

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

Studies on signal transduction and cytoskeletal organization after adhesion to extracellular matrices  
(細胞外マトリックスへの接着におけるシグナル伝達と細胞骨格形成に関する研究)

氏名 佐藤 (楠畑) かおり

細胞は様々な細胞外マトリックスに三次元的に囲まれた状態で存在し、常に細胞外環境に影響され、またそれを作り変えている。皮膚基底膜の主要な細胞外マトリックスにラミニン5がある。皮膚常在性のTリンパ球は、細胞表面レセプターであるインテグリン $\alpha3\beta1$  を発現し、皮膚移植の際の拒絶反応に関わることが報告されている。しかし、その発症過程におけるTリンパ球の役割については不明な点が多い。そこで、インテグリン $\alpha3$  を遺伝子導入したTリンパ球 (Jurkat, J5) を作成し、ラミニン5が沈着した培養皿に接着させる培養系を確立し、細胞活性化について検討した。その結果、インテグリン $\alpha3\beta1$  の発現量が増加するにつれて、ラミニン5への接着率、様々な細胞内タンパク質のチロシンリン酸化、チロシンキナーゼの Lck, Fyn, ZAP-70 の活性化がその接着初期に増強された。また、接着後、T細胞抗原刺激を惹起するモノクローナル抗体 OKT3 を添加すると、20-24 時間後では、Tリンパ球の活性化の指標であるインターロイキン2 (IL-2)の分泌の5倍の増強が検出され、また 20 時間後では、 $47.9 \pm 5.0\%$ の細胞で細胞死が誘導された。細胞周期解析の結果、これは S, G2, M 期依存的なアポトーシスであった。この細胞活性化とアポトーシスは、インテグリン $\alpha3\beta1$  の発現の少ない Jurkat 細胞では誘導されなかったことから、インテグリン $\alpha3\beta1$  高発現株 (J5) では、ラミニン5への接着によってT細胞抗原刺激が増強され、活性化誘導型細胞死 (Activation-induced cell death) が引き起こされた可能性が示唆された (第1章)。

皮膚真皮に多量に存在する細胞外マトリックスである I 型コラーゲンは、皮膚より酢酸を用い

て抽出し、精製後、試験管内でコラーゲン線維を再構成させることができる。動物の年齢が高くなるにつれて、コラーゲン分子間の架橋が増加するため、コラーゲンの抽出率は低下することが知られている。実際、酢酸抽出法及びペプシン抽出法では老齢ウシ皮膚からの抽出はほとんど不可能であったが、コウジカビ由来プロテアーゼであるプロクターゼを用いた抽出では、約 50%の抽出率を得た。そこで、用いるプロテアーゼにより抽出率が異なる理由について検討した（第 2 章）。酢酸抽出法で得た I 型コラーゲンをペプシン、パパイン、プロクターゼで処理を行い、アミノ酸シークエンサーで切断部位を同定した。その結果、アミノテロペプチド領域（3 重らせん領域のアミノ末端に存在する非らせん領域）の切断部位が異なっていた。このことから、アミノテロペプチド間の架橋を含むペプチドが除去されたために抽出率が異なったことが判明した。さらに、これらのプロテアーゼ処理したコラーゲンをを用いた研究から、アミノテロペプチドの N 末端領域は線維形成の促進する機能、C 末端領域では熱安定性を高める役割があることが判明した。また、両領域の欠損に伴い、形成するコラーゲン線維が太くなり、またねじれが生じ、異常な線維を形成することが明らかとなった。

次に、若年及び老齢のウシ皮膚よりプロクターゼを用いて抽出した I 型コラーゲンを精製し、線維形成させて、線維の違いを観察したところ、線維の太さは若年由来の方が太く、老齢由来では細く、ねじれの程度が高くなることを観察した。また、これらのコラーゲンへヒト皮膚由来線維芽細胞を接着させ、コラーゲンの老化を細胞が識別するかについて検討した（第 3 章）。細胞は、プラスチック培養皿に精製したコラーゲン単分子をコーティングした上、または、コラーゲン再構成線維の中または上で培養を行った。線維芽細胞は、このコラーゲン単分子上では、若年及び老齢ウシ由来のコラーゲンを区別せず同等に接着し、伸展した（図 1 上）。しかし、コラーゲン線維内培養では、線維芽細胞は異なる形態を形成した。若年ウシ由来のコラーゲン線維内では、細胞は長い突起を多数伸長した樹状細胞様の形態となり、細胞間のネットワークを形成した（図 1 左下）。老齢ウシ由来のコラーゲン線維内では、このような突起形成及びネットワーク形成は非常に弱く（図 1 右下）、また、コラーゲン線維内への細胞の浸潤が観察された。コラーゲン線維上での培養では、コラーゲンレセプターであるインテグリン  $\alpha 2 \beta 1$  の発現が誘導されることが知られているが、老齢ウシ由来のコラーゲン線維上では、この誘導が著しく弱かった。これらのことから、細胞は、コラーゲンが単分子の場合には区別しないが、線維の場合にはコラーゲンの高次構造の違いを識別し、異なる細胞応答をすることが明らかとなった。

