

論文内容の要旨

論文提出者	(氏名) 尾崎 茜
論文題目	Serum affects keratinization and tight junctions in three-dimensional cultures of the mouse keratinocyte cell line COCA through retinoic acid receptor-mediated signaling
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>血清中のビタミンAは、ケラチノサイト(KC)の増殖、分化および角化に影響する。マウスでは、口腔、食道、および前胃の重層扁平上皮は角化しているが、ヒトではこれらの上皮は角化していない。ヒトとマウスの角化状態の違いは、血清成分に対する KC の感受性の違いに起因する可能性がある。そこで、我々は、マウス表皮由来の KC (COCA 細胞)の三次元(3D)培養における血清の影響について、形態、分化マーカーおよびタイト結合蛋白質の発現および局在、細胞間透過性(TER)について調べた。</p> <p>マウスの背部皮膚由来の表皮 KC 細胞株 COCA を低 Ca 培地 CnT-PR で培養し、インサートの膜上に直接播種し、コンフルエントを確認後、3D 培地 (CnT-Prime に Ca、アスコルビン酸誘導体、KC 増殖因子を添加したもの) にて一晚液浸し、気液界面培養を開始した。2 週間後に TER を測定後、1% パラホルムアルデヒドで固定し、30%スクロース溶液に浸漬後 OCT に包埋し、凍結切片を作製した。形態は HE 染色、蛋白の局在は蛍光免疫染色、蛋白の発現量はウェスタンブロッティング(WB)にて解析した。</p> <p>COCA 細胞は無血清培地で 1 週間 3D 培養すると角化重層扁平上皮を形成し、3 週間では角質層の剥離がみられた。0.1%以上の低 Ca 血清(chFBS)の添加で角化が阻害されて非角化重層上皮が形成された。同時に、角化マーカーであるロリクリンの発現が消失し、非角化マーカーであるケラチン 4 が発現した。レチノイン酸受容体阻害剤 BMS493 を添加すると、角化が回復し、分化マーカーの発現も逆転した。また、chFBS の添加により、タイト結合蛋白 claudin (cldn) 4, occludin (OC), ZO-1 および E-cadherin の蛋白発現量は増加し、cldn1 は逆に減少し、TER が半減した。蛍光免疫染色で、OC はタイト結合形成部位である重層上皮表層にスポット状に局在し、cldn1, 4 と共存した。しかし、chFBS の添加により cldn1 のみがこの OC 陽性スポットから消失した。</p> <p>血清は、マウス表皮由来の KC に対して角化を抑制し、細胞間透過性を亢進させた。また、マウス KC ではレチノイン酸受容体を介するシグナルにより角化が抑制され、レチノイン酸に対する応答性があることが示唆された。マウスの重層上皮における角化の制御は、血清からのレチノイン酸の濃度が制御されているか、別の制御機構が存在する可能性が考えられた。</p>	