

氏名（本籍）	丸山 浩
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	博甲第 7455 号
学位授与年月	平成 27 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	B-Myb Enhances Proliferation and Suppresses Differentiation of Keratinocytes in Three-dimensional Cell Culture (B-Myb は表皮角化細胞の三次元培養において増殖を促進し、分化を抑制する)
主査	筑波大学教授 博士（医学） 藤本 学
副査	筑波大学教授 博士（理学） 入江 賢児
副査	筑波大学教授 医学博士 山崎 正志
副査	筑波大学講師 博士（医学） 松井 裕史

## 論文の内容の要旨

### (目的)

B-Myb (Mybl2) は、細胞増殖、分化、アポトーシスに関わる Myb gene family の 1 つであり、その homologue は脊椎動物細胞に ubiquitous に発現していることが知られているが、表皮角化細胞における B-Myb の役割は分かっていない。そこで、表皮角化細胞の増殖と分化に B-Myb がどのような役割を果たしているかを明らかにすることを目的に、以下の実験が試みられた。

### (対象と方法)

正常マウス皮膚で、分化の前後における B-Myb の RNA やタンパクの発現が、リアルタイム PCR 法、ウエスタンブロット法にて検討された。

ヒト角化細胞株 HaCaT 細胞を用いて B-Myb を過剰発現させた際やノックダウンさせた際の増殖や分化への影響が検討された。pCMV-B-Myb ベクターを transfection させて恒常的に B-Myb を過剰発現させた HaCaT 細胞を用い、三次元培養モデルが作成された。また、B-Myb の shRNA ベクターでノックダウンさせた HaCaT 細胞を用い、三次元培養モデルが作成された。

正常ヒト表皮角化細胞において B-Myb をノックダウンさせ、三次元培養モデルが作成された。

HaCaT 細胞を用いて B-Myb を過剰発現やノックダウンさせた際の cell cycle への影響がウエスタンブ

ロット法や定量 PCR 法で検討された。

#### (結果)

正常表皮における B-Myb の発現が検討されたところ、基底層～有棘層下部の未分化角化細胞に p-B-Myb が優位に発現していることが示された。表皮角化細胞が分化するに従って B-Myb の RNA は減少し、B-Myb のタンパク質発現も減少していた。

ヒト角化細胞株 HaCaT をコラーゲンゲル上で空気暴露する三次元培養を行うと、HaCaT 細胞は重層化し、表皮組織様構造の形成が認められるが、HaCaT 細胞に B-Myb を恒常的に過剰発現させ、三次元培養が行われると、コントロールと比較して表皮様組織厚の増加が認められた。表皮様組織を表皮分化マーカーで染色すると、厚くなった層は未分化細胞で構成されていることが示された。また、これらの層は増殖マーカー Ki67 陽性細胞数も優位に増加していた。

逆に、siRNA により B-Myb をノックダウンした HaCaT 細胞の三次元培養が行われると、コントロールに比して表皮様組織厚の減少および Ki67 陽性細胞数の減少が示された。正常ヒト表皮角化細胞において B-Myb をノックダウンさせ三次元培養が行われると、コントロールに比して表皮厚が減少することが示された。

また、B-Myb が HaCaT 細胞に過剰発現され、ウェスタンブロット法や定量 PCR 法にて測定されると、タンパク質、mRNA のどちらにおいても、CDK1、CDK2、サイクリン A の増加が観察された。逆にノックダウンされた際には、CDK1、CDK2、サイクリン A の減少が認められた。正常表皮角化細胞においても、B-Myb がノックダウンされると、CDK1、CDK2、サイクリン A が減少することが示された。

#### (考察)

増殖している未分化な表皮角化細胞に特に発現している B-Myb は、表皮の角化が進むに従って抑制されており、増殖と分化が相反する関係であることを裏付けると考えられた。

三次元培養モデルを用いて B-Myb を過剰発現させても、分化が止まり、未分化なタイプの HaCaT 細胞が増殖した。逆に、B-Myb を減少させると、HaCaT 細胞や正常表皮角化細胞も減少した。

細胞周期におけるタンパク質や mRNA の発現は、B-Myb を過剰発現させると、S 期に必要な CDK1 が増加し、G2/M 期に必要な CDK2 が増加し、S 期、G2/M 期ともに必要なサイクリン A が増加した。逆に、B-Myb をノックダウンさせると、それらは減少する。すなわち、B-Myb は、cel cycle の S 期や G2/M 期を促進する影響を与えていることを裏付けると考えられた。

以上より、B-Myb は表皮基底層において角化細胞の分化を抑制し、角化細胞を未分化な状態に維持するのに重要な役割を果たしていると考えられた。

## 審査の結果の要旨

#### (批評)

B-Myb (Myb12) の表皮角化細胞における発現と機能を明らかにした論文である。B-Myb の発現により、表皮角化細胞の分化は抑制され、一方で角化の進行とともにその発現は減弱することを、種々の実験的手法により明確に示しており、信頼に足る結果が得られている。これらの研究成果は、表皮角化細胞の増殖と分化の制御機構を解明する上できわめて重要な知見であり、高く評価される。

平成 26 年 12 月 25 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を

求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。