一方、コラーゲン単分子上では、細胞は葉状仮足を形成し、伸展したが、線維内では、樹状細胞様の形態を形成し、これらの形態は大きく異なった（図 1, 第 4 章）。細胞表面のコラーゲンレセプターであるインテグリンを介してコラーゲン単分子および線維へ接着することが知られているが、このような形態の差異が生じる原因については明らかではない。そこで、コラーゲン単分子および線維上へ接着した線維芽細胞のインテグリンを介したシグナル伝達および細胞骨格形

成の相違について検討した（第4章）。アクチン、チューブリン骨格を特異抗体を用いて蛍光染色し、間接蛍光顕微鏡で観察した結果、単分子コラーゲン上への接着で形成される葉状仮足にはアクチン骨格のみが観察されたが（図2A）、線維上での樹状細胞様の突起の場合、アクチン、チューブリン骨格が突起の末端まで伸長していることが観察された（図2B）。また、アクチン重合阻害剤のサイトカラシンDや、チューブリン重合阻害剤のノコダゾールにより、これらの細胞伸展は培養90分後では阻害された。しかし、培養17時間後には、コラーゲン単分子上への接着後、サイトカラシンD存在下では、樹状細胞様の突起が形成され（図2C）、ノコダゾール存在下では葉状仮足形成は阻害されなかったが、紡錘形の細胞伸展の阻害が観察された（図2E）。また、コラーゲン線維上への接着後、サイトカラシンD存在下では樹状細胞様の突起形成は阻害されなかったが（図2D）、ノコダゾール存在下では、チューブリン骨格の形成のみならず、アクチン骨格の形成までもが阻害されており、樹状細胞様の突起形成は全く観察されなかった（図2F）。このことは、コラーゲン単分子上への接着における細胞伸展ではアクチン骨格が先導的であり、一方、コラーゲン線維上への接着における突起形成ではチューブリン骨格が先導的であることを意味し、細胞骨格形成機構に相違があることが明らかとなった。次に、インテグリン結合後の主要なシグナル伝達分子である Focal adhesion kinase (FAK)、p130<sup>CAS</sup> (CAS) の活性化について、チロシンリン酸化を指標として検討した。その結果、FAK の活性化はコラーゲン単分子、線維上のどちらへの接着においても同等に活性化したが、CAS の活性化は、FAK と異なり、線維上への接着の方が2倍強く検出された。また、低分子量Gタンパク質の Rho ファミリーの Cdc42 が、コラーゲン線維上への接着において顕著に活性化された。一方、コラーゲン線維の上に細胞を接着させると、テーリンやフォドリンなどの細胞骨格関連分子は接着早期に分解された（第5章）。また、この分解と同時に、細胞内プロテアーゼである m-カルパインの活性化がコラーゲン線維への接着に伴い検出された。このタンパク質分解は、カルパイン阻害剤のみでは阻止できなかったことから、複数の細胞内プロテアーゼが関わりと考えられる。しかし、樹状細胞様の突起形成は、カルパイン阻害剤で顕著に抑制されたことから、この突起形成にはカルパインの活性化が必須であることが示唆された。また、Cdc42 の活性化がカルパイン阻害剤で顕著に抑制されたことから、カルパインは Cdc42 の上流でその活性化を調節していることが示唆された。カルパインが樹状細胞様の突起形成に関わる詳細な機構については不明であるが、カルパインによる Cdc42 の活性化、またはカルパインによるフォドリン、テーリンなどのタンパク質分解などによって、突起形成に関わるシグナル伝達分子が活性化されることが考えられる。以上の結果から、コラーゲンの分子集合状態によって、細胞は、異なるシグナル伝達、骨格形成をすることが明らかとなった。

さらに、コラーゲン線維に細胞が接着した場合、細胞はインテグリンやアクチンを用いて線維の濃度や硬さを識別し、異なる応答をすることが示唆された。これらの結果から、細胞外環境と

