

学位論文題名

EXTRACELLULAR MATRIX MODULATES EXPRESSION OF
CELL-SURFACE PROTEOGLYCAN GENES IN FIBROBLASTS

(細胞外マトリックスによる
線維芽細胞表面プロテオグリカン遺伝子発現の変化)

学位論文内容の要旨

細胞表面プロテオグリカンは、細胞外微小環境の構成体との相互作用において様々な機能を有している。細胞表面プロテオグリカンは様々な細胞接着因子、成長因子、サイトカインと結合し co-receptor として機能している。これら細胞表面プロテオグリカンはコアタンパクと酸性ムコ多糖の一部が構造的な多様性を有しており、その発現形態が厳密に制御されているため、それぞれの細胞表面プロテオグリカンには明晰とした役割が備わっている。このことは、様々な生物学的活性因子に対する細胞表面プロテオグリカンの反応は選択的でありかつ細胞種特異的であることを示している。

細胞外基質や成長因子、サイトカインなどの刺激因子に対する細胞の反応は細胞表面のプロテオグリカンによって調節されているといわれている。代表的な細胞表面プロテオグリカンには CD44 (ヒアルロン酸レセプター)、betaglycan (transforming growth factor [TGF]- β type III receptor)、syndecan (transmembrane heparan sulfate proteoglycan)、glypican (glycosylphosphatidyl inositol [GPI]-anchored heparan sulphate proteoglycan) ファミリーがある。しかし、これらのプロテオグリカンの発現が培養あるいは、成長過程においてどのように変化するかは明らかではない。再生医療においては、この点を解明することが組織特異的な本来の環境を模倣するような基材材料の開発につながる。

ヒアルロン酸はグルクロン酸とN-アセチルグルコサミンを交互に成長する鎖に添加しながら繰り返す、2糖を単位とした線状高分子ポリマー構造で、生体において一生涯にわたりそれぞれ異なった目的、生産量で細胞より産生される。ヒアルロン酸の生物学的活性はとても重要である。なぜなら、ヒアルロン酸は生体内において発生の最も早い段階から存在する酸性ムコ多糖だからである。我々は腱・靭帯の組織工学的再生に用いる基材材料としてキトサン・ヒアルロン酸ハイブリッドファイバーを独自に開発した。これまでの研究でヒアルロン酸は線維芽細胞の活動性を高めその細胞接着能、細胞増殖能、基質産生能が向上することを報告してきた。しかし、ヒアルロン酸の線維芽細胞表面のプロテオグリカンに与える影響は明らかにされていない。

本研究では細胞表面プロテオグリカンの発現は細胞を培養する環境によって変化するという仮説をたてた。この仮説を実証するため、我々は *in vitro* で線維芽細胞を様々な環境下で培養し、細胞表面プロテオグリカンの発現を定量した。本研究の第1の目的は線維芽細胞を単離、平面培養し継代を重ねていく過程における細胞表面プロテオグリカンの発現の変化を評価すること。第2の目的は組織中の主要な細胞外マ

トリックス構成体である type I コラーゲンおよび、ヒアルロン酸の線維芽細胞表面プロテオグリカンに与える影響を明らかにすること。そして、2次元培養環境と3次元培養環境でそれぞれのプロテオグリカンの発現の違いを明らかにすることである。本実験で得られた結果は、今後の組織工学的手法を用いた腱・靭帯再生において、基材材料の開発に有用な情報を提供し得ると考える。

細胞を組織より単離し単層培養する過程で、syndecan-1, -2, -3, betaglycan, glypican-1 の mRNA の発現は漸減した。一方、細胞を組織より単離することによって、細胞接着に強く関わっているとされる CD-44 および syndecan-4 mRNA の発現が大きく増加した。Syndecan-4 は接着斑の広範囲に及ぶ構成体である唯一の syndecan であり、Chinese Hamster Ovary 細胞に過剰発現させると、cell spreading が増し、接着斑の数や大きさも増えると報告されている。CD-44 はヒアルロン酸特異的接着に作用し、線維芽細胞を含め数多くの異なった細胞種でも観察されている。また、ヒアルロン酸は膝蓋腱中のムコ多糖類の 22% を占めることから腱・靭帯の線維芽細胞にとってヒアルロン酸は重要な分子であると考えられる。Syndecan-2 は fibroglycan と呼ばれており、線維芽細胞にとって主要な syndecan の一つであり、おもに TGF- β のシグナリングに関わっている。Betaglycan も同様に、TGF- β type III レセプターであるがこれらのプロテオグリカンは平面培養での発現は低かった。

