

## 論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 竹村 幸敏

コラーゲンは、哺乳類などでは生体内に最も多量に存在するタンパク質である。細胞外マトリクスの構成要素として、個体・器官・組織・細胞を力学的に支持するばかりでなく、細胞間・組織間の情報伝達を仲介したり、細胞運動の足場として細胞の増殖や分化を調節したりすることで、器官形成やその維持においても重要な役割を果たしている。これまで、コラーゲタンパク質として 27 種類の分子種が報告されており、その中で I, II, III, V, XI 型コラーゲンはコラーゲン線維を形成する。生体内では、これらの複数のコラーゲン分子種の存在比や分子間相互作用に依存して多様な細胞外マトリクス構造がつけられると考えられ、さらにこのことがそれぞれの器官や組織の機能にとって重要であろうと考えられている。しかし、コラーゲン分子種間、さらにコラーゲンと細胞の間に実際にどのような相互作用がはたらき、組織・器官に特徴的な細胞外マトリクス構造が形成されるのかについては、まだ十分に解明されていないのが現状である。本研究は、高い透明性と力学的強度を併せもつ点で特徴的な角膜実質層を材料として用い、1) 均一な太さのコラーゲン線維が形成される分子的機構、および 2) きわめて規則的なコラーゲン線維の配列が形成される生化学的・細胞生物学的機構について調べることを目的としたものである。

硝子軟骨以外の組織のコラーゲン線維は、多くの場合 I 型コラーゲンを主成分とし、III, V 型コラーゲンを副成分としてもつが、これらの含量比は組織によって異なる。生体内のコラーゲン線維は 80-100nm の太い線維と 20-40 nm の細かい線維の二種類に大別され、こうしたコラーゲン線維の太さを決定する上で、異なるコラーゲン分子種の含量比や分子種間の相互作用が重要な役割を果たすと考えられる。免疫化学的研究によると V 型コラーゲンに対する抗体は細かい線維に反応する。また、コラーゲン分子を再会合させると I 型コラーゲンは 80-100 nm 以上の太さの線維を形成するのに対し、V 型コラーゲンは細かい線維 (50 nm 以下) を形成する。さらに I 型、V 型コラーゲンを混合して再会合させると V 型コラーゲンの含量が一定以上であれば線維の太さが一定以上にならないことも報告されている。したがって、V 型コラーゲンの含量は線維の太さに影響を及ぼしていると考えられる。角膜実質層は他の結合組織と同様にコラーゲン線維が主要成分であり、次のような特徴をもつ: ア) コラーゲン線維を構成する主成分は I 型コラーゲンであるものの、他の組織よりも V 型コラーゲンの含量が多い; イ) コラーゲン線維の直径は均一で細く (約 30 nm)、分岐していない; ウ) 線維は一定方向に、一定の間隔で高密度に配列し、さらに互いに直交する多数の層を形成する。こうした均一で規則的なコラーゲン線維の配列の構築に関与している細胞は、コラーゲン線維に囲まれて散在する線維芽細胞様細胞 (ケラトサイト) であると考えられている。

本論文ではまず、コラーゲン線維の構成成分 (上記ア)) が、角膜実質層の機能上きわめて重要なコラーゲン線維の特徴である上記イ) とどのような関連をもつかにつき、主として生化学的手法を用いて調べた結果について述べて

いる。その概要は次の通りである。

ウシ角膜組織はペプシン処理により、ほぼ完全に可溶化された。角膜実質層の組織全体からペプシンによって可溶化された画分中のタンパク質はI型コラーゲンとV型コラーゲンで占められていた。I型コラーゲンとV型コラーゲンの割合は、約9:1であった。そこで、酵素処理を限定した場合に溶出するI型コラーゲンとV型コラーゲンの割合から、角膜コラーゲン線維におけるV型コラーゲンの分布についての情報が得られると考え検討した。酸性でペプシン処理した際、短時間で可溶化された画分にはV型コラーゲンがI型コラーゲンと同程度の量含まれていた。このことは、コラーゲン線維の表面付近にV型コラーゲンが分布していることを示唆する。しかし、酸性条件下では線維が膨潤することによりコラーゲン分子間の間隙が開いている可能性がある。実際、BirkらはV型コラーゲンに対する抗体が中性条件ではコラーゲン線維と反応せず、酸性条件にした後で反応することから、V型コラーゲンは線維の内部にあると考察している。そこで、コラーゲン線維中の分子パッキングが保たれる条件で限定酵素処理を行って検討した。中性pHでトリプシンおよびキモトリプシン処理を行い、主に線維の表面付近に酵素を作用させた後に、種々の溶媒で溶出してくるコラーゲン分子種を検討した。2M尿素、0.7M NaClを含むTris-バッファー処理で可溶化されてくる画分にコラーゲンが含まれ、その大部分はV型コラーゲンであった。この結果をもとに角膜実質コラーゲン線維のV型コラーゲンとI型コラーゲンの構成比、コラーゲン分子の径、コラーゲン線維の径から、V型コラーゲン分子がコラーゲン線維の表面に分布するモデルを作成した。このモデルは、現在最も頻繁に引用されているBirkらが提唱しているモデル、すなわちV型コラーゲンが線維の内部にあると考えるモデルと全く逆のものであり、V型コラーゲン分子から再構成した線維の径が一定以上に太くならないことを合理的に説明できるものと考えられた。