してのコラーゲンを変化させることにより、異なる細胞応答を導き出すことが可能となると思われる。例えば、I型コラーゲンを線維状態で用いると、細胞増殖が抑えられるが、組織の再構築に関する細胞応答であるコラーゲンゲル収縮やコラーゲナーゼの発現は起こる。単分子コラーゲンを用いると、細胞が強く接着するため、細胞遊走は抑えられるが、細胞増殖は高められる。さらに、カルパイン阻害剤を用いて、細胞骨格形成の調節が可能である。これらの併用によって、様々な細胞応答（増殖、遊走、形態形成や分化促進など）を調節できる可能性が考えられ、組織の再生や治療へのこれらの応用が将来的に可能になると考えられる。その一端を担うラミニン5及びコラーゲンの細胞に与える影響についての本研究での研究成果は意義あるものと思われる。

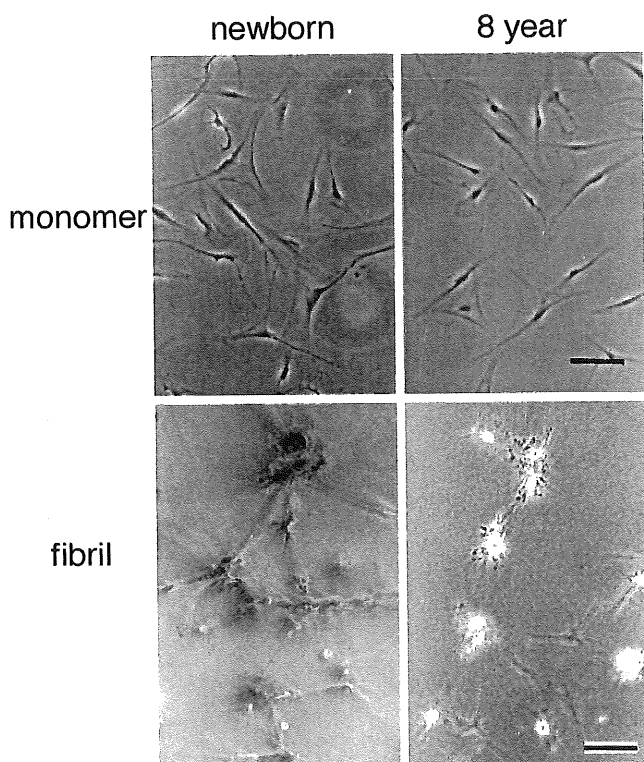


図1 若年及び老齢ウシ由来のコラーゲン単分子上(monomer)または線維内(fibril)で培養した線維芽細胞の形態 Bar, 100  $\mu\text{m}$ .

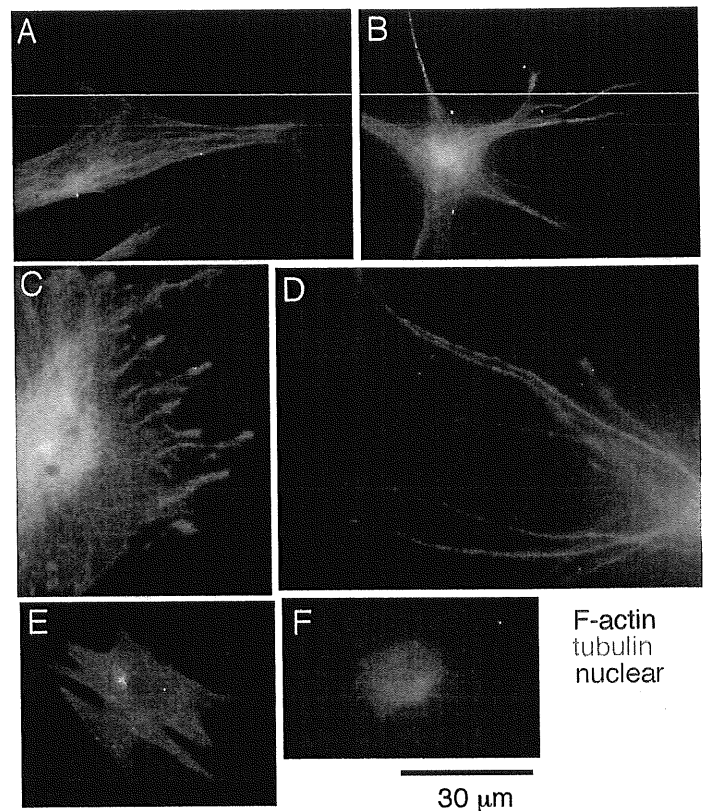


図2 コラーゲン単分子上または線維上へ接着した細胞のアクチン(赤)、チューブリン(緑)、核(青)の蛍光染色像 A-Fの説明については本文参照。