

氏名	岩 田 光 弘
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博乙第 3446 号
学位授与の日付	平成12年3月25日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者（学位規則第4条第2項該当）
学位論文題名	Zinc accumulation and metallothionein gene expression in the proliferating epidermis during wound healing in mouse skin
論文審査委員	教授 古田裕昭 教授 永井教之 教授 松村智弘

学位論文内容の要旨

【緒言】

生体の必須微量元素である亜鉛は、DNA、RNAの合成に特異的な役割を果たし、タンパク合成速度に影響を与えることが知られている。特に、Poriesら（Lancet, 1967）によって、亜鉛が創傷の回復にきわめて効果的であることが発見されてから、創傷治癒に影響を及ぼす諸因子の中で亜鉛はその関与が数多く報告されてきた。

メタロチオネイン（MT）は、生体内の必須金属である亜鉛や銅などの金属代謝をつかさどる蛋白質として知られているが、その生物学的な意義に関しては不明な点が多い。MTの多様な作用機序の中でも、1)生体内の必須微量元素である亜鉛の代謝、2)侵襲時における急性期蛋白としての働き、3)組織の増殖あるいは再生との関与、の3点に着目すると、創傷治癒機転における侵襲および組織の再生過程で、亜鉛とともにMTが重要な役割を担っている可能性が考えられる。そこで本研究では、創傷後の生体内の亜鉛動態とMT遺伝子の発現を経時的に検索し、創傷治癒過程におけるMTの果たす役割について検討を行った。

【材料及び方法】

1. **実験動物**：Hos-hr-1雄性ヘアレスマウスの背部皮膚組織に直径6mmのスキンパンチで筋膜に達する開放創を作製した。創傷作製後、3時間から10日まで経時的に血漿、肝および創縁部組織を採取し、検討に用いた。
2. **培養細胞**：正常ヒト表皮角化細胞（NHEK）を用い、表皮角化細胞増殖用無血清培地（Humedia-KG2）中で、37℃、5%CO₂気相下にて培養した。増殖曲線を描記後、対数増殖期と静止期のそれぞれの状態で細胞を採取し、検討に用いた。

3. 亜鉛濃度の測定：血漿はトリクロロ酢酸で、肝、創縁部組織および培養細胞は硝酸で除蛋白を行い、原子吸光分光光度計を用いて亜鉛濃度を測定した。

4. MTの検索：

1) カドミウムーヘム法：肝臓を4倍量の蔗糖液でホモゲナイズ後遠心し、上清を採取した。MTの濃度はOnosakaら (Toxicol Appl Pharmacol, 1982) の方法に従って定量した。

2) ノーザンプロット法：酸性フェノール法に準じ、肝および培養細胞より全RNAを抽出し、電気泳動後、ナイロン膜に固定した。マウスMT-I cDNAから作製した³²P標識DNAプローブをハイブリダイズさせ、各々のmRNAの発現量を検索した。

3) *In situ* ハイブリダイゼーション (ISH) 法：マウスを4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、創縁部組織を摘出後、パラフィン包埋し、連続切片を作製した。前述のcDNAから作製した³⁵S標識RNAプローブをハイブリダイズさせ、Takebayashiら (J Cell Biol, 1995) の方法に従ってISHを行った。

4) 免疫組織化学染色法：スライドガラス上で培養した細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、内因性ペルオキシダーゼ阻止を行った後、一次抗体として抗MT抗体 (ZYMED) 用い、ENVISIONシステムにより行った。

【結果および考察】

ノーザンプロット法およびカドミウムーヘム法によって、創傷作製後早期に、肝臓中に強いMT遺伝子の発現が認められ、MT蛋白の増加も認められた。これにともない、血漿亜鉛の著しい低下と肝内亜鉛の増加が観察された。Abeら (Metallothionein II experientia supplementum, 1987) は、血中の亜鉛濃度の低下にともない好中球の殺菌能が亢進することを明らかにしている。このことから、MTは、創傷作製に伴う侵襲によって肝臓に急性期蛋白として発現し、生体の防御反応に重要な役割を担っていると考えられた。

ISH法による創縁部組織の観察では、創傷作製後早期には明らかなMT遺伝子の発現は認められず、その後、創中央部に向かって、活発に増殖、進展していく上皮組織に限局してMT遺伝子の発現が認められた。このため、MTが上皮組織の増殖や再生に深く関与していることが考えられた。また、創縁部組織の亜鉛濃度は、MT遺伝子の発現後より上昇したことから、MTが創縁部組織への亜鉛の集積に一役を担っていることが考えられた。

ノーザンプロット法および免疫組織化学染色法によって、NHEKにおいて、コンフルエントに達した静止期の細胞と比較して対数増殖期の細胞で、MTが蛋白、遺伝子とも増加していることが示された。細胞内亜鉛濃度は静止期に比較して対数増殖期に有意に増加していたため、*In vitro*においても、MTが上皮角化細胞の増殖と細胞内の亜鉛の取り込みに深く関与していることが示唆された。

以上のことから、創傷時の侵襲によって、MTが急性期蛋白として肝臓中に発現していることが考えられ、生体内の亜鉛動態に深く関与することが示唆された。そして、創傷治癒過程においてMTは、創縁部の亜鉛集積に一役を担うことによって、創縁部上皮組織の増殖や再生に深く関与していると考えられた。

論文審査結果の要旨

生体の必須微量元素である亜鉛は、DNAやRNAの合成に特異的な役割を果たし、蛋白合成速度に影響を与えることが知られており、成長や創傷治癒などに密接に関係している。メタロチオネイン (MT) は、生体内の必須金属である亜鉛や銅などの恒常性の維持をつかさどる蛋白質として知られている。本研究はMTの多様な作用機序の中で、1)生体内の必須微量元素である亜鉛の代謝、2)侵襲時における急性期蛋白としての働き、3)組織の増殖あるいは再生への関与、の3点に着目し、創傷治癒機転における侵襲および組織の再生過程で、MTが果たす役割について検討を行ったものである。

本研究は、ヘアレスマウスを用いて創傷後の生体内の亜鉛動態とMT遺伝子の発現を経時的に検索した。このことから、MTが、創傷作製に伴う侵襲によって、肝臓において急性期蛋白として発現すること、また、創縁部組織においては上皮組織の増殖や再生に関与し、創縁部組織への亜鉛の集積に一役を担うことを明らかにした。さらに、正常ヒト表皮角化細胞を用いることによって、MTが上皮角化細胞の増殖と細胞内の亜鉛の取り込みに深く関与していることを明らかにした。

特に、創傷治癒過程において、創縁部の亜鉛集積にMTを関連づけることによって、MTが創縁部上皮組織の増殖や再生に深く関与しているという知見は新しい。本研究は学問的に非常に意義があり、創傷治癒に対する新しい治療法の開発へと発展することがおおいに期待される。

したがって、本申請論文は博士（歯学）の学位授与に値するものと判定した。