

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 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する。細胞の増殖、分化、遺伝子発現、運動、遊走など細胞の基本的な機能は細胞が何に接着しているかなど細胞外環境との相互作用に依存している。一方、細胞は細胞外マトリックス成分の合成、分解、細胞外マトリックスの構築の再編成などを通じて細胞外マトリックス環境を作り変えている。佐藤（楠畑）かおり氏は「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」と題した研究課題を通して、このような細胞と細胞外マトリックスの相互作用についての分子機構の解明を目指した。

論文の概略を以下に説明する。第一章では皮膚基底膜の主要な細胞外マトリックスである、ラミニン5に着目した。皮膚常在性のTリンパ球のインテグリン $\alpha3\beta1$ は、皮膚移植時の拒絶反応に関わることが報告されている。インテグリン $\alpha3$ を遺伝子導入したTリンパ球を作成して、ラミニン5による細胞活性化について検討した。インテグリン $\alpha3\beta1$ の発現量の増加が、ラミニン5への接着、細胞内タンパク質のチロシンリン酸化をはじめT細胞活性化シグナルを増強することを見いだした。ラミニン5への接着はT細胞抗原刺激による細胞死を誘導することを見いだした。T細胞の活性化とアポトーシスは、インテグリン $\alpha3\beta1$ の発現の少ない細胞では誘導されなかった。ラミニン5が免疫細胞の活性化・細胞死を誘導するような影響を及ぼすことから、一般に細胞外マトリックスが生体防御系を介した生体恒常性維持にも直接関わっていることを推測させるものである。

第二章においては、皮膚真皮に多量に存在するI型コラーゲンと線維芽細胞の相互作用に着目した。I型コラーゲンは実質上不溶性であるため、コラーゲンの抽出にはさまざまなプロテアーゼが用いられている。中でもプロクターゼを用いた抽出が最も効率が高い。その理由の解明のために、酢酸抽出したI型コラーゲンをペプシン、パパイン、プロクターゼ処理し、切断部位を同定し、アミノテロペプチド間の架橋を含むペプチドの除去が抽出率に関係することを直接示した。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、C末端領域は熱安定性に関係しているとの知見を得た。両領域の欠損部位が深いほど、分子から形成される線維は径が太く、またねじれたものとなる。分子間の相互作用にテロペプチドが関与することを、精査に示すことに成功した。

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見いだした。培養ヒト皮膚由来線維芽細胞に対するこれらのコラーゲンの影響の違いを検討した（第3章）。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。再構成コラーゲン線維を用いた培養では、由来するウシの年齢により、線維芽細胞は異なる形態を示した。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 $\alpha 2\beta 1$ 発現の誘導が老齢ウシ由来のコラーゲン線維上では著しく弱かった。線維芽細胞は、コラーゲン線維構造の違いを認識していると結論できた。

線維芽細胞の形態は、コラーゲン単分子上と線維上とは著しく異なる。分子上では細胞は葉状仮足を形成し、伸展し、線維内では、樹状細胞様の形態を形成する。この機構に迫るべき細胞骨格の動態を検討した（第4章）。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、線維上での樹状細胞様の突起の場合、アクチン、チューブリンの両方の骨格が存在した。アクチン重合阻害剤のサイトカラシンDおよびチューブリン重合阻害剤のノコダゾールを用いて、細胞伸展に対する影響を検討し、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との結論を得た。コラーゲン分子と線維の認識の違いが細胞骨格形成機構に及ぶと考えられた。

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^{CAS} (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。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 の活性化は線維上への接着の方が2倍高かった。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、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）。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。樹状細胞様の突起形成および Cdc42 の活性化は、カルパイン阻害剤で顕著に抑制された。カルパインによる Cdc42 の活性化、フォドリン、テーリンなどのタンパク質分解などを介して、突起形成が生じる機構が考えられた。

I型コラーゲンの会合体状態によって、細胞増殖、細胞外マトリックスの再構築に関わる細胞挙動（細胞遊走、線維の濃縮、分解酵素の発現が異なる。細胞外から、カルパインの活性制御（阻害剤など）により、細胞形態、シグナル伝達の調節ができる可能性がある。細胞外環境の変化により、細胞の増殖、遊走、形態形成、分化促進などの調節が可能であることは、組織の再生や治療への応用へと近い将来展開されることが期待される。

以上のように本研究は細胞と細胞外マトリックスとの相互作用について新規の機構を見だし、今後のこの分野の発展の新しい基盤とも言える内容を有するものであり、学位に相応しい成果であると、審査委員会は認定した。本論文の各章の研究のそれぞれは他の研究者との共同であるが、申請者の貢献度が最も高いと評価される。佐藤(楠畑)かおり氏の申請した学位論文について審査委員による評価の投票を行い、合格とされた。したがって、本審査委員会は博士(学術)の学位を授与するにふさわしいものと認定する。