

論文の内容の要旨

論文題目 コラーゲン線維会合体の修飾による線維芽細胞との相互作用への影響

氏 名 坪 信子

細胞外マトリックス (ECM) は細胞の環境として、細胞の形態、代謝、増殖、分化、移動などの様々な細胞の活動に大きな影響を与える多細胞系の構成、維持に不可欠の要素である。ECMの主要な構成成分にコラーゲンスーパーファミリーがあり、その中でもI型コラーゲンは量的に最も多く、結合組織の力学的骨格を構築している。I型コラーゲンは線維芽細胞により合成され、細胞外へ分泌された分子と分子が重合して線維を形成し、多数の線維らなる線維会合体として存在し、機能している。よって、会合体を形成している線維、線維を構成している分子の状態が何らかの要因により変化することが、線維としての構造さらには機能へいかに影響を及ぼすかについて理解することは発生、老化、恒常性維持など生体内の現象を理解する上で必須なことである。しかし、分子が重合した線維の機能解析はもとより、多数の線維が絡み合った線維会合体の機能解析は様々な要因が複雑に作用し合うためにはるかに困難である。本研究では、いくつかの限定した因子の挙動を検討できるシンプルで扱いやすい系である *in vitro* 系にて再構成したI型コラーゲングル (コラーゲン線維) 系を用いて、グルコースとのインキュベーション、XII型あるいはXIV型コラーゲンのNC-3ドメインの添加及びコラーゲン濃度変化により線維状態を変化させることにて、I型コラーゲン線維が細胞の機能に及ぼす影響がどのように変わるかを検討し、コラーゲン線維と細胞の相互作用の特徴を理解することを目的とした。

生体内で比較的長期に存在する蛋白質の一つがI型コラーゲンであるため糖化によるコラーゲンの化学構造及び生化学的性質の変化については古くより記載されているが、コラ

ーゲン蛋白質が有する細胞活性へ糖化が及ぼす影響、I型コラーゲン線維の糖化による構造変化が生理機能、特に細胞活性へ及ぼす影響については知見が限られている。そこで、再構成した I 型コラーゲン線維をグルコースとインキュベーションすることにより糖化し、糖化後のコラーゲン線維の構造変化とそれが細胞活性へ及ぼす影響について検討した。グルコースとのインキュベーションにより、コラーゲンのリジン、アルギニン残基の減少、酢酸への溶解性の低下、ペプシンによる分解性の低下、CNBr 分解後のペプチド断片の高分子量化が認められた。これらのことは、アミノ酸側鎖の修飾とともにコラーゲン分子のポリペプチド鎖間に架橋が形成されたことを示していた。グルコースとのインキュベーションにより、コラーゲングル上での線維芽細胞の接着活性は変化せず、細胞伸展は抑制、増殖活性は促進されたもののその程度は低いものであった。一方、コラーゲングル内への遊走活性は顕著に抑制された。コラーゲングル内への細胞遊走過程において、細胞形態変化や動きの変化と同時にコラーゲン線維を細胞周辺へ蓄積しようとする動きが結果として細胞遊走として現れたと考えることができ、コラーゲン線維と細胞の結合、コラーゲングルの可塑性、及び、コラーゲン線維間相互作用が大きく寄与することになる。コラーゲン線維会合体の糖化による細胞遊走活性の抑制は、細胞の I 型コラーゲン線維への結合が糖修飾により低下したこと（アルギニン残基の減少により、コラーゲンと細胞の結合部位であるアルギニン-グリシン-アスパラギン酸配列が減少したこと）、コラーゲン分子間の架橋形成によりコラーゲン線維の形状の可塑性が抑えられたこと、及び、コラーゲン線維間の相互作用が増したことが原因と推定される。

FACIT (fibril-associated collagens with interrupted triple helices) ファミリーに属する XII 型コラーゲンと XIV 型コラーゲンは、皮膚、血管壁、腱及び靭帯などの I 型コラーゲンからなる結合組織に分布し、コラーゲン線維とその線維表面にて相互作用するが、両コラーゲンの特異的な機能については明らかにされていない。両コラーゲンの NC-3 ドメイン (XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3) は I 型コラーゲン線維と結合せずに線維上で何らかの生理的な機能を示すドメインであると考えられている。そこで、XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 存在下にて I 型コラーゲン線維を再構成し、XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 との相互作用による I 型コラーゲン線維状態の変化が細胞へ及ぼす影響について検討した。XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 は、線維芽細胞の接着活性や増殖活性には影響を及ぼさない一方、遊走活性を顕著に抑制した。両コラーゲンの NC-3 ドメインの熱処理や特異的認識ポリクローナル抗体の添加により、この細胞遊走抑制作用が消失した。XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 は、コラーゲングルの可塑性を増加することからコラーゲン線維とイオン結合あるいは疎水結合等にて線維表面に相互作用し、溶媒中での 1 本のコラーゲン線維の可動性を促進する、コラーゲン線維間の相互作用、摩擦を減少させることによりコラーゲン線維会合体であるゲルの可動性を促進すると考えられる。コラーゲン線維会合体への XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 添加による細胞遊走活性の抑制は、コラーゲン線維表面状態の変化によりコラーゲン線維の形状の可塑性が増加したこと、及び、コラーゲン線維間の相互作用が

