

称号及び氏名	博士（獣医学）	松井 誠哉
学位授与の日付	平成24年8月31日	
論文名	表皮細胞における接着分子 Fat2 の発現と機能解析に関する研究	
論文審査委員	主査	竹内 正吉
	副査	笹井 和美
	副査	小森 雅之

論文要旨

緒言

カドヘリンは、カルシウム依存性の細胞間接着分子であり、細胞外領域のカドヘリンリピートを共通の構造として、大きなファミリーを形成している。そのうちEカドヘリンやPカドヘリンといった古くから知られているカドヘリンは、5つのカドヘリンリピートを有する。一方Fatカドヘリンは、34のカドヘリンリピートを持つ分子量が最大のカドヘリンであり、哺乳動物においてFat1、Fat2、Fat3及びFat4の4種がこれまでに同定されている。

皮膚は表皮、真皮及び皮下組織から構成される。表皮を構成する表皮ケラチノサイトは、タイトジャンクション、アドヘレンスジャンクション及びデスモソームの3つの細胞間接着装置により強固に細胞間が接着されることで、細胞外液の漏出を防ぎ、微生物や物理的な刺激から生体を守る役割を果たしている。表皮に発現するカドヘリンは、これら細胞間接着装置の構成分子であり、生理的役割に不可欠な働きを持つだけでなく、その異常は皮膚疾患とも密接に関与していることが解ってきた。例えば、自己免疫性水疱症の一種である天疱瘡に、デスモソーム構成蛋白のデスモグレインが、また、表皮細胞癌である有棘細胞癌（SCC）の浸潤性や転移能の亢進に、Eカドヘリンが、そして、炎症性の皮膚疾患である乾癬に、Tカドヘリンが、それぞれ関与していることが報告されている。

近年、EST (Expressed Sequence Tag) のデータベース検索の報告、及びカドヘリンファミリーに共通する配列を利用した PCR の結果により、Fat2 がヒト皮膚及び表皮ケラチノサイトに発現している新たなカドヘリンであることが示唆された。そこで、本研究では Fat2 の皮膚における生理機能及び皮膚疾患における役割を解明するために、ヒト表皮細胞における Fat2 の発現と局在並びに機能を解析すると同時に、ヒト以外の哺乳動物の皮膚における Fat2 の発現と、皮膚腫瘍が問題となっているイヌ皮膚における Fat2 の発現動態を調べた。

第一章 ヒト表皮における Fat2 の発現と局在の解析

本章では、Fat2 が正常表皮及び SCC に発現していることを明らかにするとともに、表皮ケラチノサイトでの Fat2 の詳細な局在を解析した。

まず RT-PCR により、ヒト表皮ケラチノサイト (NHEK) 及びヒト SCC 由来細胞 (HSC-1) において Fat2 mRNA 発現が認められた。次に Fat2 蛋白の発現を解析するため、ヒト Fat2 抗体を作製した。この抗体を用いてウエスタンブロットを行ったところ、単一バンドが検出され、そのサイズは Fat2 の推定分子量と一致したことから、NHEK 及び HSC-1 において Fat2 が蛋白レベルで発現することが明らかとなった。

次に表皮における Fat2 の局在を解析するため、ヒトの正常な皮膚組織を用いて免疫染色を行ったところ、表皮の基底層から顆粒層のケラチノサイトの細胞間に Fat2 が発現していた。また Fat2 はヒト正常表皮だけでなく、ヒト SCC においても、その細胞間に発現していた。

NHEK において、Fat2 の局在を詳細に解析したところ、細胞間に局在していたばかりでなく、幾つかの細胞間においては、Fat2 は 2 列の点状構造物に局在していた。そこで、この点状構造物が、細胞間接着装置アドヘレンスジャンクション (AJ) 構築の初期段階で出現するか否かを検討した。NHEK 及び HSC-1 において、細胞間接合部を再構成させたところ、Fat2 は再構成した細胞間において 2 列の点状に局在し、AJ 構築の初期段階の構成蛋白である E カドヘリンと共局在していた。更に、AJ においてカドヘリンは細胞内でアクチンと連結していることが知られているが、Fat2 もアクチンフィラメントと共局在し、アクチンの脱重合が Fat2 の局在を変えることが示された。従って Fat2 は、アクチンフィラメントと相互作用することにより、強固な細胞接着を担う、細胞接着装置 AJ の形成に関与していることが示唆された。

