

氏名(本籍)	田 ^た 口 ^{ぐち} 詩路麻 ^{しじま} (岐阜県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第5827号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	Overexpression of the Transcription Factor Yin-Yang-1 Suppresses Differentiation of HaCaT Cells in Three-dimensional Cell Culture (過発現させた転写因子 Yin-Yang-1 は 3D 培養における HaCaT 細胞の分化を抑制する)
主査	筑波大学教授 博士(医学) 関 堂 充
副査	筑波大学教授 医学博士 大 塚 盛 男
副査	筑波大学教授 医学博士 原 晃
副査	筑波大学教授 博士(医学) 原 尚 人

論文の内容の要旨

(目的)

転写因子 Yin-Yan-1 (YY1) が角化細胞の分化・増殖制御にかかわる影響を検討する。

(対象及び方法)

表皮角化細胞 cell line の HaCaT 細胞 (HaCaT) に transfection を行い、抗生剤 G418 (gemeticin) にて selection 後、単一 colony 由来の YY1 過発現 transformant を作製する。HaCaT をコラーゲンゲルにて 3D 培養し、Day4,7,10,14 に採取した標本にて HE 染色にて表皮の厚さ、免疫染色にて分化を示す各遺伝子発現を検討した。また YY1 遺伝子抑制 HaCaT により同様の実験を行い比較した。その後マウス新生児から採取した表皮培養細胞にて YY1 transfection、角化細胞への分化強制誘導し、リアルタイム PCR による mRNA 転写制御の評価、WB による蛋白発現量の測定を行った。またホルマリン固定標本にて各種染色、蛋白発現量の測定、細胞増殖 ELISA なども行った。

(結果)

過発現 YYA-HaCaT サンプルは 3D 培養にて著明な表皮肥厚を認めた。対照では発現が見られていた角化分子マーカーが過発現 YY1-HaCaT では発現されなかった。

YY-1 発現抑制により表皮は薄くなり、過発現 YY1-HaCaT にて染まらなかった分子マーカーが再度染まった。マウス角化細胞培養による強制分化誘導実験では強制分化させた状況で RNA 転写レベルおよび蛋白レベルで K10, Filaggrin, Involucrin, Loricrin が抑制されている事がわかった。過発現 YY1 により肥厚した表皮構成細胞は Ki-67 で核染色され、BrdU の取り込みが対照と比較し増加していた。また細胞抑制制御に働く p21, p16 が抑制、細胞周期増殖因子の CyclinB1 が亢進していた。

(考察)

YY1 過発現 3D 培養にて表皮肥厚が顕著になり、未分化な状態を示す K14 のみ染色されるのは表皮角化細胞が未分化な状態のまま増殖したことを示す。YY1 は表皮角化細胞に対し分化抑制、細胞増殖、アポトー

シス停止作用があると想定された。YY1 発現抑制にて表皮の厚さが正常にもどり、他の分化を示す免疫染色が染まることになったことにより YY1 の分化抑制機能が証明された。マウス表皮角化細胞培養での実験でも RNA レベル、蛋白レベルで YY1 が分化抑制に *in vivo* に近い状態で働いていることが証明された。転写因子 YY1 は表皮基底層における角化細胞の分化を抑制し、分裂能が高い未分化な状態を維持するのに重要な役割を果たしていることが証明された。

審査の結果の要旨

本論文は YY1 の角化細胞の分化・増殖制御に関する役割に関し、HaCaT 細胞を使用し 3D 培養を用いた実験が行われている。YY1 の過発現、発現抑制によりそれぞれ表皮培養角化細胞の肥厚、減少、角化細胞マーカーの染色不全、染色が見られ、YY1 が角化細胞の分化抑制、細胞増殖に重要な役割を果たしていることを明らかにしている。今後の皮膚癌の細胞治療などに関する基盤として価値ある研究と考えられる。適切な実験計画が、また応用としてマウス角化細胞を用いて *in vivo* に近い状況での検証が行われている。

論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。