

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

皮膚 (1994.12) 36巻6号:896～901.

乾癬表皮の細胞周期
—細胞周期時間の短縮か? Growth Fractionの増大か?—

飯塚一

乾癬表皮の細胞周期

—細胞周期時間の短縮か？Growth Fractionの増大か？—

旭川医科大学皮膚科 飯塚 一

表皮における細胞周期時間の問題点は、乾癬よりもむしろ、正常表皮の細胞周期をどうとらえるかにかかっている。細胞周期時間が乾癬表皮で短縮しているという Weinstein の説と、growth fraction の差で説明しようという Bauer の説について問題点をまじえて解説した。近年、細胞周期の制御機構が分子レベルで急速に明らかにされつつあり、新しい目で細胞周期が見直されようとしている。

キーワード：乾癬—表皮細胞増殖—細胞周期—*growth fraction*—サイクリン

はじめに

乾癬表皮の細胞周期については大きく2通りの考え方がある。1つは乾癬表皮は正常表皮と比べ細胞周期が短縮しており、その結果、乾癬においては一定時間に多数の細胞が生みだされるというものである。もう1つは正常表皮も乾癬表皮も細胞周期自体はあまり大きな変化はないが、*cycling cell* の比率、すなわち *growth fraction* (GF) が乾癬表皮で増えているため、増殖が亢進しているという考え方である。

Table 1 に代表的な2つのデータを示す¹⁻³⁾。Bauer は GF の差を重視するグループの代表であり、Weinstein は細胞周期時間の差で説明しようとするグループの代表である。Table 1 をみると乾癬表皮の細胞周期は両グループともかなり接近していることが分かる。差があるのは正常表皮部分である。乾癬表皮の細胞周期を問題にする際、検討の対象になるのは、意外なことに乾癬ではなく、実は正常表皮なのである。

細胞周期の算定

Fig. 1 に細胞周期を示す。増殖プールのうち実際に細胞周期をまわっている細胞集団を *cycling cell* とよぶ。増殖プールに占める *cycling cell* の比率が、*growth fraction* (GF) である。一定の細胞産生率を示す集団においては、GF が小さいほど、細胞周期は短い。

S期の細胞は [³H]—チミジンを急速にとりこむため増殖プールにおけるS期細胞の比率を求めることができる。これを *labeling index* (LI) という。

Fig. 1 において、サイクリング細胞集団が一定のスピードで、かつランダムに細胞周期をまわっているとすると、各期の時間の比率は(各期の)細胞の数の比に還元される。この時、Go が存在しなければ(全てサイクリングしている場合は) [1] 式から、Go が存在する場合は [2] 式から、細胞周期時間が導き出される。

Weinstein の方法

Weinstein は FLM 法 (fraction of labeled mito-

Table 1 正常表皮と乾癬表皮の細胞動態

	Bauer		Weinstein	
	normal	psoriasis	normal	psoriasis
Ntot	100	400	100	225 cells
Ndiff	70	200	39	107 cells
Ngerm	30	200	61	118 cells
	23%		60%	
Ncyc	7	200	37	118 cells
NGo	23	—	24	—
Ts	10	8	14	8.5 h
Tcyc	37	40	311	36 h
Tepid	21	3.5	25	3.2 days
PR	5	120	3	70 cells/day

modified from

Bauer: Textbook of Proriasis 1986

Weinstein et al: J Invest Dermatol 1984; 1985

Bauer と Weinstein のデータを示す¹⁻³⁾。

角層を除く(生きている)正常表皮100個あたりにつき各々換算している。

Weinstein のデータは Bauer の表示に従い、文献1, 2から改編した。

両グループで差があるのは乾癬ではなく正常表皮の Tcyc (細胞周期時間) であることがわかる。

Ntot : total cell number

Ndiff : differentiated cell number

Ngerm : germinative cell number

Ncyc : cycling cell number

NG0 : G0 cell number

Ts : S 期時間

Tcyc : 細胞周期時間

Tepid : 表皮 turnover time

PR : production rate

Ngerm と Ncyc から GF が出てくる。

sis) により Ts として14時間を求め、これと labeling index (2.7%), GF (0.6) から正常表皮の細胞周期311時間を出した。

$$\frac{14}{0.027} \times 0.6 = 311 \dots (\text{Fig. 1 : [2] 式})$$

Bauer の方法

Bauer は flow cytometry を用いて細胞周期時間を算定した^{3, 4)}。flow cytometry においては全細胞数に対する各期の細胞の比率としてデータがで

