

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

Effect of modification of collagen fibrils on the interaction between
collagen fibrils and fibroblasts

坏 信子

Nobuko Akutsu

目次

略語一覧	1
総合序論	2
第1章 グルコースとのインキュベーションがコラーゲン線維会合体と線維芽細胞との相互作用へ及ぼす影響	5
1-1. 序論	5
1-2. 結果	7
1-3. 考察	9
第2章 XII 型あるいは XIV 型コラーゲンの NC-3 ドメインの添加がコラーゲン線維会合体と線維芽細胞との相互作用へ及ぼす影響	16
2-1. 序論	16
2-2. 結果	18
2-3. 考察	19
第3章 コラーゲン濃度変化がコラーゲン線維会合体と線維芽細胞との相互作用へ及ぼす影響	24
3-1. 序論	24
3-2. 結果	25
3-3. 考察	26
第4章 組織での XII 型及び XIV 型コラーゲンの発現分布 –XII 型あるいは XIV 型コラーゲンの NC-3 ドメインによるコラーゲン線維表面の状態変化がコラーゲン線維会合体と細胞との相互作用へ及ぼす影響が生体現象へ関与する可能性の検討–	30
4-1. 序論	30
4-2. 結果	31
4-3. 考察	32
総合総括	34
材料及び方法	38
参考論文	49
表	
図	
謝辞	

略語一覽

APM : ammonium peroxodisulfate
BSA : bovine serum albumin
BPB : bromophenol blue
CBB : coomassie brilliant blue R-250
CTS : connective tissue sheath
DEAE-cellulose : diethylaminoethyl-cellulose
DEJ : dermal-epidermal junction
DFP : diisopropyl fluorophosphate
DMEM : Dulbecco' s modified Eagle' s medium
DP : dermal papilla
ECM : extracellular matrix
EDTA : ethylenediamine tetraacetate
FACIT : fibril-associated collagens with interrupted triple helices
FBS : fetal bovine serum
FITC : fluorescein isothiocyanate
IgG : immunoglobulin G
N-EM : N-ethylmaleimide
MMP : matrix metalloproteinase
MSF : migration stimulating factor
PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis
PBS : phosphate buffered saline
PMSF : phenylmethanesulfonyl fluoride
SC : stratum corneum
SDS : sodium dodecyl sulfate
TEMED : N, N, N' , N' -tetramethylethylenediamine
TIMP : tissue inhibitor of metalloproteinase
Tris : tris(hydroxymethyl)aminomethane

総合序論

細胞外マトリックス (ECM) は細胞の間隙に存在し、組織器官などの多細胞系の構築に貢献している。当初、ECM は組織、器官の機械的、構造的な支持を担うといった静的な役割が重要視されていた。現在では細胞の環境そのものであり、細胞の代謝、形態、増殖、移動、分化などの様々な活動に影響を与えるといった動的な役割 (生命を維持する上での) も担うことがはっきりしてきた¹⁻¹⁰⁾。

コラーゲンはヒトなど体重の大きな動物の生体においては全蛋白質の 1/3 をも占めると言われる。コラーゲン蛋白質はスーパーファミリーを構成しており、ヒトでは多数の分子種が見つかっている。I 型、III 型、IV 型、V 型及び VI 型コラーゲンは量的に多く、ECM の骨格を構築し、安定化を維持していると考えられる。中でも I 型コラーゲンは生合成や分解などの代謝、分子及び線維の構造、細胞基質としての機能等について最もよく研究されているコラーゲンである。III 型及び V 型コラーゲンとともに線維性コラーゲンであり、線維芽細胞により合成される。合成されたコラーゲン分子は細胞外へ分泌され、分子と他の分子が重合して細線維を形成し、細線維同士が相互作用して線維を形成する。さらに線維と線維が束化したり、多数の線維が縦横無尽に張りめぐらされた線維会合体として存在する。すなわち線維会合体として機能する。

一方、このように生体内にて高次構造を構築した I 型コラーゲンを組織から抽出することができる。幼弱な生物の皮膚や腱などの組織を酢酸などの酸性溶液中に入れると I 型コラーゲンの一部が溶け出してくる (酸可溶性コラーゲン)。また、酸性溶液中にて分散させた組織片をペプシンなどで処理するとコラーゲンらせん部分だけからなる蛋白質としてコラーゲンが回収される (ペプシン処理コラーゲン)。得られたコラーゲン溶液は分子が可溶化したものだが、*in vitro* 系にてこの I 型コラーゲン溶液を中和し、生理的なイオン強度のもと 37°C にてインキュベーションすると分子から線維を再構成できる [(再構成) I 型コラーゲン線維、または溶液が再構成によりゲル化することから (再構成) I 型コラーゲンゲルと呼ばれる。コラーゲン線維が多数絡み合った線維会合体である]。I 型コラーゲン分子をシャーレ上にコーティングしたり、コラーゲンゲルを培養細胞の直下あるいは周囲に存在させることにより細胞機能 (増殖、分化、遺伝子発現等) の解析が行われている。

I 型コラーゲンをコーティングした培養シャーレ上にて血管内皮細胞を培養すると MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) の発現がごくわずかしき検出されないのに対し、I 型コラーゲンゲル上及びゲル中にて細胞を培養すると MMP-2 の発現促進、活性化の促進が起こる¹¹⁾。培養シャーレ上及び I 型コラーゲンをコーティングした培養シャーレ上に植えた線維芽細胞は伸展して扁平形になるが、I 型コラーゲンゲル上に植えた細胞ではこの伸展形態が若干ながら抑制される。しかし、I 型コラーゲンゲル中での細胞の伸展形態は扁平形ではなく、二極性の紡錘形となる⁵⁾。これらのことから I 型コラーゲンの作用は、分子、分子が重合した線維、さらには多数の線維が絡み合ったゲルでは大きく異なり、細胞は何か

の方法にて周囲のコラーゲン状態を感知し、それに応じた様々な挙動を示すと想定される。

I 型コラーゲンは生体内にて線維会合体を構築し、線維会合体として機能する。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。このような生体系での現象を解析する上で、*in vitro* 系にて再構成されたコラーゲングル系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とともにコラーゲン線維と細胞の相互作用を見る上でいろいろな情報を与えてくれる。

細胞は様々な細胞活性を有するが、その中でも細胞遊走活性は生体现象の中でも形態形成期や創傷治癒時などダイナミックな動的環境下において機能を発揮する細胞活性である。*in vitro* 系での細胞遊走測定法としては、ボイデンチャンバーを用いて、細胞がポリカーボネイトフィルターの穴目を通り抜ける際の通りぬけ易さを指標として細胞遊走を測定する方法が一般的に用いられている¹²。細胞遊走を促進する液性因子や可溶化した ECM により細胞が遊走するケモタクシスの分子機構について徐々に明らかにされている。この測定法は血液成分である白血球のような細胞の遊走を観察するうえでは、最適とは言えないまでも示唆に富む情報を与えてくれる。一方、線維芽細胞のように固相基質中に存在している細胞の遊走を検討するには不適であると考えられるもののそれに代わる測定系が見出せない状態であった。ところが、再構成 I 型コラーゲングルを用いると三次元固相基質中を細胞が遊走する様子を観察することができる。線維芽細胞をコラーゲングル上に植えつくと細胞の一部はコラーゲングル上からゲル中へ入りこみ、培養時間が長くなるに従いコラーゲングル中へ遊走する細胞数が増える⁶。ゲル上に植えつけた線維芽細胞がゲル中へ移動するメカニズムについては明らかにされていないが、このコラーゲングル系を用いて、サイトカインによりゲル上からゲル中への遊走が促進されること¹³、MSF (migration stimulating factor) という細胞遊走促進因子が存在することなど興味深い知見が得られている^{14,15}。再構成 I 型コラーゲングルは、実際に生体内にて起こる三次元的な移動として細胞の遊走を観察することができ、また、そのメカニズムに迫ることができるという点で有益かつ重要なツールである。

他方、再構成 I 型コラーゲングルを用いて細胞自らがコラーゲングルの線維の会合状態を変える現象が認められている。I 型コラーゲングル中にて線維芽細胞を培養すると細胞はコラーゲン線維を引っ張り引き締めて再構築する結果、コラーゲン線維密度が結合組織のそれに匹敵するほど高密度となる¹。この再構築されたコラーゲングル(収縮コラーゲングルと呼ぶ)中では、再構築前のコラーゲングルに比べて細胞増殖活性が著しく変動する。プラスチックシャーレ上及びコラーゲングル上に比べてコラーゲングル中にて培養した線維芽細胞の増殖活性は抑制されるが、収縮したコラーゲングル中ではさらに増殖の停止が

