

京都大学	博士 (医学)	氏名	大八木 誠児
論文題目	Local coordination of epithelial planar polarity in the maintenance and regeneration of the adult rat airway (成体ラット気道上皮の維持と再生における近隣領域での平面内極性の協調について)		
(論文内容の要旨) 気管上皮では、線毛細胞が肺から口方向へ運動することで外来異物の進入を防ぎ、気管内の恒常性を維持している。このような平面上に並ぶ細胞に特定の極性をもたらす性質を平面内細胞極性 (PCP) という。ショウジョウバエを対象にした研究により、PCP の調節には複数のシグナル経路や機械的刺激が複雑に関与すると考えられているが、詳細については未だ不明な点が多い。哺乳類における PCP の研究は限定的であり、特に成体における PCP の維持と再生に注目した <i>in vivo</i> 研究は非常に少ない。近年、成体ラットの気管自家反転移植モデルが報告された。その反転移植領域において、線毛細胞は反転した方向性を長期に渡り維持しており、線毛細胞の極性が、肺から口方向の気管全体の極性よりも、近隣の上皮細胞に影響を受けて局所的に形成、維持される可能性が提示された。この可能性をより詳細に検討する為に、本研究では定常状態および損傷後の反転気管において維持、再生される線毛細胞の極性の協調について調べた。 実験の方法について示す。全身の細胞に tdTomato を発現する遺伝子改変ラット (Flame ラット) の気管を一部開窓し、開窓部に野生型ラットの気管片を全層組織の状態にて反転移植した (非擦過モデル)。移植領域の上皮細胞を host 由来細胞に置換するために、移植する気管片の気道上皮を擦過除去したモデル (擦過損傷モデル) も併せて作製した。術後、維持あるいは再生された上皮の様相を走査型電子顕微鏡観察 (SEM) で調べ、線毛細胞における tdTomato 発現の有無を蛍光顕微鏡観察で評価した。線毛細胞の方向については、高速度カメラを搭載した顕微鏡を用いて、50 μm 四方を region of interest (ROI) とし、観察し得る複数の ROI で線毛運動の方向を評価した。また、蛍光免疫染色法で PCP 関連タンパク質である core PCP protein (Fz6, Vangl1) の局在を確認し、擦過損傷後の再生上皮における細胞の極性を分子レベルで評価した。連続切片 SEM 法を用いて線毛運動の方向と一致する線毛基底構造の方向を細胞毎に観察し、隣接細胞間における方向性の協調を調べた。 実験の結果と考察について示す。非擦過モデルでは、術後 6 ヶ月に渡り反転移植領域の線毛上皮は非移植領域と同様の様相を SEM 観察で呈し、定常状態にあったと考えられた。反転移植領域の線毛細胞は tdTomato 陰性で、線毛運動の方向は反転維持されていた。したがって、donor 由来の上皮細胞が turnover 後も移植領域の定常状態を維持し、元来有していた極性も維持されると考えられた。一方、擦過損傷モデルにおいて移植領域の線毛上皮は tdTomato 陽性の host 由来細胞で置換された。線毛細胞は術後早期で移植領域内に散在し、次第に密度が増加していった。術後 6 カ月において、線毛細胞の運動方向は移植片全体を母集団とした場合に大きなばらつきを認めた。しかし、50 μm 四方の ROI 毎に検討すると方向のばらつきが少なかったことから、近傍の細胞間で極性が協調されることが示唆された。また、擦過損傷後の再生細胞で core PCP protein の発現を認め、その配向性は近傍で協調されていた。さらに、連続切片 SEM 法により隣接する線毛細胞間で特に極性のばらつきが低いことが確認された。隣接細胞間で極性を協調させる何かしらの機構が線毛細胞に存在すると考えられた。 擦過損傷モデルのように広範な損傷が生じた気道上皮において、創傷治癒早期に再生した線毛細胞が獲得した極性は、それが好ましいかに関わらず、後に周辺に生じる線毛細胞の極性の決定に影響するものと考え得る。一方、正常上皮の turnover や小規模の損傷後に新生された線毛細胞であれば、正常な方向性を有する近隣の細胞から極性調節を受けることが可能であり、気管全体の極性が正常に維持されると推察される。			

(論文審査の結果の要旨)

気道上皮における平面内極性に関する研究は限られ、*in vivo*、特に成体気道上皮における制御機構は不明な点が多い。本研究は成体ラットを用いて、成体気道上皮の平面内極性が上皮細胞間の作用により局所的に調節されることを示した。

野生型ラットと全身に tdTomato を発現する Flame ラットの 2 種を用いて、Flame ラットの気管開窓部に頭尾側を反転した野生型ラットの気管片を移植し、移植部の線毛運動の方向性を検討した。移植部では、約 3 ヶ月とされるターンオーバー後の donor 由来細胞が、術後 6 ヶ月に渡り残存し線毛運動は反転維持していた。これは細胞起源が極性に影響した可能性があった。そこで、donor 由来の上皮細胞を擦過除去した後に反転移植した擦過モデルを作製し同様に検討したところ、host 由来の上皮細胞に置換された移植部では、線毛運動の方向は host の極性 (肺から口方向) に従うわけではなく、様々な方向にばらついていった。しかし、50 μm 四方の局所領域内で方向性を評価すると、線毛運動の方向が協調されており、特に隣接細胞間でより高い協調性が確認された。これは再生上皮における極性が、細胞起源といった独立した因子の影響ではなく、線毛細胞へ分化する過程で、隣接する細胞から影響を受けながら新たに獲得されたことを示唆した。

以上の研究は成体気道上皮における平面内極性の調節機構の一端を示し、気道上皮における平面内極性研究の今後の発展に寄与するものである。

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、令和 5 年 12 月 12 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。

要旨公開可能日： 年 月 日以降