てくるため式 [3] を用いる。

$$\frac{T_s}{T_c} = \left(\frac{N_s}{N_c} \right) \frac{\frac{N_s}{N_t}}{\frac{N_c}{N_t}} \dots \dots \dots [3]$$

ここで Ns/Nt は flow cytometry で直接出てくるが、Nc/Nt は間接的にしか求められない(後述)。Ts に関しては tape stripping 後、S 期から G 2 期へ動く細胞集団のデータを解析することにより算定される⁴⁾。

Weinstein の方法の問題点 (GF の算定)

Bauer と Weinstein の最大の争点⁵⁾が GF にあることは Table 1 を見ても分かる⁵⁾。GF は通常、持続チミジンラベル法により求められる。これは(細胞周期時間以上の)十分な長さの時間、皮膚を持続的に [³H]—チミジンでラベルし続けるというものである。細胞周期をまわっている細胞は必ず1度はS期を通るはずであるから、この方法により cycling cell が、すなわち GF に属する細胞が全てラベルされることになる。

持続チミジンラベルを実施することは、通常、ヒトでは不可能であるから、Weinstein はヌードマウスに正常ヒト表皮を移植し、次いでマウス腹腔内に

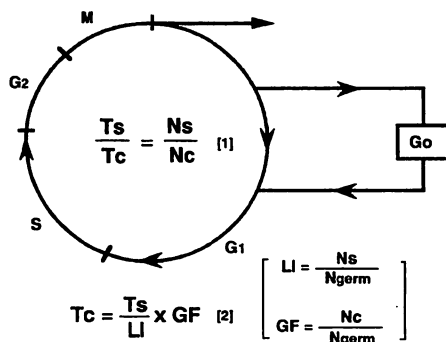


Fig. 1 細胞周期と細胞周期時間

細胞周期はG1, S, G2, M期からなる。細胞集団が一定の時間がかつランダムに細胞周期をまわっているとすると、S期, M期など、各期の所用時間は各々の細胞集団の数の比に還元される(式[1])。細胞周期からはずれて、まわっていない細胞をGoという。Goは増殖刺激により cycling cell 集団に入りこむため増殖プールに含まれる。したがって、増殖プールは cycling cell とGo細胞からなる。増殖プールに占める cycling cell の割合を growth fraction (GF) という。labeling index (LI) は増殖プールに占めるS期細胞の比率である。Tc: 細胞周期時間; Ts: S期時間; Nc: cycling cell の数; Ns: S期細胞の数; Ngerm: 増殖プールの細胞数。Goが存在する場合は、式[1]とLI, GFの定義から、式[2]が導かれる。

[³H]—チミジンを3週間にわたり持続注入し、GFとして約90%という値を得た。これが *in vivo* の状態を反映しているかどうかは、当然、問題となるため、Weinstein は(1例報告ではあるが)、ヒトに持続ラベルを実施した Gelfant のデータ(60%)を適用した^{1, 6)}。言いかえるとGFは低く見積もっても60%以上はあるという考え方である。しかしながら、Gelfant のデータを含め、持続ラベル法では、原理的にGFが高めに見積もられてしまうという本質的な問題がある。Fig. 1でGoはサイクリング集団に含まれていないが、これが持続ラベルの期間を通じGoのままであり続けるかどうかは、保証されていない。もしS期でラベルされた後、Goプールに入りこむ細胞集団があるとGFは過大に評価されてしまうことになる。

Bauer の方法の問題点

Flow cytometry のデータは常に全細胞数との比としてあらわれる。したがって、flow cytometer に入れる前に、全細胞数を正確にとらえたかどうかはまず問題となる。

また全細胞数との比としてのデータであるため、増殖プールが分化細胞集団と混在している表皮はflowによる解析には、本来、あまり向いていない。具体的にはDNAヒストグラムにおいてG0/G1ピーク(この中に分化表皮細胞が含まれる)が圧倒的に多くなり、S期, G2/M期のデータが相対的に不正確になる。

解析法にも問題がある。Flow cytometry においてS期細胞の定義が実は確定していない。同一のデータを用いても解析の方法が異なると、各期の比率がかなり変動することは重要な事実であるが⁷⁾、あまり認識されていない。

しかしながら、Bauer の解析において最も問題となるのは式[3]のNc/Ntである。Cycling cell の細胞数を出すにあたって、Bauer は全細胞数から、表皮細胞以外の vimentin 陽性細胞, K10陽性の分化細胞、さらにGo細胞を引いた^{4, 8)}。これは明らかに誤差の出やすい方法である。特にK10陽性で