認められる (cell-matrix contact inhibition と呼ばれている)。また、細胞の増殖を促進する EGF、b-FGF などのサイトカインに対する応答性が減弱し、消失する²⁴⁾。これはコラーゲンゲル収縮によりコラーゲンゲル中の線維の密度が高くなり、その結果、コラーゲン線維と細胞の結合する部位の分布と密度が高くなることが細胞によって認識されたためと考えられる。以下のような現象が実際に生体内にて起きている。(1)正常時に血液から様々なサイトカインが真皮組織中へ浸透したとしても真皮中の線維芽細胞は増殖しない。これは先に示したように密度の高いコラーゲン線維が細胞周囲に分布することが細胞増殖の停止作用を有するためと解釈できる。(2)創傷部位においては細胞数が増し、新しく合成されたと思われる線維が見られる。創傷部位においては、当初、血清成分(血小板由来のものも含む)が増加する一方、細胞周囲のコラーゲン線維の密度が減少する。コラーゲン線維の密度が低下するために細胞が血清由来の因子に刺激されやすくなる結果、細胞増殖や蛋白質合成が促進されるという機構が推測される。(3)治癒過程が進行してくると、細胞数および細胞間隙成分が増えるとともに細胞のサイトカイン等に対する応答性が低下する。細胞間隙成分、その一つであるコラーゲンの細胞周囲での線維密度の増加が、細胞のサイトカイン等に対する応答性を低下させるためである。コラーゲン線維が細胞と結合している部位の分布と密度が細胞活性を制御するという機構は、再構成 I 型コラーゲンゲル内にて細胞培養を行い、観察された事実を最もシンプルに説明し得ることから提唱された考え方であり、この考え方を動員することにより上述のように生体内での現象を説明することができる。

コラーゲン線維密度の変化以外にも生体内ではコラーゲン線維表面に様々な物質が付着したり、糖化や酸化等様々な反応により修飾されることによってコラーゲン線維会合体の状態は変化する。しかし、その線維表面のどこにどのように物質が結合するのか、修飾反応がどのように起きているかを生化学的に解析し、そこから細胞に対するコラーゲン線維の影響がどのように変わるかを研究解明することは時間がかかるのみならず、コラーゲン線維の立体構築の状態変動など通常の方法では解析し得ないこともあるため本質的な問題解決には至らないと考えられる。このような状況下において、一步でも解明へ向かうためには実験可能な系で経験的な法則を導き出そうとしたり、細胞とコラーゲン線維の相互に及ぼす作用がシンプルな現象の繰り返しで生ずるとの可能性にも配慮して、生体で起きているような複雑な現象を理解しようとすることに意義があると考えた。

以上のような立場から、本研究では、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、コラーゲン線維と線維芽細胞の相互作用の特徴を理解しようと目指して行ったものである。すなわち、線維芽細胞の細胞機能に及ぼすコラーゲンゲルの①グルコースとのインキュベーションによる影響、②コラーゲン線維表面上に結合するとされている XII 型あるいは XIV 型コラーゲンの NC-3 ドメインの添加による影響、③コラーゲン濃度による影響を検討した。これらの結果を I 型コラーゲン線維と細胞の相互作用について統一的に把握すべく考察を加え、生体内でコラーゲン線維が果たす生理的意義についての情報を得ることを目的とした。

第1章 グルコースとのインキュベーションがコラーゲン線維会合体と線維芽細胞との相互作用へ及ぼす影響

1-1. 序論

生体内にて蛋白質は様々な化学反応に曝されるが、その一つに糖化反応がある。糖化反応の機構については、蛋白質の α -及び ϵ -アミノ基と還元糖のアルデヒド基とが非酵素的に反応後、シッフ塩基を形成し、アマドリ転位物を経て、架橋構造や蛍光発光性の複雑な構造物に変化することが明らかにされている(図1)¹⁶。糖化反応は糖濃度、反応時間及び温度に依存して進行するので、生体内での代謝速度が速い蛋白質に関しては糖修飾を受ける機会が少ない。例えば糖修飾を受け、糖修飾による蛋白質構造変化が生理機能を損なう性質のものでも速やかに代謝され体外へ排出される結果、生体のダメージにつながらない。しかし、コラーゲンなど生体内での代謝回転が遅く、非常にターンオーバーの長い蛋白質は、生体組織中に存在する長い間に糖により修飾されてしまっている分子の割合が高い。その結果、正常に機能しない、あるいはコラゲナーゼなどにより分解できないような修飾を受けたコラーゲンが生理機能障害をもたらす可能性がある。

コラーゲンの糖化に関する研究は古くから数多くなされてきたが、その大部分が糖化によるコラーゲンの化学構造的、生化学的な性質の変化に着目したものである。糖尿病患者組織や老齢組織を直接解析する方法、可溶化したコラーゲンや生体から取り出した腱をグルコースやリボースなどの還元糖とインキュベーションすることにより実験室レベルにて糖化反応を行い、反応後の産物を解析する方法から多数の知見が得られている。糖化によるコラーゲン分子の化学構造的変化としては、リジン、ヒドロキシリジン及びアルギニン残基の減少、カルボキシメチルリジンの生成¹⁷、蛍光を帯びた架橋構造の形成などが挙げられる。架橋構造のうち、ペントシジンのようにその化学構造が明らかになったものもあるが¹⁸、大部分のものについてはその構造の複雑さゆえ明らかにされていない。コラーゲン分子の生化学的性質に関しては、糖化により形成された架橋によると考えられる酢酸への溶解性の低下、コラゲナーゼ等による分解性の低下がある。

コラーゲンは生体内では分子ではなく線維会合体として存在、機能している。コラーゲン線維に着目した糖化の研究はコラーゲン分子に関する研究に比較して分析が容易でないために数が限られるが、興味深い知見が得られている。腱をリボースとインキュベーションすると構成コラーゲン線維直径の増加、それによる線維同士の間隔の増加や線維密度の増加が観察される¹⁹⁻²⁴。腱を構成しているコラーゲン線維間に結合が認められることから糖化の最終産物である架橋がコラーゲン線維間に形成された結果であると捉えられている。このことからコラーゲン線維会合体の性質も糖化により大きく変化している可能性がある。

一方、研究例は少ないながら再構成 I 型コラーゲングル系を用いて糖とのインキュベーションによりコラーゲングルが細胞活性へ及ぼす影響がどのように変動するかについて検討されている。糖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細胞

増殖活性が促進されるという結果が得られている一方、細胞伸展活性に関しては促進する、あるいは逆に抑制するという異なる結果が報告されている^{25, 26}。また、線維芽細胞によるコラーゲングル収縮活性は抑制されることが明らかにされている²⁷。これらの結果は、糖化によるコラーゲン蛋白質と細胞の結合部位数の減少等により説明されているが、コラーゲンの線維としての機能に着目し、その局面から細胞活性へ与える影響について考察したものではない。

本研究では、コラーゲン蛋白質の糖化反応とコラーゲングルが細胞機能へ及ぼす影響がどのように相関するのかの解明を試みた。具体的には、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線維芽細胞の細胞活性へ及ぼす影響について検討した。

1-2. 結果

コラーゲンのアミノ酸組成

グルコースとインキュベーション後のコラーゲン蛋白質のアミノ酸組成を表1に示した。低濃度 (0.06 M) グルコース溶液にてコラーゲンをインキュベーションした場合、あるいは、高濃度 (0.56 M) グルコース溶液にて短期間 (7 日以内) インキュベーションした場合には、コラーゲン蛋白質のアミノ酸組成に変化は認められなかった。一方、高濃度 (0.56 M) グルコース溶液にて長期間 (14 及び 21 日間) インキュベーションした場合には、リジン残基とアルギニン残基の減少が認められたが、アスパラギン酸残基、グリシン残基、グルタミン酸残基及びアラニン残基の変動は認められなかった。なお今回の実験では、加水分解を行う前に NaBH_4 のような試薬にて還元していないために糖化反応過程にて形成されたシッフ塩基は元のアミノ基とカルボニル基に分解してしまうと考えられた。

