI型コラーゲン線維ゲル上で培養し、細胞挙動を観察した。I型コラーゲン分子上での表皮角化細胞の培養法および詳細な接着様式の解析は既に報告されており、その研究に基づき細胞挙動を比較した。通常増殖用培地（含有カルシウム濃度 30

μM) を用いて I 型コラーゲン線維ゲル上で培養したところ、表皮角化細胞ははじめコラーゲン受容体であるインテグリン $\alpha 2\beta 1$ を介してコラーゲンに接着し伸展するが、やがて接着は失われアポトーシスが誘導された。一方、I 型コラーゲン分子上で培養した表皮角化細胞は既報通りに、はじめはインテグリン $\alpha 2\beta 1$ を介してコラーゲンに接着、伸展しやがて自ら産生したラミニン 5 にインテグリン $\alpha 3\beta 1$ を介して接着するようになり、伸展形態を保ったまま敷石状に増殖した。この 2 つの結果を比較し、インテグリンの切り替えが線維ゲル上では阻害されていることから、原因は I 型コラーゲン線維へのラミニン 5 の沈着不全によるものと仮定し、実験的に I 型コラーゲン線維とラミニン 5 が結合していないことを証明した。以上の結果により I 型コラーゲン線維とラミニン 5 の相互作用というタンパク質間相互作用が、基底膜構造構築の前段階の細胞接着に重要であることを明らかにした。

線維芽細胞を内包したコラーゲン線維ゲル上で分化誘導条件で培養した表皮角化細胞は、増殖、重層し、線維ゲルとの間に基底膜様の構造が形成される例が知られている。一方、線維芽細胞を除いた増殖条件で培養するとアポトーシスが誘導されることがわかったので、次にコラーゲン線維と表皮角化細胞の接着を維持しアポトーシスを回避する培養条件を探索した。表皮角化細胞の生存シグナルを促進する高カルシウム (1.8 mM) 濃度に調製した培地を用いて、I 型コラーゲン線維ゲル上で培養したところ、アポトーシス誘導は阻害されることがわかった。このとき細胞間接着は強くなり細胞塊が形成され、細胞塊周囲にラミニン 5 沈着とインテグリン $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ を含む接着班形成が観察された。生存シグナル Erk1/2 が活性化し、一方 Akt 活性化は抑制されていた。

表皮角化細胞は生体では基底膜に接着しているので、基底膜構成成分 IV 型コラーゲン会合体 (網目ゲル) を用いる培養系は、IV 型コラーゲン分子や I 型コラーゲン会合体を用いる系よりも生体条件に近いことが期待できる。そこで IV 型コラーゲン網目ゲル上で表皮角化細胞を増殖条件で培養し、細胞挙動を観察した。IV 型コラーゲン分子上で培養した細胞は I 型コラーゲン分子と同様、未分化を保ち増殖を続けた。その一方、IV 型コラーゲン網目ゲル上では、IV 型コラーゲン分子上あるいは I 型コラーゲン線維ゲル上培養のどちらとも異なり、細胞は増殖せず、しばらくの間生存した。細胞は自律的に重層化した後、細胞塊上部では、分化が誘導された後にアポトーシスがゆるやかに誘導された。下部の細胞は細胞周囲に接着班が形成され、インテグリン $\alpha 2$ と $\alpha 3$ の集積、ラミニン 5 の沈着が観察され、未分化状態で生存した。生存シグナル Akt の活性化は抑制され、Erk1/2 は活性化した。

本研究ではタンパク質相互作用の観点から、コラーゲン会合体がヒト表皮角化細胞に与える影響の解析を試みた。ヒト表皮角化細胞が形成する接着様式や分化誘導は、コラーゲンの会合体形成の有無、及びコラーゲンの型に依存して異なり、細胞の生死をも左右する重大な影響をおよぼしていることが明らかになった。会合体を形成したコラーゲンはより生体に近い形であると考えうるため、本研究の成果は表皮角化細胞のための新規な培養基材開発などへの活用が期待される。