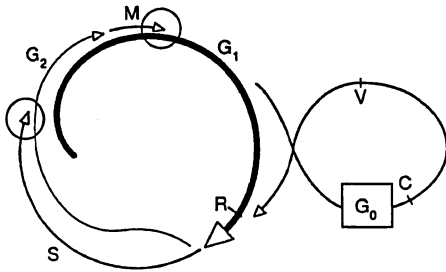


Fig. 2 Pardeeの細胞周期¹¹⁾

左側のいわゆる細胞周期はG1期、G2期が他の期と重なりあうことにより、かなり変動する。たとえば、場合によっては、見かけ上、G1、G2期が存在せず、S期とM期しかないような細胞も出現しえる。ただしS期とM期は重ならないことに注目。R: restriction point. 酵母では start がこれにあたる。C: competence point, V: progression point. CもVもGo 集団が細胞周期に入りこむ過程で定義される制御点。

あっても表皮細胞は分裂することが示されており⁹⁾, Bauerの方法では cycling cellの細胞数が過小に評価されてしまう。したがって Bauerの細胞周期時間は実際より短く算定されていることになる。

細胞周期において、通常、S、G2、M期時間には細胞間で大きな差はなく、変動があるのは主にG1期であり、それも2倍程度の開きに過ぎないということになっている¹⁰⁾。このことと持続チミジンラベル法の持つ本質的な欠陥を考えると、正常表皮の細胞周期時間は Weinsteinのものより相当短いことが予測される。一方、Bauerのデータもいくつかの問題点を有しており、単純に Bauerの数値を適用することは、あまりすすめられない。

Pardeeの細胞周期

Fig. 2にPardeeの細胞周期を示す¹¹⁾。

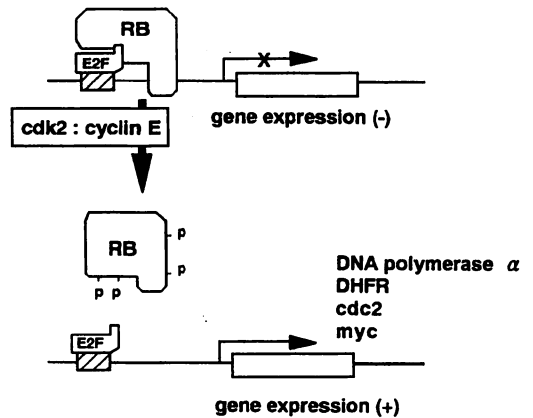


Fig. 3 Rb-E2F 制御系とサイクリン^{12~16)}

低リン酸化状態の Rb は E2F と結合し、遺伝子発現を抑えている。リン酸化された Rb は E2F から解離し、E2F 依存性の遺伝子発現がひきおこされる。Rb をリン酸化するキナーゼの実体は不明であったが、サイクリン E: cdk2 ないし、サイクリン D: cdk4 (あるいは cdk6) 複合体が考えられている。E2F 依存性の遺伝子として DNA polymerase α , dihydrofolate reductase, cdc2, c-myc など、S 期、M 期の進行に関与する一群の遺伝子があげられる。

cdk: cyclin-dependent kinase

Fig. 1 に示した古典的な細胞周期とは相当異なった印象を与える。ここでR点を restriction point とよび、この点を超えると細胞は自動的にS期を経て分裂に向かう。R点を越えられなかった細胞はGoに入るものと考えられている。

Pardeeの細胞周期を見るとG1、G2期の作業が他の期と重なりあっている。いいかえると、G1、G2で行われる作業は、他の細胞周期の時間にはいりこむことが可能であり、したがって細胞周期時間は、それ自身、変動の可能性を内在している。PardeeのFig.は細胞周期時間というパラメーターが必ずしも固定された数値ではなく、本質的に変数として取り扱うべき概念であることを示している。

R点の意味するもの

G1期には細胞周期の制御において最も重要なR

点が存在する。従来から、G1期の進行については、一定の連鎖反応系列の時間と考えるより、ものの蓄積に要する時間という見方が強い¹⁰⁾。すなわちR点に向けて何らかのタンパクが蓄積され、これがG1からS期への移行に重要な意味をもつと考えられてきた。

このタンパクの実体は長く不明であったが、近年、サイクリンE (あるいはサイクリンD) が注目されている (Fig. 3)¹²⁻¹⁵⁾。サイクリンEは cdk2 とサイクリンDは cdk4 (あるいは cdk6) とペアになり、protein kinase 活性を示す。これらサイクリン-cdk 複合体が Rb をリン酸化することにより E2F 依存性の遺伝子発現を介して細胞周期のS期への移行に関与するという考え方である (Fig. 3 参照)¹⁶⁾。