コラーゲンの酢酸溶解性とペプシン分解性

グルコースとのインキュベーションにより、コラーゲン蛋白質の酢酸不溶性画分及びペプシン非分解性画分が顕著に増加した。コントロールのコラーゲングルでは、22 時間振とう後にその 89%が酢酸に可溶化し、93%がペプシンにより分解されたのに対し、高濃度 (0.56 M) グルコース溶液にて長期間 (21 日間) インキュベーションしたコラーゲングルでは、14%が酢酸に可溶化し、36%がペプシンにより分解されたにすぎなかった (表2)。

コラーゲンの CNBr 分解後の SDS-PAGE

グルコース非存在下にてインキュベーションしたコラーゲングル、及び、低濃度 (0.06 M) グルコース溶液にてインキュベーションしたコラーゲングルの場合、CNBr 分解後のペプチドバンドパターンはインキュベーション期間に関わらずコントロールと同一であった。しかし、高濃度 (0.56 M) グルコース溶液にてインキュベーションしたコラーゲングルでは、インキュベーション期間が 7 日間の場合に 100 kDa 近傍領域と 200 kDa 以上の領域にてスミアながら CNBr 分解産物と思われる染色が認められた。インキュベーション期間が 21 日間の場合には、低分子量バンドが薄くなり、アクリルアミド分離ゲルにかろうじて入る程度の高分子量産物が増加していた。このことはグルコースによる糖化反応の結果、コラーゲン分子 (同一分子とは限らない) を構成している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 (図2)。

架橋を形成する NaIO_4 について、0.01~2.0 mM の濃度にて検討した。 NaIO_4 濃度が 0.1 mM までは、CNBr 分解後のペプチドバンドパターンはコントロールと同一であった。インキュベーション時の NaIO_4 濃度が 0.5 mM の場合には、低分子量のバンドが存在するものの 100 kDa 近傍領域と 200 kDa 以上の領域にてスミアながら CNBr 分解産物と思われる染色が認められた。 NaIO_4 濃度が 1.0、あるいは 2.0 mM の場合には、40 kDa 以下の低分子量のバンドが減少し、40 kDa 以上のバンドが多数出現していた。このことは NaIO_4 による酸化反応の結果、コ

ラーゲン分子構成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 (図 3)。

コラーゲンゲルが細胞活性へ及ぼす影響

グルコースとのインキュベーションにより、コラーゲンゲル上での線維芽細胞の接着活性は変化しなかった (図 4)。細胞伸展は高濃度 (0.56 M) グルコース溶液にて長期間 (21 日間) インキュベーションしたコラーゲンゲル上にて若干抑制された (図 5)。増殖活性は濃度 0.33 M 以上のグルコース溶液にて長期間 (21 日間) インキュベーションしたコラーゲンゲル上にて有意に促進された (図 6)。コラーゲンゲル上からゲル中への細胞遊走はコラーゲンゲルとグルコースとのインキュベーションにより顕著に変動した。インキュベーション期間が短時間 (1 日) の場合、濃度が 0.39 M 以上のグルコース溶液にてインキュベーションしたコラーゲンゲルでは、ゲル上からゲル中への細胞遊走が抑制される傾向を示したが、有意差はなかった。インキュベーション期間が長期間 (21 日間) の場合、グルコース濃度が 0.28 M 以上にてコラーゲンゲル上からゲル中への細胞遊走が有意に抑制された (図 7)。反応時のグルコース濃度が高い (0.56 M) 場合、7 日間以上インキュベーションしたコラーゲンゲルにて細胞遊走が有意に抑制された (図 8)。

コラーゲンゲルを濃度 0.25 mM 以上の NaIO_4 とインキュベーションした場合、コラーゲンゲル上からゲル中への線維芽細胞の細胞遊走は顕著に抑制されたが (図 9)、増殖活性は変化しなかった (図 10)。

1-3. 考察

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が細胞活性へ及ぼす影響がどのように変動するかについて検討したところ、顕著な影響が認められた細胞活性は、コラーゲングル上からゲル中への遊走活性だけであった。コラーゲングル表面上での線維芽細胞の接着活性は変動しなかった。細胞伸展は抑制、増殖活性は有意に促進されたもののその程度は低いものであった。これは何を意味するのであろうか。コラーゲングル表面上での細胞接着、伸展、増殖に比べると、コラーゲングルの中に細胞が遊走する活性は細胞とコラーゲン線維間の相互作用において、様々に異質の部分を含んでいると考えられる。そこで、多数のコラーゲン線維間、コラーゲン線維と細胞との間の相互作用の総和として遊走活性が現れるとの視点から以下に考察を加える。

先行研究との相関性

Nishikawa によりグルコースとのインキュベーション後のコラーゲングル上での細胞伸展と増殖活性が促進されることが、Kawano によりリボースとのインキュベーション後のコラーゲングル上での細胞伸展の抑制と増殖活性の促進が起こることが報告されている^{25, 26}。本研究では Kawano らによる結果と一致した傾向が認められたが、糖とのインキュベーションによるコラーゲングル上での細胞増殖活性の促進効果は弱かった。コラーゲングルの糖とのインキュベーションによる作用の現れ方の違いは、用いた糖の種類（本実験ではグルコース、Kawano らはグルコースよりも反応性の高いリボースにて糖化を行った）、糖による糖化反応速度の違い、及び、細胞増殖活性測定法の違い（本研究では細胞 DNA 量、Kawano らは³H-チミジン取り込み量を測定した）によるものと考えられる。

グルコースとのインキュベーションによるコラーゲングル上での細胞増殖活性の促進

線維芽細胞の細胞増殖活性は、コラーゲンコーティングシャーレ上及びコラーゲングル上ではプラスチックシャーレ上に比べて抑制される。コラーゲンの三本鎖ヘリックス構造の 60%以上を熱変性させるとこの作用が消失することからヘリックス立体構造が細胞増殖反応速度の低下に何らかの関与をすることが示されている²⁸。リボースとインキュベーションした腱を電子顕微鏡にて観察すると腱を構築しているコラーゲン線維の長軸方向に対して垂直な方向に線維構造が膨潤していること、そのためコラーゲン線維直径の増加、線維密度の増加、線維同士の結合及び線維間の空隙の減少が認められることが報告されている^{19, 24, 29}。これは糖化にて形成された架橋によりコラーゲン線維構造が影響を受けたためであると考察されている。本研究でも糖とのインキュベーションにより、コラーゲンの酢酸溶解性及びペプシン分解性の低下、CNBr 分解後に生じるペプチドバンドの高分子量化が起こっており、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。これらの事象から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細胞増殖活性が促進された機序の一つとして、コラーゲンの糖化によりコラーゲン分子のポリペプチド鎖間に形成

された架橋がコラーゲン三本鎖ヘリックス構造を変化させ、この構造が保持されていることにより保たれていた細胞増殖抑制作用を減少させたと考えられる。

グルコースとのインキュベーションによるコラーゲングル上での細胞伸展の抑制

細胞が基質に接着伸展する際に重要な役割を担うのが、**基質と細胞の結合部位**である。コラーゲン蛋白質と細胞の結合部位として二つの塩基配列が関与する可能性がある。一つはアスパラギン酸-グリシン-グルタミン酸-アラニン (DGEA) 配列であり、 $\alpha 2 \beta 1$ インテグリンによりコラーゲンの DGEA 配列が認識されることが報告されている²⁶。もう一つがアルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) 配列である。細胞がファイブロネクチンに接着する際にはこの配列を認識することがよく知られており^{11,12}、コラーゲンの場合にもこの RGD 配列が細胞結合部位として使用されている可能性がある。これらの塩基配列を構成しているアミノ酸残基がグルコースとのインキュベーションにより変化するかを調べた。DGEA 配列を構成するアミノ酸残基数はグルコースとのインキュベーションにより変化しなかったが、RGD 配列を構成するアルギニン残基数は 0.56 M のグルコース溶液にて 21 日間インキュベーションしたコラーゲンでは、10%破壊されていた (表 1)。よって、糖化によるコラーゲン蛋白質のアルギニン残基の減少、それに伴うコラーゲン線維と細胞の結合部位数の減少により細胞伸展が抑制されたと考えられる。細胞は細胞膜レセプターを介して基質の細胞結合部位を認識し、接着する。その後、基質-細胞膜レセプター-細胞骨格間にシグナルが伝達され、細胞骨格関連蛋白質の構築あるいは脱構築により細胞形態が変化する。コラーゲングル上では細胞は球形から扁平形へと形態変化するが、引き続き板状仮足では基質との接着・脱着を繰り返し、板状仮足の伸展・退縮を行う。よって、細胞伸展は細胞接着よりもよりコラーゲン線維と細胞の結合部位の影響が反映される結果、コラーゲングルの糖化によるコラーゲン線維と細胞の結合部位数の減少の影響が細胞接着では認められなかったのに対し、細胞伸展ではわずかながら現れたと考えられる。