第二章 ヒト表皮細胞における Fat2 の機能解析

第一章で、Fat2 がヒト表皮細胞に発現していることを明らかにした。カドヘリンは細胞接着の他に、細胞の増殖や分化、運動といった様々な機能を持つことが報告されていることから、本章では RNAi の手法を用いて、Fat2 の表皮細胞における機能解析を行った。

まず、HSC-1 に Fat2-siRNA をトランスフェクトした後 48 時間培養したところ、Fat2 の発現が著しく減少していることを確認した。次に Fat2 をノックダウンした HSC-1 の細胞遊走に対する影響を調べるために、以下の 3 つの遊走、①ボイデンチャンバーの原理に基づいたチャンバーの上室から下室への遊走、②金コロイドを貪食する性質を利用した遊走、③細胞群を剥離することにより、周囲の細胞が剥離痕を埋めようと移動する性質を利用した水平方向への遊走、を解析した。Fat2 のノックダウンにより、3 つのアッセイにおいて遊走はコントロールに比べ有意に抑制された。以上の結果より、Fat2 のノックダウンは HSC-1 の細胞遊走を抑制することが明らかとなった。免疫染色した組織標本を観察した結果、その一因としてアクチンフィラメントの糸状仮足（フィロポディア）形成の抑制が示唆された。

本章において、SCC 由来細胞株では Fat2 は細胞遊走性を抑制することが明らかとなった。このことから、Fat2 が皮膚癌細胞の浸潤・転移に関与していることが示唆された。第一章で Fat2 が SCC 由来細胞株と同様に正常ケラチノサイトに発現していたことから、Fat2 の細胞遊走抑制作用が正常表皮細胞でも機能していると仮定すると、Fat2 は、皮膚における創傷治癒において、表皮の欠損を修復しようとする表皮細胞の遊走を制御している可能性が推察された。

第三章 イヌの皮膚腫瘍における Fat2 の発現

第二章までの研究により、Fat2 がヒト表皮に発現し生理的役割を担っていること、ヒト表皮癌細胞において細胞遊走を制御するという機能を明らかにした。そこで、他の哺乳動物の皮膚組織における Fat2 の発現と皮膚癌が問題となっているイヌの皮膚における役割を調べた。

まず RT-PCR によりイヌ正常皮膚組織における mRNA 発現を検討したところ、陽性対照の GAPDH などのバンドは検出されたが、Fat1 及び Fat2 mRNA の発現は確認できなかった。一方、正常マウス表皮組織、正常ラット表皮組織、およびマウスケラチノサイト細胞株（Pam212 細胞）では Fat1 及び Fat2 mRNA の発現が確認された。この結果より、マウス及びラット表皮組織において、Fat2 mRNA が発現していることが明らかとなった。一方、イヌの正常皮膚には Fat2 は発現していないことが示された。

Fat は、その変異が組織増殖を誘導することから、ショウジョウバエにおいてがん抑制遺伝子として発見されるなど、腫瘍と関連する報告が多い。また、イヌの皮膚腫瘍の発生率はイヌのあらゆる腫瘍のなかで乳腺腫瘍に次いで多く、メラノーマのような幾つかの悪性腫瘍は予後が悪く、早期の診断が求められている。従ってイヌの皮膚腫瘍のさらなる研究は、正確な診断と予後判定に必要である。そこで、イヌ皮膚腫瘍組織における Fat1 及び Fat2 mRNA 発現を検討した。その結果、正常皮膚組織では認められなかった Fat2 mRNA 発現が、67%の皮膚腫瘍組織で認められた。一方、皮膚腫瘍組織における Fat1 mRNA の発現は確認できなかった。