線維芽細胞を平面培養から3次元コラーゲン培養に移すことは、線維芽細胞の培養環境をより in vivo の環境に近づけることができる。本研究では、培養環境を3次元にすることによって syndecan-4 の発現が劇的に増加した。他の報告では、線維芽細胞を3次元培養することによりデルマトン硫酸やムコ多糖類の産生量が上昇したとの報告もある。これらの結果は細胞の反応において、細胞外の環境が重要であることを示している。従来から、より in vivo の環境を模倣するため細胞培養において培養液の組成や、周囲の混合ガスの組成などの重要性が強く強調されてきた。しかし、細胞反応における培養構造の影響に関してはあまり議論されてきていない。生体内の環境との明らかな違いは、周囲を取り巻く細胞外基質との接触が少ないことである。3次元の培養環境は、プロテオグリカンの遺伝子発現ではより生体の環境に近い状況を作ることが可能だといえる。本研究は、従来より行われている2次元での培養だけでなく3次元の培養においても、細胞表面プロテオグリカンの遺伝子発現を定量化したという点で、意義のあるものと考えられる。

コラーゲンにヒアルロン酸を添加することにより、平面培養では第3継代において CD-44, syndecan-4 の発現が有意に上昇していた。また、3次元培養ではすべての継代において syndecan-4 mRNA の発現が有意に上昇していた。これらの結果は、ヒアルロン酸が細胞反応に影響を与えていることを示しており、軟骨細胞で提唱されているヒアルロン酸が細胞と基質の相互作用を伝えているという報告とも一致する。

本研究の結果から、細胞外基質に対する線維芽細胞表面プロテオグリカン発現の反応は可変的であることが明らかとなった。このことは細胞表面プロテオグリカン産生制御の一つのメカニズムを示している。これまでに、成長因子やサイトカインがこれらのプロテオグリカンの発現を制御しているという報告はある。しかし、本研究では腱・靭帯由来線維芽細胞において、細胞外基質や培養するディメンジョンの違いで細胞表面プロテオグリカンの発現を制御できる可能性が示唆された。これらプロテオグリカンの発現の制御は、異なった細胞外基質への細胞の反応が腱・靭帯組織の修復にかかわるメカニズムの一つとなりうる可能性がある。

本研究の限界は、細胞表面プロテオグリカンの mRNA の発現しか定量していない点である。蛋白の発現に関しては今後明らかにしなければならない問題点である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 浪 明 男
副 査 教 授 清 水 宏
副 査 教 授 安 田 和 則

学 位 論 文 題 名

EXTRACELLULAR MATRIX MODULATES EXPRESSION OF CELL-SURFACE PROTEOGLYCAN GENES IN FIBROBLASTS

(細胞外マトリックスによる

線維芽細胞表面プロテオグリカン遺伝子発現の変化)

細胞表面プロテオグリカンは、細胞外微小環境の構成体との相互作用において様々な機能を有している。細胞表面プロテオグリカンは様々な細胞接着因子、成長因子、サイトカインと結合し coreceptor として機能している。これら細胞表面プロテオグリカンはコアタンパクと酸性ムコ多糖の一部が構造的な多様性を有しており、その発現形態が厳密に制御されているため、それぞれの細胞表面プロテオグリカンには明晰とした役割が備わっている。このことは、様々な生物学的活性因子に対する細胞表面プロテオグリカンの反応は選択的でありかつ細胞種特異的であることを示している。細胞外基質や成長因子、サイトカインなどの刺激因子に対する細胞の反応は細胞表面のプロテオグリカンによって調節されているといわれている。しかし、これらのプロテオグリカンの発現が培養あるいは、成長過程においてにどのように変化するかは明らかではない。再生医療においては、この点を解明することが組織特異的な本来の環境を模倣するような基材材料の開発につながる。