グルコースとのインキュベーションによるコラーゲングル上でのコラーゲングル収縮活性の抑制

本実験では、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細胞活性の中でも細胞遊走活性が顕著に抑制されることを明らかにした。一方、先行研究にてコラーゲングル収縮活性がコラーゲングルと糖とのインキュベーションにより著しく抑制されることが報告されている²⁷。コラーゲングル上に線維芽細胞を植えつけ、ゲルをシャーレから剥離して 24 時間後、コントロールのコラーゲングル上面積が $200 \text{ cm}^2 \rightarrow 60 \text{ cm}^2$ に収縮するのに対し、グルコース-6-リン酸にて 5 日間インキュベートしたコラーゲングルではわずかに $200 \text{ cm}^2 \rightarrow 150 \text{ cm}^2$ に収縮されるに過ぎず、糖とのインキュベーションによるコラーゲングル収縮抑制作用が著しいことがわかる。本実験にて用いた糖の種類及びインキュベーション期間とは異なるが、上述と同条件下にて実験を行ったところ、やはりコラーゲン

ゲル収縮が抑制されることを確認した（データ省略）。

コラーゲンゲル中にて線維芽細胞が形態変化と同時に糸巻きのように回転運動しながらコラーゲン線維を巻きつけ、細胞周囲へ蓄積しようとすることを示唆する現象が報告されている（図 11）³³⁻³⁵。細胞がコラーゲン線維を巻きつけることにより、巻きつけられたコラーゲン線維に張力が生じる様子が認められる。コラーゲンゲル収縮を検討する際にはコラーゲンゲルをシャーレから剥離するが、このような系では線維芽細胞によりコラーゲン線維が濃縮され、コラーゲン線維密度が高くなる（図 12A）。この際、細胞は直接結合している近傍のコラーゲン線維はもちろんのこと、細胞から遠く隔たったコラーゲン線維をも引き寄せる（1 本の線維が縮んでいるだけではなく、線維と線維が入り組んで濃縮されている様子が観察される）ことからコラーゲン線維 1 本 1 本は独立した存在ではなく、コラーゲン線維とコラーゲン線維が相互作用していることがわかる。細胞遊走はコラーゲンゲルをシャーレから剥離せずに付着した系にて観察するが、このような系ではコラーゲンゲルをシャーレから剥離した系とは異なる様子が認められる。コラーゲンゲルをシャーレから剥離しない系では、電顕所見から細胞周囲 1 μm という細胞表面に近傍な領域にのみ線維が濃縮されており、その周辺には線維密度の低い領域が、さらにその周囲を通常に認められるコラーゲン線維密度の領域が広がっている様子が観察される（図 12B）。これらのことからコラーゲンゲル中にて線維芽細胞が回転運動しながらコラーゲン線維を巻きつけ、いかに濃縮するかは、細胞-コラーゲン線維間、コラーゲン線維-コラーゲン線維間、コラーゲン線維-シャーレ間（あるいは他の細胞、溶媒分子）の相互作用に依存することになる（図 13）。細胞が同じ運動を行っても細胞-コラーゲン線維間、コラーゲン線維-コラーゲン線維間、コラーゲン線維-シャーレ間（あるいは他の細胞、溶媒分子）の相互作用の寄与が異なると細胞によるコラーゲン線維の濃縮の様子も変わることになる。

コラーゲンゲル中での線維芽細胞によるコラーゲンゲル収縮とは異なり、コラーゲンゲル上に植えつけた細胞によるコラーゲンゲル収縮では、細胞とコラーゲン線維との相互作用は二次元的である。しかし、コラーゲン線維が元位置していた場所から動かされて濃縮されることから回転運動なのか、接着点の移動による運動なのか、どのような運動であるかは定かでないが、細胞が運動していることは確かである。コラーゲンゲル上に植えつけた線維芽細胞によるコラーゲンゲル収縮の過程では、細胞は細胞膜レセプターを介してコラーゲン蛋白質の細胞結合部位を認識し、接着後、細胞運動によりコラーゲン線維を濃縮すると考えられる。細胞が運動するためには、運動のし易さを左右するコラーゲン線維、コラーゲン線維会合体であるコラーゲンゲルの可塑性の高さが重要になる。コラーゲンゲルの可塑性は、1 本のコラーゲン線維の変形し易さという線維自体の性質に加えて、コラーゲン線維間の相互作用に依存する。さらに細胞運動によりコラーゲン線維を濃縮する際には、コラーゲン線維の濃縮し易さが重要になる。コラーゲンゲルがシャーレから剥離されている系ではコラーゲン線維-シャーレ間の相互作用がないので、コラーゲン線維の濃縮し易さはコラーゲン線維自体の変形し易さとコラーゲン線維間相互作用に依存する。可塑性

が高いコラーゲングルほど細胞により濃縮し易くなる。また、細胞が運動を介してコラーゲン線維を濃縮するためには、コラーゲン線維と細胞の結合がある程度強くなければならない。コラーゲングルの糖化によりこれら三因子 [(1)コラーゲン線維と細胞の結合、(2)コラーゲングルの可塑性、(3)細胞の運動によるコラーゲン線維濃縮] が影響を受けると考えられる。

(1)のコラーゲン線維と細胞の結合は、(細胞伸展の考察にて述べたように) コラーゲン蛋白質の糖化によりダメージを受ける (図 14)。コラーゲングル収縮活性では細胞伸展よりも激しい細胞運動を要し、コラーゲン線維と細胞の結合の影響が関与するためよりダメージの影響が大きくなると考えられる。(2)のコラーゲングルの可塑性と(3)の細胞の運動によるコラーゲン線維濃縮は、コラーゲン線維の性質、コラーゲン線維間の相互作用に依存するため糖化により形成されたコラーゲンポリペプチド鎖間架橋に大きく影響される。前述のように本実験でのコラーゲン蛋白質の化学構造的及び生化学的手法による解析結果は、糖化によりコラーゲン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。また、コラーゲングルの細胞生物学的検討にて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細胞増殖性が促進されることを示したが、その解釈の一つとして糖化による架橋形成の可能性を挙げた。架橋は、1 本のコラーゲン線維中 (一分子を構成している三本のポリペプチド鎖間、異なる分子をそれぞれ構成しているポリペプチド鎖間) と異なるコラーゲン線維間 (異なるコラーゲン線維を形成している異なるコラーゲン分子のポリペプチド鎖間) に形成される可能性がある (図 15)。架橋が 1 本のコラーゲン線維中のコラーゲン分子内に形成されてもコラーゲン線維の性質はほとんど変化しないが、架橋がコラーゲン分子間に形成されるとコラーゲン線維の強度が高くなり、フレキシビリティが低下する。一方、架橋が異なるコラーゲン線維間に形成されるとコラーゲン線維と線維が結合するためにコラーゲン線維の網目構造が部分的に固定されてしまう。他のコラーゲン線維との相互作用が増え、摩擦が大きくなると考えられる。そのため細胞が相互作用しているコラーゲン線維を押し出す、あるいは引き寄せようとしても強度が高く、フレキシビリティが低下した線維は容易に動かしにくくなる。細胞が 1 本のコラーゲン線維を押し出す、あるいは引き寄せようとしてもその線維と架橋を形成している別の線維にまで力を及ぼさなければならなくなるため線維を動かしにくくなる。よって、(2)のコラーゲングルの可塑性はコラーゲングルの糖化により抑制されると考えられる (図 16)。また、細胞が何かしらの運動によりコラーゲン線維を動かし、集める際、強度が高く、フレキシビリティが低下した線維は濃縮しにくい。細胞が 1 本のコラーゲン線維を濃縮しようとしてもその線維と架橋を形成している別の線維にも力を及ぼさなければならなくなるために濃縮しにくくなる。コラーゲン線維を濃縮しようとしてもコラーゲン線維間に形成された架橋により構造が固定されたものを縮めることは困難となる (図 17)。よって、(3)の細胞の運動によるコラーゲン線維濃縮はコラーゲングルの糖化により抑制されると考えられる。従って、コラーゲングルの糖化により、(1)、(2)及び(3)の因子が抑制されるためにコラーゲングル収