従って **Fat2** が、イヌの皮膚において細胞増殖や腫瘍化に関与している可能性が示唆された。

総括

1. 免疫ブロット及び免疫染色により、ヒト **Fat2** が表皮ケラチノサイト、**SCC** 由来細胞株、ヒト正常表皮組織、及びヒト **SCC** に発現すること、そして、**Fat2** がヒト正常表皮の基底層から顆粒層に発現していることが明らかとなった。また、表皮ケラチノサイトを用いて細胞内の詳細な局在を解析した結果、**Fat2** は細胞間に局在しており、アドヘレンスジャンクション構成蛋白であることが示唆された。さらに、**Fat2** は構成途中段階のアドヘレンスジャンクションに発現し、アクチンフィラメントと相互作用していることから、細胞間接着装置形成への関与が示唆された。
2. **RNAi** の手法により、**Fat2** の発現が減少すると、表皮癌細胞において、細胞遊走能が抑制された。そして、その一因としてフィロポディア形成の抑制が示唆された。
3. イヌの正常皮膚及び様々な皮膚腫瘍における **Fat2 mRNA** 発現を **RT-PCR** により解析した結果、皮膚腫瘍においてのみ **Fat2** 発現が認められた。したがって、イヌ皮膚腫瘍の発生や細胞増殖における **Fat2** の役割が示唆された。
4. マウス及びラット正常表皮組織において **Fat2 mRNA** が発現していることが明らかとなった。

以上の研究結果より、**Fat2** は哺乳動物皮膚に発現する新たなカドヘリンであり、哺乳動物の皮膚において重要な生理的ならびに病的機能を有する細胞間接着分子の一つであることが明らかとなった。また、**Fat2** は細胞遊走を抑制することから、正常表皮細胞では創傷治癒、表皮癌細胞においてはその転移・浸潤の制御という役割を果たしていると推察される。今後 **Fat2** の研究を進めることで、哺乳動物の皮膚生理及び皮膚疾患の解明が進むことが期待される。

審査結果の要旨

カドヘリンは、**Ca²⁺**依存性の細胞間接着分子であり、細胞外領域のカドヘリンリピートを共通の構造として、大きなファミリーを形成している。**Fat** は **34** のカドヘリンリピートを持つ分子量が最大のカドヘリンであり、哺乳動物において **Fat1**、**Fat2**、**Fat3** 及び **Fat4** がこれまでに同定されている。皮膚の表皮を構成するケラチノサイトは、タイトジャンクション、アドヘレンスジャンクション(**AJ**)及びデスモソームの細胞間接着装置により強固に細胞間が接着されることで、細胞外液の漏出を防ぎ、微生物や

物理的な刺激から生体を守る役割を果たしている。表皮に発現するカドヘリンは、これら細胞間接着装置の構成分子であり、生理的役割に不可欠だけでなく、その異常は皮膚疾患に関与している。近年、**Expressed Sequence Tag** のデータベース検索の報告及びカドヘリンファミリーに共通する配列を利用した **PCR** の結果により、**Fat2** がヒト皮膚及び表皮ケラチノサイトに発現している新たなカドヘリンであることが示唆された。本研究では、**Fat2** の皮膚における生理機能及び皮膚疾患での役割を解明するために、ヒト表皮細胞における **Fat2** の発現と局在並びに機能を解析すると同時に、ヒト以外の哺乳動物の皮膚における **Fat2** の発現動態を調べた。

