

氏名・(本籍)	野口 奈津子 (東京都)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博乙第 608 号
学位授与の日付	令和 1 年 9 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Atypical Protein Kinase C Isoforms Differentially Regulate Directional Keratinocyte Migration During Wound Healing (創傷治癒における aPKC 分子種の機能的差異の解明)

論文審査委員	(主査) 八月朔日 泰和 教授
	(副査) 高橋 直人 教授 久場 敬司 教授

学位論文内容要旨

論文題目

Atypical Protein Kinase C Isoforms Differentially Regulate Directional Keratinocyte Migration During Wound Healing

(創傷治癒における aPKC 分子種の機能的差異の解明)

申請者氏名 野口奈津子

研究目的

細胞内の重要なシグナル伝達分子であるプロテインキナーゼ C (Protein kinase C, PKC) は、現在 10 種類の分子種が存在し、構造と生化学的特徴から conventional PKC (cPKC)、novel PKC (nPKC)、atypical PKC (aPKC) の 3 つに分けられる。このうち aPKC は Par3, Par6 と複合体を形成し、哺乳類の単層上皮ではタイトジャンクションに局在して頂端基底極性 (apico-basal cell polarity) を制御している。aPKC には aPKC λ (ラムダ) と aPKC ζ (ゼータ) の 2 つがあるが、両者の機能的な違いについてはほとんどわかっていない。本研究では両者のノックアウト (knock out, KO) マウスを作製し、創傷治癒時における aPKC ζ と aPKC λ の機能的差異を解析した。

研究方法

aPKC λ を表皮特異的に欠損させた conditional KO (cKO) マウスでは、毛周期が異常をきたし、毛包幹細胞が週齢とともに徐々に枯渇して進行性の脱毛が見られることをすでに報告した。そこでまず、aPKC ζ KO マウスでも毛周期、毛包幹細胞マーカーの発現、毛包幹細胞数に異常があるのか、免疫組織染色やフローサイトメトリーで検討した。

次に、それぞれの KO マウスの背部に皮膚欠損創を作って創傷治癒過程を観察した。また、表皮角化細胞を初代培養して scratch wound assay を行い、細胞の伸展や遊走の異常の有無について免疫細胞染色、ウエスタンブロット等で検討した。

研究成績

- (1) aPKC ζ KO マウスでは体毛の異常は見られない。
aPKC ζ KO マウスは正常に生まれて成長の遅れはなく、毛周期の異常や脱毛所見もなかった。毛包幹細胞マーカーの発現・局在は正常で、数の減少もなかった。
- (2) aPKC λ cKO マウスでは創傷治癒が遅延する。
aPKC λ cKO マウスでは、肉眼的に痂皮の脱落と再上皮化が遅れ、組織学的にも創傷部への表皮角化細胞の移動が遅延していた。また、治癒後の痂痕面積が大きく、痂痕収縮も阻害されていた。aPKC ζ KO マウスではコントロールと比べ治癒遅延はなく、痂痕面積も変わらなかった。
- (3) aPKC λ 欠損角化細胞では細胞移動が異常を示す。
scratch wound assay では、aPKC ζ 欠損角化細胞の創傷後 48 時間の傷の埋まり具合は、コントロール細胞と有意差がなかった。一方、aPKC λ 欠損角化細胞では、創傷後 48 時間経っても細胞の移動が少なく傷はほとんど埋まらなかった。
- (4) aPKC λ 欠損角化細胞では、創傷治癒時の細胞の伸展が阻害される。
aPKC λ 欠損角化細胞では、 β tubulin (微小管) の伸長が障害されるために、細胞は十分に伸展せず、細胞面積がコントロールに比べ小さくなっていた。
- (5) aPKC λ 欠損角化細胞では、細胞突起の形成方向がランダム化する。
創傷治癒時、細胞は傷の方向に向かって細胞突起を伸ばして移動する。この時、ゴルジ体は傷の方向に再配列する。aPKC ζ 欠損角化細胞とコントロール細胞では、細胞突起は傷の方向に向かって形成されていたが、aPKC λ 欠損角化細胞では、細胞突起は傷の方向と関係なくランダムに形成されていた。さらに、aPKC ζ 欠損角化細胞とコントロール細胞では、約 45% の細胞でゴルジ体の再配列がみられたのに対し、aPKC λ 欠損角化細胞では、その割合は約 12% にまで減少していた。
- (6) aPKC λ 欠損角化細胞では Par6 β が不安定化する。
aPKC λ 欠損角化細胞では、aPKC と複合体を形成している Par6 β の発現量が蛋白レベルで低下していた。一方、Par3 の発現量に変化はなかった。

結論

aPKC λ は表皮細胞では、Par6 β の安定性を制御することによって細胞極性を維持し、創傷治癒時の細胞の伸展、細胞突起の伸長の方向を制御していることが明らかになった。

以上から、創傷治癒時における表皮角化細胞の遊走において、aPKC ζ ではなく、aPKC λ が主要な役割を担っており、両者に機能的差異があることが初めて明らかになった。

学位論文審査結果の要旨

主 査： 八月朔日 泰和

申請者： 野口 奈津子

論文題名：

Atypical Protein Kinase C Isoforms Differentially Regulate Directional Keratinocyte Migration During Wound Healing

(創傷治癒におけるaPKC分子種の機能的差異の解明)

要旨

本研究は、論文内容要旨に示すように、atypical protein kinase C (aPKC) λ (ラムダ) と aPKC ζ (ゼータ) のノックアウト (knock out, KO) マウスを作製し、創傷治癒における aPKC ζ と aPKC λ の機能的差異を解析したものである。創傷治癒では、aPKC ζ ではなく、aPKC λ が主要な役割を担っており、両者に機能的差異があることを初めて明らかにした。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

1) 斬新さ

2種類ある aPKC (aPKC λ と aPKC ζ) は、哺乳類の単層上皮に局在して頂端基底極性 (apico-basal cell polarity) を制御しているが、両者の機能的な違いについてはほとんど解明されていなかった。著者らは KO マウスを用い、aPKC λ cKO マウスでは創傷治癒が遅延することを示した。一方、aPKC ζ KO マウスではコントロールと比べ治癒遅延はなかった。本研究の斬新な点は、創傷治癒では aPKC ζ ではなく aPKC λ が主要な役割を担っており、両者に機能的差異があることを初めて明らかにしたことにあ

る。

2) 重要性

本研究で著者らは、aPKC λ cKO マウスの培養角化細胞を使って scratch wound assay を行い、創傷治癒時に β -tubulin (微小管) の伸長が障害され、細胞の移動と細胞の伸長が阻害されることを示した。さらに、aPKC λ は表皮細胞において Par6 β を安定化させることによって細胞極性を維持し、創傷治癒時の細胞の伸展、細胞突起の伸長の方向を制御していることを明らかにした。このことは aPKC λ の活性を調整することにより創傷治癒がコントロールされ、瘢痕拘縮を改善できる可能性を示唆したものであり、今後の臨床応用の点において高く評価できる。

3) 実験方法の正確性

創傷治癒過程の観察、培養細胞での scratch wound assay、細胞の伸展や遊走の異常の有無についての免疫細胞染色は、複数の個体で実験を繰り返して再現性をみている。また、各々のデータは統計学的検討を加えており、客観的な評価法で正確性があると考えられる。

4) 表現の明瞭さ

本研究は英文で Journal of Dermatological science に受理されており、研究目的、方法、結果、考察が明瞭に記載されている。

以上より、本論文は学位を授与するのに十分値する研究と判定された。