縮活性が顕著に抑制されたと考えられる (図 18)。

グルコースとのインキュベーションによるコラーゲングル上からゲル中への細胞遊走活性の抑制

今回検討した細胞活性のうち、コラーゲングル上からゲル中への遊走活性がコラーゲンゲルのグルコースとのインキュベーションにより顕著に変動した。細胞遊走は、検討した他の細胞活性とは異なり、遊走過程の途中からではあるが細胞とコラーゲン線維との相互作用が三次元的になること、さらにその上に細胞運動を伴うためコラーゲンゲルの糖化による影響が大きく現れたと解釈される。

細胞遊走活性を検討する際には細胞をコラーゲングル上に植えつけるが、遊走した細胞はゲル中へ移動する。ゲル中ではコラーゲン線維が立体的にみても細胞の全面で結合しているためコラーゲン線維と細胞がより密接な状態にあること、それゆえコラーゲン線維と細胞との相互作用を変動する要因の影響がより顕著に現れると考えられる。細胞伸展活性について考察した際に糖化によりコラーゲン線維と細胞の結合部位がダメージを受けることについて述べたが、このダメージの影響がコラーゲングル上での細胞伸展よりもゲル中での細胞遊走により大きな影響を与えたと考えられる。

その上に細胞遊走活性ではコラーゲングル収縮活性と同様に細胞運動を伴う。細胞遊走という現象自体がある点から異なる点への細胞体の移動、すなわち運動である。また、コラーゲングル上へ植えつけた細胞はゲル中へ移動する。コラーゲングル中の細胞は、前述のように形態変化とともに糸巻きのように回転運動することによりコラーゲン線維を巻きつけ、細胞周囲へ蓄積する^{30, 34}。細胞遊走活性は、コラーゲングル収縮活性と同様に運動を伴う細胞活性であるためにコラーゲンゲルの糖化による影響を多大に受けた可能性がある。また、コラーゲングル収縮に伴う運動と細胞遊走に伴う運動は全く異なるものではなく、その原動力は同じであると考えられる。コラーゲングル収縮ではゲルがシャーレから剥離されているためにコラーゲン線維が細胞へ巻きつけられるのに対し、細胞遊走ではゲルがシャーレに付着しているためにコラーゲン線維の自由度が低く、細胞がコラーゲン線維を巻きつけようとする運動のポテンシャルあるいはエネルギーにより逆にコラーゲン線維に細胞が手繰り寄せられる。このような過程が繰り返される結果、細胞が空間を移動する、これが細胞遊走であると捉えられる (図 19)。そのように捉えると細胞遊走活性ではコラーゲングル収縮活性と同様に(1)コラーゲン線維と細胞の結合、(2)コラーゲンゲルの可塑性、(3)細胞の運動によるコラーゲン線維を濃縮しようとするポテンシャルが大きく影響すると考えられる。(2)のコラーゲンゲルの可塑性と(3)の細胞の運動によるコラーゲン線維を濃縮しようとするポテンシャルは(細胞遊走を検討する系のように)コラーゲングルがシャーレに付着している系では、コラーゲン線維の性質、コラーゲン線維間相互作用の他にさらにコラーゲン線維-シャーレ間の相互作用の影響を受ける。

コラーゲンゲルの糖化が(1)のコラーゲン線維と細胞の結合を抑制することについては、

コラーゲングル収縮活性の考察の際に述べた。(遊走活性を検討する系のような) コラーゲングルがシャーレに付着した系では、(コラーゲングル収縮活性を検討する系のような) ゲルがシャーレから剥離した系よりもコラーゲン線維-シャーレ間の相互作用が生じるために(2)のコラーゲングルの可塑性が低いと考えられる。糖化によりコラーゲン分子間に架橋が形成されるとコラーゲン線維のフレキシビリティが低下し、コラーゲン線維間相互作用が増加するためにさらにコラーゲングルの可塑性が低下すると考えられる。(3)の細胞の運動によるコラーゲン線維を濃縮しようとするポテンシャルについては、細胞が回転運動によりコラーゲン線維を濃縮する際、フレキシビリティが低下した線維は巻きつけにくくなる。細胞が 1 本のコラーゲン線維を巻きつけようとしてもその線維と架橋を形成している別の線維にも力を及ぼさなければならないために巻きつけにくくなる。細胞がコラーゲン線維を巻きつけようとしてもコラーゲン線維間に形成された架橋により構造が固定されたものを巻きつけることは困難となる(図 20)。従ってコラーゲングルの糖化により、(1)、(2)及び(3)の因子が抑制されるためにコラーゲングル上からゲル中への細胞遊走が顕著に抑制されたと考えられる(図 21)。コラーゲングル上に植えた細胞によるコラーゲングル収縮の場合のように細胞とコラーゲン線維の相互作用が二次元的な系に比べて、細胞遊走過程の途中からではあるが、細胞とコラーゲン線維の相互作用が三次元的となり細胞全面にてコラーゲン線維と相互作用する細胞遊走活性では、細胞とコラーゲン線維の相互作用がより密接になるためにコラーゲングルの糖化が(1)、(2)及び(3)を介して細胞遊走活性へ及ぼす影響が大きくなると考えられる。

Tiollier らはコラーゲングルを NaIO_4 とインキュベーションすることによりコラーゲングル上からゲル中への細胞遊走が抑制されることを報告している²⁶。 NaIO_4 は隣接炭素原子に 2 個またはそれ以上の水酸基またはカルボニル基が結合している化合物を酸化して、炭素-炭素結合を開裂させ、カルボニル基またはカルボン酸を生成する(図 22)。 NaIO_4 が反応する化合物がポリペプチドの場合には、生成したカルボニル基が他のカルボニル基、アミノ基及び水酸基と反応する結果、ポリペプチド鎖内あるいは鎖間に架橋が形成される。本実験においても NaIO_4 とコラーゲングルとのインキュベーションが細胞活性へ及ぼす影響について調べた。細胞増殖性には影響を与えなかったが、インキュベーション時の NaIO_4 濃度が 0.25 mM の場合には細胞遊走の抑制が、 NaIO_4 濃度が 0.5 mM 以上の場合にはそれを上回る抑制効果が認められた。濃度 0.1 mM の NaIO_4 とインキュベーションしたコラーゲングルの CNBr 分解後のペプチドバンドパターンはコントロールと同一であったが、濃度 0.5 mM の NaIO_4 とインキュベーションしたコラーゲングルでは、スミアながら高分子量領域に CNBr 分解産物と思われる染色領域が出現していた。濃度 0.25 mM の NaIO_4 とインキュベーションしたコラーゲングルに関しては、コラーゲングルの CNBr 分解後のバンドパターンについて検討していないので、細胞遊走抑制効果と架橋形成との関係については考察できないが、濃度 0.5 mM の NaIO_4 とインキュベーションしたコラーゲングルでは、ゲル上からゲル中への細胞遊走が顕著に抑制され、この時、架橋形成が認められた。このことから一般にコラ

ーゲンポリペプチド鎖間、その中でもコラーゲン分子間に架橋が形成されるとコラーゲングル上からゲル中への細胞の遊走が抑制されると推論できる。また、糖化により形成される架橋と NaIO_4 により形成される架橋ではその化学構造が異なるので、細胞の遊走が抑制される効果は架橋の構造そのものによるのではないと考えられる。

コラーゲン溶液を生体の真皮内にインジェクションすると *in situ* にて再構成したコラーゲングル中の周囲の組織から線維芽細胞様の細胞が 1 日目で遊走してくるのに対し、架橋度の高いコラーゲン溶液をインジェクションした場合にはそれより遅れて 7 日目に細胞の遊走が認められることが報告されている³⁷。*in vivo* 系、*in vitro* 系ともにコラーゲン分子間の架橋が形成されることにより、コラーゲングル内への細胞の遊走が抑制される。

