

## 審査の結果の要旨

論文提出者 氏名 坪 信子

細胞外マトリックス (ECM) は細胞外の環境として、細胞の活動に影響を与え、多細胞系の構成、維持に不可欠の要素である。ECM の主要な成分であるコラーゲンスーパーファミリーのうち、I 型コラーゲンはヒトなど陸上に存在する大きな動物においては、個体および器官の力学的骨格支持組織(結合組織)の主要成分である。単離した I 型コラーゲタンパク質はコラーゲン線維に再構成するとともにゲルになる。コラーゲンゲルを基質として各種の細胞を培養した研究の結果、細胞の増殖・分化など細胞の基本的な性質に根本的な影響を与えることが判明した。コラーゲンゲル内で線維芽細胞を培養するとコラーゲンゲルは収縮する。ゲル収縮に伴ってコラーゲン線維の密度、配向、分布などが変化し、細胞の挙動に影響する。線維芽細胞によるコラーゲンゲルの収縮は生体内での細胞と ECM との相互作用が器官・組織形成、再生などの過程を反映しているとの考えの下に、多くの研究が展開され成功を納めている。本研究はコラーゲン線維と線維芽細胞の相互作用に着目し、糖化などの外的因子による修飾、FACIT(コラーゲン線維上に結合するタンパク質)の存在、再構成する際のコラーゲン濃度により、コラーゲン線維と細胞の相互作用がどのように変化を受けるか検討したものである。以下に本論文の概略を説明する。

第一章は I 型コラーゲン線維の糖化による修飾についての研究である。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と、リジン、アルギニン残基の減少、コラーゲン溶解性の低下、CNBr 分解後のペプチド断片の高分子量化が見られた。コラーゲタンパク質の糖化は分子間に共有結合性の架橋を生成した結果であると推定した。次に再構成コラーゲンゲル上で細胞を培養し、その挙動に対する糖化の影響を検討した。コラーゲン線維は糖化されても、線維芽細胞の接着、伸展、増殖には影響を与えなかった。一方、細胞のコラーゲンゲル内への遊走はコラーゲン線維の糖化により、顕著に抑制された。NaIO<sub>4</sub> を用いてコラーゲン分子間に架橋を形成させた場合も同様の結果(細胞遊走のみの抑制)が得られた。コラーゲンゲル内への細胞遊走の抑制はコラーゲン分子間に架橋が形成されたためと解釈される。

第二章はコラーゲン線維上に結合する XII 型コラーゲンと XIV 型コラーゲン(FACIT)の影響を検討した。それぞれのコラーゲンの NC-3 ドメイン (XII-NC-3、あるいは XIV-NC-3) を I 型コラーゲン溶液に添加して再構成したコラーゲン線維は線維芽細胞の接着活性や増殖活性には

影響しないが、遊走活性は顕著に抑制した。

第三章ではコラーゲン濃度の影響を検討した。ゲル内への細胞遊走はコラーゲン濃度の上昇とともに高くなった。コラーゲンゲル収縮機構モデルの一つに次のようなものがある。コラーゲン線維が細胞に強く接着されたまま、細胞がさまざまな形態変化(運動)をする結果、コラーゲン線維が細胞表面全体に接着して行く。一方、表面に結合したコラーゲン線維が他の線維とからまっているために、結果的にコラーゲン線維は細胞周辺へと集積されるため、細胞間の間隙体積が減少する。このような、細胞とコラーゲン線維の相互作用のモデルを下に、細胞遊走の現象に当てはめて考察した。すなわち、線維芽細胞は I 型コラーゲン線維を細胞周辺へ濃縮しようとするが、コラーゲン線維同士の絡みで、線維が集積されず、逆に、応力により、細胞がコラーゲン線維の方に引っ張られることでゲル内へ遊走する。

第四章では組織免疫染色にてウシ真皮と毛包での XII 型及び XIV 型コラーゲンの分布を検討した。XII 型及び XIV 型コラーゲンは胎児期およびヘアサイクル変動など、ダイナミックな組織構築変化と相関して発現している。胎児期での XII 型及び XIV 型コラーゲンの存在は、細胞遊走を抑制することで、細胞によるコラーゲン産生が局所的に起こり、コラーゲン線維会合体の密度が上げることが示唆される。XII 型及び XIV 型コラーゲンが結合繊維鞘で発現することにより、真皮と毛包間の細胞遊走が抑制され、結合繊維鞘を介してヘアサイクルに伴い毛包が上下動しうようになる。

本研究の成果により、I 型コラーゲン線維の修飾により、線維芽細胞の活性のうち、コラーゲンゲル内への遊走活性のみが顕著な影響を受けることが明らかになった。培養線維芽細胞のゲル内への遊走はコラーゲン濃度増加に伴い顕著に促進される。コラーゲンゲル内への細胞遊走活性に対する影響について、論文提出者は統一的解釈を試みた。すなわち、細胞遊走能は再構成 I 型コラーゲン線維を細胞表面へ集積しようとするポテンシャルによると仮定した。線維を集積しようとする力の応力で、細胞がコラーゲンゲルの中へ移動する。したがって、細胞遊走は I 型コラーゲン線維の次のような性質に依存する。1)コラーゲン線維と細胞の結合力と弾性、2)コラーゲン線維間の相互作用(繊維に引っ張り力がかかると、それと相互作用している線維との結合が強いと一緒に引っ張ろうとする力がかかり、結果として細胞に応力がかかる)、3)コラーゲン線維の可塑性(変形しやすさ)、4)コラーゲン線維と培養皿表面との結合の強度、などである。これらの性質が糖化による分子間架橋形成、FACIT による線維間のすべり易さの変化、コラーゲン濃度により変化する線維の絡み合いを用いて、コラーゲンゲル内への細胞遊走が上下することが説明できる。一方、これらの統一的な解釈を基に、FACIT の組織分布はコラーゲン線維を介する細胞の遊走の調節に関与することであると仮説を立てた。

本研究論文の内容について公開発表を行い、審査した結果、学位に相応しい内容をもった論文であると、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。坏信子氏の申請した学位論文について審査委員による最終評価を投票にて行い、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。