

氏名 西村 栄美  
 学位(専攻分野) 博士 (医学)  
 学位記番号 医博 第 2249 号  
 学位授与の日付 平成 12 年 3 月 23 日  
 学位授与の要件 学位規則 第 4 条 第 1 項 該当  
 研究科・専攻 医学研究科 内科系 専攻  
 学位論文題目 Regulation of E- and P-Cadherin Expression correlated with Melanocyte Migration and Diversification.  
 (色素細胞の遊走と多様化に関連する E-カドヘリン及び P-カドヘリンの発現制御)

論文調査委員 (主査) 教授 月田承一郎 教授 西村善彦 教授 宮地良樹

### 論文内容の要旨

メラノサイト (Mc) の前駆細胞であるメラノブラスト (Mb) は神経堤に由来し、背外側経路の真皮を腹側へと遊走したのち、ほぼ一斉に表皮に侵入し、全身の毛包内に分布するようになる。マウス有毛部では主に毛包に、無毛部では主に真皮に局在するようになり、メラニン形成を行う。このように Mc 系列細胞は非常に特徴的な遊走及び局在を経て発生してくる。しかし、そのメカニズムについてはいまだ殆どわかっていない。近年 Mb の遊走経路及びその周辺には種類の異なるカドヘリンが発現していることがわかってきた。そこで、Mb が次々に異なる微小環境の中を遊走し局在するようになる過程において、周囲の細胞との接着能が特異的に制御されている可能性を考え、細胞間接着分子のカドヘリンに着目した。

これまでに培養 Mc において E-カドヘリンの発現が確認されているが、*vivo* においては全く調べられていない。メラノサイト系列細胞は表皮内及び毛包内において角化細胞に囲まれて存在するため、その接着分子の発現を単細胞レベルで解析することが困難であったためであろうと考えられる。我々はこれを克服するためにフローサイトメトリーによる解析を導入した。胎仔皮膚の c-Kit 陽性、CD 45 陰性の集団が、Mb である (tyrosinase-related protein 2 (TRP 2); Mb marker 陽性) ことを利用したフローサイトメトリーによるカドヘリンの発現レベルの解析及び sorting を、RT-PCR 及び免疫組織二重染色と組み合わせ、Mc の発生過程におけるカドヘリンの発現を量的質的に解析した。

Mb が真皮内を腹側へと遊走する時期に相当する胎生 11.5 日においては、E-及び P-カドヘリン陰性であること、続く約 48 時間で一斉にしカドヘリンを 200 倍以上高発現するようになり、胎生 13.5 日においてはほぼ均一に E-カドヘリン<sup>high</sup> P-カドヘリン<sup>low/-</sup>を示すようになり、表皮に侵入する。一部の真皮に残った集団では E-カドヘリン発現の downregulation が認められた。さらに毛芽内を遊走し毛母に定着する Mb では E-カドヘリン発現の陰性化に伴い P-カドヘリンを高発現することが判明した。このように Mb は各発生段階において量的質的に異なるカドヘリンを発現しており、カドヘリンによる周囲の細胞との選択的接着を介して、その特異的な遊走及び局在が決まる可能性が示唆された。

また、最終的に 3 つの異なる集団、つまり E-カドヘリン P-カドヘリンを示す真皮内の集団、E-カドヘリン<sup>high</sup> P-カドヘリン<sup>low</sup>を示す表皮内の集団、E-カドヘリン P-カドヘリン<sup>high-med</sup>を示す毛母の集団へと多様化することがわかった。また各集団の発現パターンは周囲の細胞 (表皮角化細胞、毛母細胞、あるいは真皮線維芽細胞) と同じパターンを示した。このことから Mc/Mb のカドヘリンの発現パターンは、その局在と深い関わりを持つことが示唆された。マウスにおいては表皮内の Mb/Mc は生後 10 日以内に表皮から消失してしまうことが分かっているが、表皮内で恒常的に SCF を発現させたトランスジェニックマウスでは、生後 10 日以降も表皮内で生存しうる。これら表皮内で rescue された Mb のカドヘリンの発現を調べたところ、E-カドヘリン<sup>high</sup> P-カドヘリン<sup>low</sup>を示し表皮内での発現パターンが維持されていることがわかった。この結果からも Mb/Mc のカドヘリンの発現パターンが、その局在と深い関わりを持つことがわかる。

発生過程におけるカドヘリンの発現レベルをフローサイトメトリーにて単細胞レベルで解析し、カドヘリン発現の量的質的变化を明確に示すことに成功した。Mc 系列細胞は各発生段階において E-カドヘリン及び P-カドヘリンの発現レベルが量的に調節されていること、さらにその発現パターンは Mc 系列細胞の遊走及び多様化と密接に関係していることが、本論文により明らかになった。

#### 論文審査の結果の要旨

皮膚メラノサイトの前駆細胞であるメラノブラストは背外側経路を遊走し、真皮、表皮を経て毛包に分布するようになるが、そのメカニズムについては不明である。本論文では、細胞間接着分子のカドヘリンに着目し、フローサイトメトリーによる解析と免疫組織染色を組み合わせ、メラノサイトの発生過程におけるカドヘリンの発現を単細胞レベルで量的質的に検討した。

その結果、1) 真皮内を遊走中のメラノブラストは発生初期においては E-カドヘリン陰性、P-カドヘリン陰性であるが、表皮内への侵入に先立ってほぼ均一に E-カドヘリンを 200 倍以上高発現するようになること、2) 一部の真皮に残った集団では E-カドヘリンの発現レベルは比較的低く、のち陰性化すること、3) 表皮を経て毛芽内を遊走し毛母に定着する集団では E-カドヘリン発現の陰性化に伴い P-カドヘリンを高発現することなどが判明した。このようにメラノブラストは各発生段階において量的質的に異なるカドヘリンを発現しており、カドヘリンによる周囲の細胞との選択的接着を介して、その特異的な遊走及び局在が決まる可能性が示唆された。さらに、最終的にその局在部位に対応して、E-及び P-カドヘリンの発現パターンの組み合わせで区別される 3 つの異なる集団へと多様化すること、その発現量及びパターンは、各々メラノブラストの周囲の細胞集団（角化細胞や線維芽細胞）とほぼ同一であることが判明した。また、その発現パターンの制御に周囲の微小環境が深く関わっていることが示唆された。

以上の研究は、メラノサイトの発生機構の解明に貢献し、細胞の遊走及び局在のメカニズム解明に新しい識見を与えるものであり、発生生物学及び皮膚科学に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 12 年 3 月 1 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。