本研究にて、コラーゲンの化学構造的、生化学的性質が変化し、細胞活性の中でも細胞遊走活性が抑制されたのは、コラーゲングルを高濃度 (0.56 M) のグルコース溶液にて長期間 (7~21 日間) インキュベーションした場合であり、この時のグルコース濃度は生体レベルでの値 (血中濃度: 0.0028~0.0056 M) に比べて非常に高かった。しかし、本研究にて得られた結果は以下の理由から *in vivo* 系にて起きている現象に対しても非常に示唆に富む結果であると考えている。老化の一因として糖化反応が重要視されている。若齢者に比べて高齢者から採取した皮膚や腱のコラーゲンは酸溶解性やペプシン分解性が低下し、架橋が形成されていることが報告されており^{38, 40}、本研究にて得られたコラーゲンの化学構造的、生化学的性質の変化と一致している。また、糖化反応は酵素触媒を要しない純粋な化学反応であるため糖の濃度を高める、温度を上げることにより反応速度が高まる。よって、生体内にて起きている反応、蓄積する反応生成物は、生体レベルの糖濃度のように低濃度の糖では何十年もかけないと生じないが、本研究のように糖濃度を高めることにより反応時間が短くてもこれに非常に近い状態にしている可能性が高い。

以上をまとめるとコラーゲングル上からゲル中への細胞遊走過程において、細胞運動により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る。コラーゲン線維会合体の糖化による線維芽細胞の遊走活性抑制は、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、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。

第2章 XII 型あるいは XIV 型コラーゲンの NC-3 ドメインの添加がコラーゲン線維会合体と線維芽細胞との相互作用へ及ぼす影響

2-1. 序論

I 型コラーゲンは生体内にて他の ECM と相互作用することにより多岐にわたる機能を呈し、様々な角度から生命現象に寄与していると考えられる。ECM の機能ドメインの解析及び *in vitro* 系での ECM 間での結合実験の解析からある種の糖蛋白質やグルコサミノグリカン等が I 型コラーゲンと相互作用することが明らかにされている。I 型コラーゲンは生体内にて線維として、線維会合体として存在し、機能しているが、これらの ECM が線維状のコラーゲンとも相互作用するのか、その相互作用がどのような性質のものであるのかについては知見が限られている。その中で、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、コラーゲン線維と相互作用することが明らかにされている⁴¹⁻⁴⁵。両者は異なるコラーゲンであるが、相同性が高い。3 本の $\alpha 1$ 鎖よりなるホモトリマーで、(NC-1)-(COL-1)-(NC-2)-(COL-2)-(NC-3) のドメイン構造 (コラーゲンヘリックスドメイン: COL-1 と COL-2、非コラーゲンヘリックスドメイン: NC-1、NC-2 及び NC-3) を持つ。NC-3 ドメインにエпитープを持つ抗体を用いた組織免疫学的手法による検討からコラーゲン線維束表面から NC-3 ドメインの大きさに相当する領域だけ離れた位置が染色されることから XII 型及び XIV 型コラーゲンはコラーゲンヘリックスドメインにてコラーゲン線維束と結合し、NC-3 ドメインを線維から突き出していると考えられている (図 23)⁴¹。

両コラーゲンはヒト、ウシ及びトリの多くの組織にて顕著に発現していることが報告されている。XII 型コラーゲン、XIV 型コラーゲンともに皮膚、血管壁、腱、靱帯、軟骨膜及び骨膜などの I 型コラーゲンから成る密度の高い結合組織に分布する⁴⁶⁻⁴⁸。一方、XII 型コラーゲンと XIV 型コラーゲンの発現が異なる部位もある。硝子軟骨では、XII 型コラーゲンが関節表面と血管周辺に分布するのに対し、XIV 型コラーゲンは軟骨マトリックス全体に斑点状に分布する⁴²。骨格筋や心筋では XII 型コラーゲンが発現していないが、XIV 型コラーゲンの発現は認められる⁴⁹。しかしながら現在のところ、両コラーゲンの特異的な機能については明確にされていない。コラーゲン線維表面に分布することからコラーゲン線維間、コラーゲン線維と他の ECM 成分、コラーゲン線維と細胞の間の相互作用に関与するのではないかと推定されている。XII 型コラーゲンはメカニカルな刺激により発現が促進されることから生体力学的な機能に影響を与えている可能性もある⁵⁰。一方、再構成 I 型コラーゲングルを用いた検討から両コラーゲンは線維芽細胞によるコラーゲングル収縮を促進し、細胞非存在下にて I 型コラーゲングルの可塑性を促進するが、その機能ドメインが NC-3 ドメイン (XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3) であることが明らかにされている⁵¹。また、Enzyme-linked immunosorbent assay による検討から XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 と I 型コラーゲンの分子、あるいは線維との間に特異的な結合は見られないこと⁵²、XII-NC-3 あるいは

は XIV-NC-3 共存下にて線維化した I 型コラーゲン線維を遠心するとその 95%以上の XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 が上清中へ遊離することが明らかにされている¹¹⁾。これらのことから 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しているドメインであると考えられる。そのため I 型コラーゲン線維との相互作用におけるこれら NC-3 ドメインの役割について関心が持たれている。

本研究では、XII 型あるいは XIV 型コラーゲンの NC-3 ドメイン (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コラーゲン線維状態の変化が線維芽細胞の細胞活性へ及ぼす影響について検討した。

2-2. 結果

コラーゲンゲル上での線維芽細胞の増殖活性は、XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 により変化しなかった (図 24)。図 25 の (A) と (B) の結果は、市販試薬や調製試薬は同一であるものの別々にコラーゲンゲル溶液を作製、ゲル化後、継代履歴が異なる線維芽細胞 (由来は同じ細胞) をゲルの上に植えつけ、ゲル上からゲル中への細胞遊走活性について検討した結果である。(A) と (B) のコントロール同士を比較するとそれぞれの遊走細胞数が異なっていたが、コラーゲン濃度増加に伴う顕著な細胞遊走活性促進効果は両者ともに認められた。また、検討したコラーゲン濃度の全てにおいて濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ の XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 添加により細胞遊走活性が若干抑制され、濃度を 50 $\mu\text{g/ml}$ に上げることでより顕著な細胞遊走活性抑制を示した (図 25)。次に 60°C にて 5、15 及び 30 分間熱処理後の XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 が細胞遊走活性へ及ぼす影響について検討したところ、細胞遊走活性抑制作用は熱処理により消失していた (図 26)。熱処理後の XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 をウェスタンブロッティング法により解析したところ、XII-NC-3 の場合には、熱処理後に単量体と二量体に相当するバンドがわずかに出現していたものの元の三量体 (570 KDa) に相当するバンドが大部分を占めていた。XIV-NC-3 の場合には、熱処理により単量体と二量体に相当するバンドが増加し、三量体に相当するバンドが減少していたが、ポリペプチドの分解はほとんど認められなかった (図 27)。さらに XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 特異的認識ポリクローナル抗体が XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 による細胞遊走活性抑制作用へ及ぼす影響について調べた。コラーゲン溶液に濃度 50 $\mu\text{g/ml}$ の NC-3 ドメインと濃度 50 $\mu\text{g/ml}$ のポリクローナル抗体を加え、ゲル化後、ゲル上からゲル中への細胞遊走活性について検討した。XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 による細胞遊走活性抑制作用のうちの 50% が、それぞれの特異的認識抗体により消失していた (図 28)。

2-3. 考察

第1章では、コラーゲングル上からゲル中への細胞遊走過程において、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が結果として細胞遊走として現れたと考えた。同様な考察により XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 によるコラーゲングル上からゲル中への細胞遊走抑制作用が説明できるのか。第1章にて考察したことが経験的な法則になり得るだろうか。

XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 添加コラーゲングル上での細胞接着活性

XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 を培養シャーレ面にコーティングし、非覆部を BSA にてコーティングせずに線維芽細胞を植えつけると非コーティング培養シャーレに比べて線維芽細胞の接着が抑制される⁵¹。しかし、XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 含有コラーゲン溶液をゲル化後、コラーゲングル上面に線維芽細胞を植えつけても細胞の接着活性はコントロールと同程度であり、コラーゲングルとしての細胞接着能は XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 により影響されない⁵¹。これらのことから XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 の培養シャーレ面へのコーティングによる細胞接着抑制作用は、表面処理した培養シャーレ面が XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 の付着により覆い隠されて結果的に接着できる細胞数が減少したためと捉えられている⁵¹。

XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 が細胞とコラーゲンの結合に関わるインテグリンの発現や機能へ及ぼす影響について検討されている⁵¹。線維芽細胞によるコラーゲングル収縮は $\beta 1$ インテグリン抗体により抑制され、細胞形態は二極性に伸展した形態から球形になる。XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 存在下にて $\beta 1$ インテグリン抗体を加えても線維芽細胞の形態は球形になり、XII 型コラーゲンあるいは XIV 型コラーゲン特異的認識ポリクローナル抗体を加えても細胞形態は二極性に伸展する。さらに Enzyme-linked immunosorbent assay により XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 と I 型コラーゲンの分子、あるいは線維との間に特異的な結合は見られないこと⁵²、XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 共存下にて線維化した I 型コラーゲン線維を遠心するとその 95% 以上の XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 が上清中へ遊離することが明らかにされている⁵¹。これらの事象より、XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 は、コラーゲン線維と細胞の結合には影響を与えないと考えられる。

XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 添加コラーゲングル上での細胞増殖活性

コラーゲングル上での線維芽細胞の増殖活性は XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 により変化しなかった。細胞の増殖においては、DNA の複製をはじめ細胞内の生化学反応等が伴う。コラーゲン線維はこれらの増殖に必要な反応の速度を低下させる作用を持つこと、コラーゲン線維の糖化によりその作用が抑制されることについて第1章にて述べた。XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 は、増殖に必要な反応の速度を低下させるコラーゲン線維の作用には影響を与えないと考えられる。

XII-NC-3あるいはXIV-NC-3添加によるコラーゲンゲル上からゲル中への細胞遊走活性の抑制

本研究にて XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 によりコラーゲンゲルが細胞活性へ及ぼす影響がどのように変動するかについて検討したところ、顕著な影響が認められた細胞活性は細胞遊走活性であった。今回、異なる実験間でのコントロールサンプルについて比較したところ、遊走細胞数が異なっていた。両実験において用いた市販試薬や調製試薬は同一であるものの別々にコラーゲンゲル溶液を作製、ゲル化後、継代履歴が異なる細胞（由来が同じ細胞）をゲルの上に植えて細胞遊走活性を測定した。そのため実験間での細胞遊走の挙動の違いは、実験間での細胞の状態、コラーゲンゲルの調製の差異による可能性が考えられる。細胞は、由来が同じであるものの継代日数、シャーレから剥離した後でコラーゲンゲル上に植えるまでの時間が異なっていた。コラーゲンゲルの調製については、コラーゲン原液の粘性が高いために培養器具内壁への付着量、他の溶液との均一混合化が実験間にて変動し、コラーゲン濃度が若干異なっていた可能性がある。これらいくつかの要因が重なり合って実験間での遊走細胞数が異なっていたと考えられる。よって厳密な比較を行うためには、単一の実験系内で行うことが望ましい。このような実験間の変動があったにも関わらず、本実験ではそれを上回るコラーゲン濃度増加にともなう細胞遊走活性促進効果と XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 による細胞遊走活性抑制効果が認められた。この XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 による細胞遊走抑制効果は XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 の熱処理により消失した。熱処理により XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 の三量体構造の一部が単量体、二量体へ解離していたもののポリペプチドの分解は認められなかった。このことから熱処理により蛋白質が分解されたために活性が消失したわけではないこと、NC-3 の正常なコンフォメーションがこの効果には必須であることが示唆された。

一方、Enzyme-linked immunosorbent assay により、XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 と I 型コラーゲンの分子、あるいは線維との間に特異的な結合は見られないこと⁵²、XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 共存下にて線維化したコラーゲン線維を遠心するとその 95% 以上の XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 が上清中へ遊離することが報告されている⁵¹。これらのことから XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 は、イオン結合あるいは疎水結合にてコラーゲン線維と相互作用していると考えられる。それに加えて以下の理由から XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 はコラーゲン線維表面にて相互作用する、線維表面の状態を変化させる可能性が高いと考えられる。コラーゲン分子の分子量が 300 kDa であるのに対し、XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 の分子量は 570 kDa であり、立体障害のためにコラーゲン線維を形成しているコラーゲン分子間に XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 が入り込むことは困難であると考えられる。XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 が細胞遊走活性を抑制する条件では、コラーゲンと XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 のモル比が 95:1 (コラーゲン濃度が 0.5 mg/ml、XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 濃度が 10 µg/ml の場合)、475:1 (コラーゲン濃度が 2.5 mg/ml、XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3

濃度が 10 $\mu\text{g/ml}$ の場合) であり、コラーゲン分子に対する XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 分子の割合が低いことからコラーゲン分子 1 個に対して XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 分子 1 個が相互作用する考えるよりはコラーゲン分子と分子が重合した線維の一部分である線維表面のコラーゲン分子と XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 分子が相互作用していると考えた方が理解しやすい。さらに intact な XII 型及び XIV 型コラーゲンは、コラーゲンヘリックスドメインにてコラーゲン線維に結合し、NC-3 ドメインを溶媒中へ突き出しているモデルが提案されており、コラーゲン線維表面近傍にて何かしら作用していると考えられる⁴¹⁾。以上のことから XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 は、ある立体構造を保持しないと作用を発揮できず、コラーゲン線維とは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、コラーゲン線維-コラーゲン線維間、コラーゲン線維-溶媒間の相互作用へ影響を与えると考えられる。

コラーゲングル中での線維芽細胞によるコラーゲングル収縮は、XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 により促進される⁵¹⁾。第 1 章にて、線維芽細胞によるコラーゲングル収縮は(1)コラーゲン線維と細胞の結合、(2)コラーゲングルの可塑性、(3)細胞の運動によるコラーゲン線維濃縮の三要因に依存するとして考察した。(1)のコラーゲン線維と細胞の結合に関しては、細胞接着活性の考察の際に XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 により影響を受けないことについて述べた。また、遠心力によるコラーゲングルの縮みが XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 により向上することから XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 により(2)のコラーゲングルの可塑性は増加することは明らかである(図 29)⁵¹⁾。このことから XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 は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。細胞が相互作用しているコラーゲン線維を押し出す、あるいは引き寄せようとする際、可動性の高い線維は容易に動かし易い。細胞が 1 本のコラーゲン線維を押し出す、あるいは引き寄せようとする際、そのコラーゲン線維と他のコラーゲン線維の相互作用が強く、摩擦が大きいと動かしにくい。XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 によりコラーゲン線維間の相互作用、摩擦が低下すると細胞がコラーゲン線維を動かしやすくなる(図 30)。さらに細胞が回転運動によりコラーゲン線維を巻きつけ濃縮する際には、可動性の高いコラーゲン線維ほど巻きつけ易い。細胞が 1 本のコラーゲン線維を巻きつける際、そのコラーゲン線維と他のコラーゲン線維の相互作用が強く、摩擦が大きいと巻きつけにくい。XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 によりコラーゲン線維間の相互作用が減少し、摩擦が低下すると細胞はコラーゲン線維を巻きつけ易くなる(図 31)。よって、(3)の細胞の回転運動によるコラーゲン線維濃縮は、XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 により促進されると考えられる。XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 により、(2)と(3)の因子が促進されるためにコラーゲングル収縮活性が顕著に促進されたと考えられる(図 32)。

次に細胞遊走活性が XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 により大きく変化したことについて考