減少したことが原因と考えられる。さらにコラーゲン線維会合体の糖化による細胞遊走活性の抑制と考え合わせると細胞が遊走するためには至適なコラーゲン線維の形状の可塑性、及び、至適なコラーゲン線維間の相互作用があることが示唆される。

コラーゲングル内への細胞遊走は、コラーゲン濃度変化により変動し、細胞遊走至適コラーゲン濃度 (2 mg/ml) が存在することが明らかにされている。想定されているメカニズムによると細胞遊走至適濃度よりも高いコラーゲン濃度ではコラーゲン線維のパッキングの状態が密になるために、低いコラーゲン濃度では細胞の足場の安定性が弱くなるために細胞遊走が抑制される。一方、濃度 1 mg/ml のコラーゲングルの糖化により細胞遊走が抑制されたが、線維のパッキング状態は変動せず、架橋形成によるコラーゲングルの可塑性低下のために細胞の足場としての安定性は増加しており、想定されているメカニズムにての説明が困難であった。そこで、濃度の異なる I 型コラーゲン溶液を調製し、コラーゲン線維を再構成後、I 型コラーゲン線維の濃度変化が細胞遊走へ及ぼす影響について検討した。その結果、遊走活性はコラーゲン濃度 1.6 mg/ml まで濃度依存的に顕著に促進し、1.6~1.8 mg/ml にてある活性レベルを保持していた。細胞遊走至適コラーゲン濃度の存在は明らかではないが、存在するならば、コラーゲン濃度 1 mg/ml は細胞遊走至適コラーゲン濃度よりも低いはずであり、新たに考察する必要を生じた。コラーゲン濃度の変化に伴いコラーゲン線維数が変動するとその影響がコラーゲン線維間相互作用、コラーゲングルの可塑性へと及ぶ。今回検討したコラーゲン濃度範囲 (至適な可塑性やコラーゲン線維間相互作用を示すコラーゲン濃度以下の濃度範囲) では、コラーゲン濃度増加に伴うコラーゲン線維数の増加により細胞の再構成 I 型コラーゲン線維への結合が増加したこと、コラーゲン線維の形状の可塑性が抑制されたこと、及び、I 型コラーゲン線維の有するコラーゲン線維間の相互作用が増加したために細胞遊走が促進されたと推定される。

XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 との相互作用による I 型コラーゲン線維表面の状態変化により、コラーゲン線維間の相互作用とコラーゲン線維の形状の可塑性が変化し、それにより細胞活性へも影響を与えることが推定された。そこで、このことが生体現象へ関与する可能性を示すためにウシ XII 型あるいは XIV 型コラーゲンを特異的に認識する抗体を用いた組織免疫染色法によりウシ真皮と毛包での発現分布について検討した。ウシ胎児真皮では、XII 型コラーゲンが真皮上層に強く発現していたのに対し、XIV 型コラーゲンは真皮下層に発現していた。成牛真皮では、XII 型コラーゲンは真皮乳頭層、特に真皮-表皮接合部直下にて顕著に発現していた。一方、XIV 型コラーゲンは、成牛真皮では発現していなかった。成牛毛包では、両コラーゲンともに結合織鞘周囲に強く発現していたが、毛乳頭では全く発現していなかった。よって、XII 型及び XIV 型コラーゲンは胎児期のような形態形成や器官形成などのダイナミックな変化時において、成牛真皮でもヘアサイクル変動に伴うダイナミックな組織構築変化時に寄与することが示唆された。

本研究では I 型コラーゲン線維と線維芽細胞との相互作用、特にコラーゲングル内への線維芽細胞の遊走活性が I 型コラーゲン線維会合体のコラーゲン濃度変化、糖化反応によ

る架橋形成、XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 による I 型コラーゲン線維表面の状態変化によって制御されることを明らかにした。細胞遊走は細胞運動によりコラーゲン線維を細胞周囲へ蓄積しようとする動きにより生じた現象であると捉えると三つの章にて得られた事象や今まで得られている知見を無理なく説明できること、このメカニズムの想定からコラーゲン線維-細胞間、コラーゲン線維間、及び、コラーゲン線維-シャーレ間の相互作用が重要であること、細胞が遊走するためには至適なコラーゲン線維の形状の可塑性とコラーゲン線維間の相互作用があることを示した。さらに XII 型あるいは XIV 型コラーゲンがウシ皮膚の毛包の結合織鞘部位に強く発現していることを明らかにした。