第 1 章では、正常表皮及び表皮細胞癌である有棘細胞癌 (**SCC**) における **Fat2** の発現とともに、表皮ケラチノサイトでの **Fat2** の詳細な局在を解析した。ヒト表皮ケラチノサイト (**NHEK**) 及びヒト **SCC** 由来細胞 (**HSC-1**) に **Fat2** の mRNA と蛋白の発現が認められた。正常な皮膚組織の **Fat2** 免疫染色を行ったところ、表皮の基底層から顆粒層のケラチノサイト間に **Fat2** が発現していた。また、**Fat2** は **HSC-1** の細胞間にも発現していた。**NHEK** での **Fat2** 局在を詳細に解析したところ、細胞間の局在ばかりでなく、幾つかの細胞間においては、2 列の点状構造物に局在していた。**NHEK** 及び **HSC-1** を用いて細胞間接合部を再構成させたところ、**Fat2** は再構成した部位で 2 列の点状に局在し、**AJ** 構築の初期段階の構成蛋白である **E** カドヘリンと共局在していた。更に、**AJ** において **Fat2** はアクチンフィラメントと共局在し、アクチンの脱重合が **Fat2** の局在を変えることが示された。従って **Fat2** は、アクチンフィラメントと相互作用することにより、強固な細胞接着を担う **AJ** の形成に関与していることが示唆された。

第 2 章では、**RNAi** の手法を用いて **Fat2** の表皮細胞における機能解析を行った。**HSC-1** に **Fat2-siRNA** をトランスフェクトし 48 時間培養したところ、**Fat2** の発現が著しく減少した。**Fat2** をノックダウンした **HSC-1** の細胞遊走に対する影響を調べるために、①ボイデンチャンバーの原理に基づいたチャンバーの上室から下室への遊走、②金コロイドを貪食する性質を利用した遊走、③細胞群を剥離した後、周囲の細胞が剥離痕に移動する性質を利用した水平方向への遊走、を解析した。**Fat2** ノックダウンにより、3 つのアッセイにおいて遊走はコントロールに比べ有意に抑制されたことから、**Fat2** は **HSC-1** の細胞遊走に関与していることが明らかとなった。その一因としてアクチンフィラメントの糸状仮足 (フィロポディア) 形成に関与することが免疫染色組織標本から示唆された。**SCC** 由来細胞株でも **Fat2** ノックダウンは細胞遊走性を抑制したことから、**Fat2** が皮膚癌細胞の浸潤・転移に関与していることが示唆された。

第 3 章では、他の哺乳動物の皮膚組織における **Fat2** の発現と皮膚癌が問題となっているイヌの皮膚における役割を調べた。**RT-PCR** によりイヌ正常皮膚組織における mRNA 発現を検討したところ、**Fat1** 及び **Fat2 mRNA** の発現は確認できなかった。一方、正常マウス及びラット表皮組織およびマウスケラチノサイト細胞株 (**Pam212** 細胞) では **Fat1** 及び **Fat2 mRNA** の発現が確認された。しかしながら、イヌ皮膚腫瘍組織に

における **Fat1** 及び **Fat2 mRNA** 発現を検討した結果、**Fat2 mRNA** 発現が **67%**で認められた。一方、**Fat1 mRNA** の発現は確認できなかった。従って、**Fat2** がイヌ皮膚において細胞増殖や腫瘍化に関与している可能性が示された。

以上の結果より、**Fat2** は哺乳動物皮膚に発現する新たなカドヘリンであり、皮膚の重要な生理的及び病理的機能を有する細胞間接着分子の一つであることを明らかにした。また、細胞遊走の結果から、**Fat2** は正常表皮細胞では創傷治癒時の移動、表皮癌細胞の転移や浸潤の制御に役割を果たしていると推察した。

本研究は、哺乳動物皮膚の生理的ならびに病態的役割に関与する細胞接着装置の構成分子として **Fat2** を初めて特定し、更に皮膚の生理時ならびに病態時における **Fat2** の機能を明らかにしたものであり、これらの知見を基に今後 **Fat2** の研究が進展することで、哺乳動物の皮膚生理及び皮膚疾患の原因や治療方法が解明されることが期待される。この研究成果は、基礎並びに臨床獣医学のみならず医学分野に大きく貢献すると考えられ、学力確認の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。