我々は腱・靭帯の組織工学的再生に用いる基材材料としてキトサン・ヒアルロン酸ハイブリッドファイバーを独自に開発した。これまでの研究でヒアルロン酸は線維芽細胞の活動性を高めその細胞接着能、細胞増殖能、基質産生能が向上することを報告してきた。しかし、ヒアルロン酸の線維芽細胞表面のプロテオグリカンに与える影響は明らかにされていない。本研究では細胞表面プロテオグリカンの発現は細胞を培養する環境によって変化するという仮説をたてた。この仮説を実証するため、我々は *in vitro* で線維芽細胞を様々な環境下で培養し、細胞表面プロテオグリカンの発現 (CD-44, syndecan-1~4, betaglycan, glypican-1,3) を定量した。

細胞を組織より単離し単層培養する過程で、細胞接着に強く関わっているとされる CD-44 および syndecan-4 mRNA の発現が大きく増加した。syndecan-4 は接着斑の広範囲に及ぶ構成体である唯一の syndecan であり、CD-44 はヒアルロン酸特異的接着に作用し、

線維芽細胞を含め数多くの異なった細胞種でも観察されている。線維芽細胞を平面培養から3次元コラーゲン培養に移すことは、線維芽細胞の培養環境をより *in vivo* の環境に近づけることができる。本研究では、培養環境を3次元にすることによって syndecan-4 の発現が劇的に増加した。これらの結果は細胞の反応において、細胞外の環境が重要であることを示している。3次元の培養環境は、プロテオグリカンの遺伝子発現ではより生体の環境に近い状況を作ることが可能だといえる。コラーゲンにヒアルロン酸を添加することにより、平面培養では第3継代において CD-44, syndecan-4 の発現が有意に上昇していた。また、3次元培養ではすべての継代において syndecan-4 mRNA の発現が有意に上昇していた。これらの結果は、ヒアルロン酸が細胞反応に影響を与えていることを示しており、軟骨細胞で提唱されているヒアルロン酸が細胞と基質の相互作用を伝えているという報告とも一致する。

本研究の結果から、細胞外基質に対する線維芽細胞表面プロテオグリカン発現の反応は可変的であることが明らかとなった。このことは細胞表面プロテオグリカン産生制御の一つのメカニズムを示している。これまでは、成長因子やサイトカインがこれらのプロテオグリカンの発現を制御しているという報告が大多数を占める。しかし、本研究では腱・靭帯由来線維芽細胞において、細胞外基質や培養するディメンジョンの違いで細胞表面プロテオグリカンの発現を制御できる可能性が示唆された。これらプロテオグリカンの発現の制御は、異なった細胞外基質への細胞の反応が腱・靭帯組織の修復にかかわるメカニズムの一つとなりうる可能性がある。また、腱・靭帯再生においてヒアルロン酸は重要な分子の一つであることが示唆されたと報告した。

審査に当たり、清水教授から、腱のグリコサミノグリカンにおけるヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸の割合について、CD-44, syndecan-4 の発現が上昇するメカニズムについて、将来再生医療にヒアルロン酸を用いるに当たって実用可能なコストであるのかについて質問があった。安田教授からは、mRNA level の発現の違いは細胞表面上に存在する膜蛋白の発現にリンクするのかについて、CD44, syndecan-4 の mRNA 発現の上昇と細胞機能上昇との関係について、継代培養とプロテオグリカンの発現および細胞機能の関係について、ヒアルロン酸の生物学的活性における濃度依存性についての質問があった。三浪教授からは、至適なヒアルロン酸濃度について、細胞を培養するディメンジョンによるヒアルロン酸の効果の違いについて、CD-44, syndecan-4 の発現が上昇した理由について、本研究の腱靭帯再生における役割についての質問があり、これらの質問に対し今回行った実験結果と過去の文献を引用し、適切に回答した。

この論文は腱・靭帯由来線維芽細胞における細胞表面プロテオグリカンの遺伝子発現を様々な培養環境で比較検討し、今後の腱・靭帯再生において重要な情報を提供できる可能性があると考えられた。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。