HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	細胞培養系におけるパールカンの多様性［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	中村, 亮介
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第11391号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56093
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Ryosuke_Nakamura_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博士（農学） 氏名： 中村 亮介

学 位 論 文 題 名

細胞培養系におけるパールカンの多様性

ヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）の一種であるパールカンは、動物の発生、恒常性維持、組織修復において、多様な機能を示す。パールカンの多機能性は局在の多様性、相互作用する分子の多様性、分子構造の多様性に起因すると考えられている。

秩序が維持されている成体正常組織において、パールカンは全身の基底膜に遍く局在するが、発生や器官形成、組織修復過程といった乱雑さが増した環境では、間質中に液性成分あるいは間質の細胞外マトリックス（ECM）成分として増加する。パールカンはコアタンパク質とこれに共有結合したヘパラン硫酸鎖（HS）によって、基底膜成分、間質 ECM 成分、成長因子、モルフォジェンなど様々な分子と相互作用して、それらの働きを調節する。パールカンの HS は産生する細胞種によって構造的機能的ばらつきが生じ、また、コアタンパク質が酵素分解されることで、特殊な機能を持つ断片が生じることもある。

パールカンは畜産副生物として単離が可能であり、その多機能性は様々な用途への活用が期待されている。しかし、多様であるが故に、その機能の全貌は把握されておらず、実用化に際しては、予期せぬ作用をもたらす可能性もある。本研究では、動物体全四組織に由来する様々な細胞におけるパールカンの発現および機能を培養系で調べ、それらの傾向をまとめることで、パールカンの多機能性を把握しやすい俯瞰図として提示した。

免疫学的手法を用い、神経（神経幹/前駆細胞、ニューロン、アストロサイト）、筋（血管平滑筋、筋芽細胞）、結合（間葉系幹、脂肪前駆、骨芽、軟骨、線維芽細胞）、上皮/内皮（血管内皮、表皮角化、肝細胞）組織由来の細胞が培養系において発現するパールカンおよび他の ECM 成分について検討した結果、全細胞がパールカンを産生していた。生体の乱雑な環境でパールカンの発現は上昇するが、その発現は基底膜と関連性が高い上皮/内皮の細胞に限定されておらず、様々な細胞が自身の産生したパールカンにさらされ、パールカンの多様な機能によって活動を調節されることが示唆された。しかし、その発現は一様ではなく、由来組織によって異なる傾向があった。神経組織由来の細胞は、パールカンを含む ECM 成分全般の培地への産出が少なく、細胞層への蓄積も少なかった。筋および結合組織由来の細胞は、パールカンを含む ECM 成分全般の培地への産出が多く、細胞層への蓄積も多かった。一方、上皮組織由来の細胞は、パールカンを培地には産出するものの、細胞層にはあまり蓄積しない傾向があった。

ウシ腎臓から精製したパールカンをコートした培養基質を用い、細胞の接着および増殖、分化に対する外因性固相パールカンの機能を調べ、間質 ECM 成分や基底膜関連成分コートと比較した。

外因性固相パールカンは神経組織由来の細胞の接着を許容し、神経突起伸長を促進する一方で、アストロサイトの過剰な増殖を抑制する機能もあったため、生体の乱雑な環境で増加したパールカンは神経網形成的に機能し、神経忌避的なグリア性瘢痕形成を抑制すると考えられた。これらの機能は他の ECM コートには見られない特徴的な機能であった。

外因性固相パールカンは筋および結合組織由来の細胞に対して、特段の機能傾向は示さなかった。また、各細胞種に対して示した機能は、パールカン以外の ECM 成分の存在によって埋没する傾向があり、ECM 産生能が高い筋および結合組織由来の細胞では、固相パールカンの機能は限定的であると示唆された。

上皮/内皮組織由来の細胞に対して、外因性固相パールカンは間質 ECM に類似した機能を示したが、基底膜関

連成分とともにコートしたパールカンには、間質 ECM らしい機能は見られなかった。基底膜は上皮/内皮の分化および安定化に寄与するが、パールカンは基底膜の安定化に寄与すると考えられているため、秩序が維持されている正常組織で基底膜を構成するパールカンは、細胞レベルではなく、ECM レベルで上皮/内皮の安定化に機能すると推定された。

培養細胞により培地に産出されたパールカンを、パールカン全長に対するポリクローナル抗体で機能阻害する事、あるいはウシ腎臓から精製したパールカンを培地に添加する事により細胞の遊走および増殖、分化に対する液相パールカンの機能を調べた。

神経組織由来の細胞に対しては、液相パールカンが神経幹/前駆細胞の増殖や神経突起伸長を促進に機能するなど、外因性固相パールカンと同様、神経形成的な機能傾向が示された。

筋および結合組織由来の細胞に対しては、選択的に遊走および増殖を促進あるいは抑制した。具体的には、液相パールカンは生体の組織修復過程で比較的早期に損傷組織に侵入して暫定的な組織形成に関与する間葉系幹細胞の遊走と増殖を促進する一方で、線維症化の原因ともなる線維芽細胞の過剰な増殖は抑制するなど、正常な組織修復には好ましい機能が示唆された。また、液相パールカンは、基本的には筋および結合組織由来の細胞の分化を促進したものの、血管平滑筋細胞や骨髄由来間葉系幹細胞における脂肪滴蓄積を抑制する結果も得られ、異常な方向への分化は抑制することも示唆された。したがって、液相パールカンは筋および結合組織の細胞に対して、生体の乱雑な環境における細胞の侵入や増殖を選択的に調節し、正常な分化を促進する秩序形成促進傾向があると示唆された。

上皮/内皮組織由来の細胞に対して、液相パールカンは遊走および増殖促進的に機能しており、創傷治癒における表皮の再被覆や、血管新生を促進すると考えられる。また、上皮/内皮には間葉組織の過剰な反応を抑制する働きがあるため、生体の乱雑な環境において液相パールカンは上皮/内皮の形成や修復を早め、間葉組織の秩序形成を間接的に促進すると推定された。

液相パールカンの細胞遊走に対する機能は、細胞種に関わらず、ほとんど HS 依存的であることが示唆されたが、増殖および分化への液相パールカンの機能は、神経、筋、結合、上皮/内皮組織の細胞に対して、HS/コア、HS、コア、HS それぞれが働く傾向があった。パールカンはコアと HS をもつことで多様に機能し得るが、その機能しやすい領域には、細胞種による傾向が窺えた。

組織や器官の発生過程や障害からの修復過程では、様々な細胞が入り乱れ、様々な反応が起こる混沌が生起する。その後、細胞は適切な場所に配置し、適切な細胞へと分化し、恒常性維持的な環境へシフトする秩序の形成過程がある。

パールカンは、組織や器官の混沌が生起する過程では、細胞の侵入と増殖を選択的に促進して乱雑さの増大を抑え、秩序の形成過程では、細胞の過剰を抑制して適切な方向への分化を促進し、組織の安定化に機能することで乱雑さの減少に働く傾向を有することが示唆された。このような機能は、医療においては、虚血などによる神経組織の壊死や、線維症および脂肪組織の過形成などへの利用可能性を示す。すなわち、神経忌避的なグリア性瘢痕の形成を抑制すると共に神経網の形成的に機能する効果、あるいは、血管新生を促進して虚血および慢性炎症、低酸素を改善する一方で、線維症形成的な反応や脂肪の過形成を抑制する効果が想起される。