

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 古山 昭子

基底膜は、上皮細胞の直下に存在する薄く連続したシート状の細胞外マトリックス構造体である。基底膜構成分子が相互に結合して固相化した、難溶性の生体高分子複合体である基底膜は、上皮細胞の構造的な足場となり、細胞の極性や機能の発現に影響を与える。主要基底膜構成分子の欠損や異常は致死であったり、重度の疾病を引き起こすことが明らかになっている。また、炎症や線維化に伴って観察される基底膜構造の異常は、上皮細胞の増殖・分化や形質発現が正常に維持されないことと関連していると考えられている。このように、基底膜が多細胞生物における生命現象に重要な役割を有することに疑いの余地はない。基底膜構成分子の生化学的および細胞生物学的解析の研究は著しい進展を遂げた。しかし、それぞれの基底膜構成分子が相互に集積し基底膜として形成される過程、あるいはその機構(過程に関与する機能分子など)は殆ど解明されていない。また、マトリジェルと呼ばれる基底膜成分が混在した基質を用いることにより、さまざまな培養細胞の増殖・機能に基底膜成分あるいはその組み合わせが有効との研究がなされてきたものの、シート状の構造体としての基底膜が有する細胞機能への影響等、基底膜の機能についての解明はないと言っても過言でない。そこで、論文提出者は *in vitro* で基底膜構造体の構築を目指した。基底膜が構築できるならば、細胞外環境と細胞との間の相互作用の解析が容易となると考えたからである。基底膜形成に上皮・間葉相互作用が重要との観点から、肺胞上皮細胞と肺線維芽細胞とを共培養したところ、*in vivo* と同様な基底膜構造体が形成された。肺線維芽細胞から基底膜構成分子が分泌されることにより、肺胞上皮細胞の直下に基底膜が形成されるとの結論を得た。

得られた研究成果の概要は次の通りである。肺から調製した初代培養肺胞Ⅱ型上皮細胞は、肺線維芽細胞が混入している可能性があり、肺線維芽細胞に由来する基底膜構成分子やサイトカイン、酵素類の影響を排除できないことを考慮し、肺胞Ⅱ型上皮細胞を SV40-T2 により不死化した細胞を用いた。肺胞上皮細胞単独の培養では基底膜は形成されないが、基底膜構成分子の主要なものは分泌されていた。肺線維芽細胞を包埋したⅠ型コラーゲンゲル上で、肺胞上皮細胞を培養することにより、連続した構造体としての基底膜が形成された。*in vitro* で形成された基底膜は、1) 上皮細胞直下に細く連続したラミナデンサ様構造体が観察され、2) 主要基底膜構成分子がこのラミナデンサ様構造体上に局在する点において、*in vivo* で観察される基底膜と同様な構造体であった。このようにして、肺胞上皮細胞の基底膜形成に対する肺線維芽細胞の寄与により、再現性高く基底膜を形成させる方法を確立できた。

次に、線維芽細胞が肺胞上皮細胞による基底膜形成を促進する因子は線維芽細胞による基底膜構成分子の分泌による可能性をテストするために、肺胞上皮細胞の培養液に基底膜構成分子は添加したところ、ラミニン、エンタクチン、IV型コラーゲンなどが、肺胞上皮細胞の基底膜に組み込まれて、これらの成分の濃度が高いほど、基底膜構造体の形成を促進することが明らかになった。基底膜構成分子は、すでに存在する基底膜構造体上には非共有結合性の分子間相互作用により沈着した。しかし、連続した構造体として基底膜が形成されるためには肺胞上皮細胞が必要であった。また、線維芽細胞由来のサイトカインである transforming growth factor (TGF)- β 1を 1.0 ng/ml 添加することにより、シート状の基底膜構造体が形成された。このとき、TGF- β 1の刺激で、肺胞上皮細胞からの基底膜構成分子の産生・分泌が亢進しており、それが原因と考えられる。さらに高い濃度の 5.0 ng/ml TGF- β 1では、基底膜構成分子の産生・分泌は亢進されるにもかかわらず、基底膜は形成されなかった。分解作用については変化がないが、フィブロネクチンあるいはI型コラーゲンなど非基底膜成分の細胞外マトリックス成分が細胞直下への沈着増加していた。非基底膜成分の沈着上昇が障害となって、基底膜構成分子の沈着が阻害されたためと示唆される。再構成I型コラーゲンゲルの影響、肺線維芽細胞による TGF- β 1分泌および肺線維芽細胞から分泌される基底膜構成分子の同定などを行った。肺胞上皮細胞と肺線維芽細胞の共培養系において、基底膜形成が促進されるのに最も貢献するのは、基底膜構成分子の分泌であるとの結論が示された。一方、初代培養肺胞II型上皮細胞を用いての追試でも同様の結果であった。

肺胞上皮細胞の基底膜形成は基底膜構成分子の供給量だけでなく、間質性細胞外マトリックスの上皮細胞直下への固相化によって不完全となる可能性が示唆された。このような意味では、本培養系は、肺胞上皮組織の傷害からの再生や線維化に陥ることによる傷害の後遺症を再現していることとらえることもできる。基底膜構成分子の上皮細胞直下への集積に関与する機能分子やそれらの発現に影響を与えるサイトカイン等を解明し、詳細な基底膜構造体の形成機構についての研究が可能となった。さらに、*in vivo* とほぼ同様な形態的特徴を持った基底膜が *in vitro* で形成されたことで、基底膜研究に様々な展開が可能となると思われる。例えば、基底膜形成の制御機構を利用して設計・作製した、組織特異的あるいは異常・人工的な基底膜構造体を細胞培養の基質に利用して、基底膜の機能や構造体中の基底膜構成分子からの細胞内シグナル伝達を解析すること、さらに生化学的解析に供することが考えられる。また、致死的な細胞外マトリックス遺伝子欠損や変異を持つ細胞についても、細胞培養系で基底膜構造体への影響を解析することも可能であろう。以上の論文の内容の一部は共同研究として公表されているが、申請者の貢献度が最も高い。これらの内容について審査委員会で評価した結果、審査委員全員一致して、申請者論文は博士(学術)の学位にふさわしいと結論した。