現在、G1期のR点に向けての作業の本質はサイクリンE (ないしD) の蓄積と考えられており、この方向で多くの研究が進められている。

おわりに

表皮における細胞周期時間の問題点は乾癬よりもむしろ正常表皮部分にある。乾癬表皮の細胞周期時間はおそらく正常表皮とあまり大きな差はないものと思われる。その意味では、GFの増大という Bauer の概念が、乾癬の細胞動態を、より正確に反映しているものと推定される。しかしながら、Bauer の値にもいくつかの問題点があることは銘記すべきである。

G1サイクリン-Rb キナーゼ系の発見は、Rb のリン酸化を中継点とする E2F 依存性遺伝子発現の制御機構の解明につながった。ブラックボックスであった細胞周期のG1制御ポイント (Pardee のR点) は分子レベルで急速に実体化しつつある。

一方、Fig. 2 に示した Pardee の細胞周期は、細胞周期時間を固定化して捉えようという従来のアプローチに警告を与えるものである。細胞周期時間は変動の可能性を内在しており、本質的に幅を持ったパラメーターとして認識されるべきである。

細胞周期時間とは、本来、多数からなる細胞集団の増殖を定量化しようとする過程でできた概念であ

る。言いかえると、増殖しつつある細胞集団の、ある定点における指標の1つにすぎない。このことを、今一度認識して、新しい目で細胞周期を見直す必要があるだろう。

文 献

- Weinstein GD, McCullough JL, Ross PA: Cell proliferation in normal epidermis, *J Invest Dermatol*, 82: 623-628, 1984
- Weinstein GD, McCullough JL, Ross PA: Cell kinetic basis for pathophysiology of psoriasis, *J Invest Dermatol*, 85: 579-583, 1985
- Bauer FW: Cell kinetics, in *Textbook of Psoriasis*; edited by PD Mier & van de Kerkhof PCM, Churchill Livingstone Press, 1986
- Boezeman JBM, Bauer FW, deGroot RM: Flow cytometric analysis of the recruitment of Go cells in human epidermis in vivo following tape stripping, *Cell Tissue Kinet*, 20: 99-107, 1987
- Bauer FW, Boezeman JBM: Cell proliferation in normal and psoriatic epidermis, *J Invest Dermatol*, 87: 678-679, 1986
- Gelfant S: On the existence of non-cycling germinative cells in human epidermis in vivo and cell cycle aspects of psoriasis, *Cell Tissue Kinet*, 15: 393-397, 1982
- Baisch H, Beck H-P, Christensen IJ, Hartman NR, Fried J, Dean PN, Gray WJ, Jett JH, Johnson DA, White RA, Nicolini C, Zeitz S, Watson JV: A comparison of mathematical methods for the analysis of DNA histograms obtained by flow cytometry, *Cell Tissue Kinet*, 15: 235-249, 1982
- Bauer FW, Boezeman JBM, van Engelen L, deGroot RM, Ramaekers FCS: Monoclonal antibodies for epidermal population analysis, *J Invest Dermatol* 87: 72-75, 1986
- Regnier M, Vaigot P, Darmon M, Prunieras M: Onset of epidermal differentiation in rapidly proliferating basal keratinocytes, *J Invest Dermatol*, 87: 472-476, 1986
- 井出利憲: 細胞周期の遺伝的制御, 蛋白質核酸酵素, 34: 1097-1107, 1989
- Pardee AB: G1 events and regulation of cell pro-

- liferation, *Science*, 246: 603–608, 1989
12. 北村憲司, 下田 親: 細胞周期とG1サイクリン, 蛋白質核酸酵素, 39: 170–175, 1994
 13. Matsushime H, Ewin ME, Strom DK, Kato J, Hanks SK, Roussel MF, Sherr CJ: Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34^{PSK-13}/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins, *Cell*, 71: 323–334, 1992
 14. Ewin ME, Sluss HK, Sherr CJ, Matsushime H, Kato J, Livingston DM: Functional interactions of the retinoblastoma protein with mammalian D-type cyclins, *Cell*, 73: 487–497, 1993
 15. Ohtsubo M, Roberts JM: Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts, *Science*, 259: 1908–1912, 1993
 16. La Thang NB: DRFT/E2F; an expanding family of heterodimeric transcription factors implicated in cell-cycle control, *Trends Biochem Sci*, 19: 108–114, 1994