次に、前述の特徴ウ)を与えるメカニズムについて知見を得るため、どのような処理を行うことによって高密度にパッキングされたコラーゲン線維を分散・分離できるかを検討した。棘皮動物では、メルカプトエタノール、EDTA、NaClなどを適度な組み合わせで用いると、ほぼ完全に結合組織が分散し、ほとんどすべてのコラーゲン線維が回収できることが報告されている。そこでこの方法を改変し、0.2Mメルカプトエタノール、0.05M EDTA、0.5M NaClを含むバッファーで角膜組織片を処理した。分散したのから大きな破片を除いたあと、多少濁りを有する画分を透過型電子顕微鏡で観察した。観察された線維はどれもコラーゲン線維に特有の縞模様を示し、線維径は一定で約25 nmであった。線維の向きも、線維間の距離もさまざま、コラーゲン線維へと分離されていることがわかった。また、収量は低下したが、メルカプトエタノールの代わりにDTTを用いてもほぼ同様の結果が得られた。したがって、ウシ角膜実質層のコラーゲン線維が一定方向に整然と配列する機構には、S-S結合が重要な役割を果たしていることが示唆された。

最後に、一方向に整然と配列したコラーゲン線維がさらに直交する幾重もの層をなし、角膜としての機能的構造体を形成する(前述の特徴ウ)ためには、コラーゲン線維とそれをつくるケラトサイトとの相互作用が重要と考えられる。本論文では、この相互作用について知るための予備的研究として、角膜から分散したコラーゲン線維、I型、V型コラ

ーゲン再構成線維をそれぞれ基質として、無血清下でヒトケラトサイトを培養し、その形態を経時的に調べた。培養 1 日後では、伸張し活発に突起を伸ばしている細胞の数は、角膜線維を基質とした場合が、プラスチックのみ、I 型コラーゲン再構成線維、V 型コラーゲン再構成線維のいずれの場合よりも多かった。したがって、角膜より分散したコラーゲン線維は、I 型、V 型コラーゲン再構成線維にはない効果をケラトサイトの細胞活性に及ぼすことが示唆された。

これらの実験結果から本論文は、角膜実質層で形成される native なコラーゲン線維に関して次のように結論づけている:1)I 型コラーゲンと V 型コラーゲンが約 9:1 の割合で含まれること;2)V 型コラーゲン分子は線維の表層付近に分布し、このことが均一な太さの線維がつくられる機構において重要と考えられること;3)I 型、V 型コラーゲン再構成線維のそれぞれと比べ、異なった効果をケラトサイトの細胞活性に及ぼすこと。

冒頭にも述べた通り、コラーゲンにはきわめて多くの分子種があり、このことはおそらく多様な分子種の組合せにより多様な構造と機能をもつ細胞外マトリクスを形成する上で重要である。本論文は、I 型コラーゲンと V 型コラーゲンに焦点を絞っているものの、生体内の native なコラーゲン線維において、これらの2種のコラーゲン分子の量比と分布が特定の線維形態を形成する上で重要であるばかりでなく、周辺の細胞の活性にも特異的な効果を及ぼすことを示した点で意義がある。

審査委員会では、線維内での V 型コラーゲン分子の局在についての直接的証拠に乏しい、コラーゲン線維が細胞活性に及ぼす効果についての実験での踏み込みが浅いなどの意見も出された。しかし、もとより可溶化が困難であり、構造と機能に関して限られた知見しか得られていない線維性コラーゲンについて上記の成果を得たことは、今後の研究の発展に大いに寄与するものと評価された。特に、I 型、V 型コラーゲン混合線維に関して本論文で提案されたモデルについては、従来提唱されているものと完全に対立するものであり、当該分野での研究を強く刺激するものと考えられた。

したがって、本審査会は本論文を博士(学術)の学位を授与するものにふさわしいものと認定する。