察する。

第1章にて細胞遊走は(1)コラーゲン線維と細胞の結合、(2)コラーゲングルの可塑性、(3)細胞の運動によるコラーゲン線維を濃縮しようとするポテンシャルに依存すること、(2)と(3)ではコラーゲン線維の性質、コラーゲン線維間相互作用の他にコラーゲン線維-シャーレ間の相互作用に着目する必要があることを示した。(1)のコラーゲン線維と細胞の結合は、細胞接着活性の考察の際に XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 により影響を受けないことについて述べた。(遊走活性を検討する系のような) コラーゲングルがシャーレに付着した系では、コラーゲン線維-シャーレ間の相互作用が生じるために(2)のコラーゲングルの可塑性は(コラーゲングル収縮活性を検討する系のような) ゲルがシャーレから剥離した系よりも低いと考えられる。XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 によりコラーゲン線維の可動性が促進され、コラーゲン線維間の相互作用が減少すると(2)のコラーゲングルの可塑性は促進されと考えられる。(3)の細胞の運動によるコラーゲン線維を濃縮しようとするポテンシャルについては、細胞が回転運動によりコラーゲン線維を濃縮する際、XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 によりコラーゲン線維間の相互作用が減少する結果、細胞がコラーゲン線維を引っ張ってもそれと相互作用している線維までシグナルが伝わらず、遠く隔たったところに位置する線維を巻きつけることが困難となる。他方、細胞は細胞周囲のコラーゲン線維のみ巻きつけ濃縮し易くなる。(細胞遊走を検討する系のような) コラーゲングルがシャーレに付着した系では細胞が運動によりコラーゲン線維を濃縮しようとしても濃縮できないためにコラーゲン線維を濃縮しようとするポテンシャルが生じるのに対し、同じ系でも細胞が細胞周囲のコラーゲン線維を濃縮してしまうとコラーゲン線維を濃縮しようとするポテンシャルが生じなくなる。また、巻きつけられた線維により、細胞周囲のコラーゲン線維密度が増加する結果、細胞周囲のコラーゲングルの可塑性が低くなり、運動しにくくなる。(図 33)。よって、XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 により(3)の細胞の運動によるコラーゲン線維を濃縮しようとするポテンシャルは低下すると考えられる。従ってコラーゲングルがシャーレに付着した系ではコラーゲン線維-シャーレ間の相互作用が関与するために XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 による(2)の促進作用が(3)の抑制作用へ関わること、(2)よりも(3)の要因が大きく関与するためにコラーゲングル上からゲル中への細胞遊走が顕著に抑制されたと考えられる (図 34)。

第1章ではコラーゲングルの糖化によりコラーゲン線維と細胞の結合部位数の減少、コラーゲングルの可塑性の低下、及び、細胞の運動によるコラーゲン線維を濃縮しようとするポテンシャルの低下のためにコラーゲングル上からゲル中への線維芽細胞の遊走が抑制されることを示した。第2章では XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 によりコラーゲン線維と細胞の結合部位数は変化しなくてもコラーゲングルの可塑性が増加し、細胞の運動によるコラーゲン線維を濃縮しようとするポテンシャルが低下するために細胞遊走が抑制されることを示した。これらのことから細胞が遊走するためにはコラーゲングルの可塑性が低過ぎても高過ぎても抑制がかかること、至適な可塑性やコラーゲン線維間相互作用が存在する

ことがわかる（図 35）。

以上をまとめるとコラーゲン線維会合体への XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 添加による線維芽細胞の遊走活性抑制は、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。

第3章 コラーゲン濃度変化がコラーゲン線維会合体と線維芽細胞との相互作用へ及ぼす影響

3-1. 序論

I 型コラーゲンの生体内でのターンオーバーは非常に長い、他の蛋白質と同様に細胞により合成され、MMP 等により分解される。このコラーゲンの合成と分解のバランスが形成されるコラーゲン線維の状態（線維数、網目構造の目の大きさ、強度、柔軟性、弾力性など）を変え、それらの変化が細胞活性や生理機能を変動すると考えられる。再構成 I 型コラーゲン線維を用いた細胞挙動の検討からコラーゲン濃度が細胞活性へ影響を与えることが明らかにされている。コラーゲングル上での細胞増殖活性はコラーゲン濃度の変化に関わらず変動しないが、コラーゲングル収縮活性はコラーゲン濃度の増加に伴い抑制される¹。コラーゲングル上からゲル中への細胞遊走活性はコラーゲン濃度変化に伴い顕著に変動することが明らかにされており^{6,13,14}、本実験でも第2章においてその挙動を認めている。Schor により細胞遊走至適コラーゲン濃度（2 mg/ml）が存在すること、至適コラーゲン濃度以下では細胞の足場としての安定性が弱くなること、至適コラーゲン濃度以上ではコラーゲン線維のパッキングが密になるため細胞が遊走しにくくなることが想定されている（図 36）。この考察はコラーゲン線維の構造がコラーゲン濃度により変化すること、それが細胞活性へ影響を与える可能性に着目している点にて非常に興味深い。しかし、細胞の足場の安定性がコラーゲン線維のいかなる性質に基づくものなのか、コラーゲン線維のパッキング状態と細胞の大きさとの関係についてコメントされていない等、かなり抽象的な感を受けることは否めない。さらにコラーゲングル中にて重要な意味を持つと考えられるコラーゲン線維と細胞との相互作用やコラーゲン線維間の相互作用について考慮されていない。

第1章にてコラーゲン濃度 1 mg/ml のコラーゲングルとグルコースのインキュベーションによりコラーゲングル上からゲル中への線維芽細胞の細胞遊走が顕著に抑制されることを明らかにした。コラーゲン線維のパッキングの状態は糖化反応により変化せず、また、コラーゲン分子間に形成された架橋によりコラーゲングルの可塑性が低下し、細胞の足場の安定性が増加したと考えられるにも関わらず、細胞遊走は抑制された。得られた結果と Schor の考察の間に矛盾が生じた可能性として以下の二つの点が挙げられる。細胞遊走の挙動は、コラーゲンを抽出した動物種、組織、抽出方法、実験に用いた細胞の由来、あるいは第2章にて述べたような細胞の状態やコラーゲン溶液の調製法により変動する可能性が高い。そのために第1章にて行った実験系と Schor の実験系とでは系が異なっている可能性がまず考えられる。第二に細胞遊走のメカニズムに関しては Schor の考えでは不十分である可能性である。その場合には新たに考察する必要が生じる。

本研究では、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線維芽細胞の細胞遊走へ及ぼす影響について検討した。

3-2. 結果

再構成時のコラーゲン濃度を変えるとゲル化後のコラーゲンゲル上からゲル中への細胞遊走活性が顕著に変動した。コラーゲン濃度が 0.2～0.4 mg/ml では細胞遊走がほとんど認められなかったが、コラーゲン濃度が 0.6～1.6 mg/ml では濃度依存的に顕著に遊走活性が促進された。コラーゲン濃度が 1.6 mg/ml 以上では、細胞遊走活性はある活性レベルに保持されていた(図 37)。

3-3. 考察

濃度の異なるコラーゲン溶液から再構成したコラーゲンゲルを用いて、コラーゲン濃度が細胞遊走活性へ及ぼす影響について検討したところ、細胞遊走活性はコラーゲン濃度依存的に顕著に促進した。第1章にてグルコースとのインキュベーションの影響について検討した際のコラーゲン濃度は 1 mg/ml であった。今回、用いたコラーゲン原液（第1章にて用いたコラーゲン原液と同じもの）にて調製可能な最高コラーゲン濃度は 1.8 mg/ml であり、細胞遊走活性がコラーゲン濃度 1.6 mg/ml にて最大値を示した後で下降するのか、このままプラトーになるのか、あるいは、増加するのかを明らかにすることはできなかった。コラーゲン濃度 1 mg/ml よりも濃度が高くなると遊走細胞数が増加することから細胞遊走至適濃度があるとするならば、コラーゲン濃度 1 mg/ml がその濃度よりも低い濃度であることは明らかである。Schor の考察に従うならば、細胞遊走至適コラーゲン濃度よりもコラーゲン濃度が低い場合には細胞の足場の安定性を向上すると遊走活性が促進されることになる。しかし、第1章にて糖化によりコラーゲン分子間に架橋が形成された結果、コラーゲン線維のフレキシビリティとコラーゲンゲルの可塑性が低下して細胞の足場の安定性が向上したにも関わらず、細胞遊走活性は逆に抑制された。また、Schor が考察するように細胞遊走がコラーゲン線維のパッキングの状態に左右されるならばコラーゲン濃度が低下するに従い、コラーゲン線維の網目構造の目の大きさが大きくなるために細胞が網目の間を通り抜けやすくなる、コラーゲンゲルの上に植えつけた細胞ならば下へ落ちやすくなる。そのためコラーゲン濃度が低下するに従い、遊走する細胞数が増加すると考えられるにも関わらず、実際には細胞遊走が抑制される。これらのことから細胞遊走がコラーゲン濃度変化に伴い変動することについて、新たに考察する必要を生じた。第1、2章にて細胞遊走は(1)コラーゲン線維と細胞の結合、(2)コラーゲンゲルの可塑性、(3)細胞の運動によるコラーゲン線維を濃縮しようとするポテンシャルに依存するとして考察した。同様な考察にてコラーゲン濃度増加によるコラーゲンゲル上からゲル中への細胞遊走活性の顕著な促進が説明できるのか。細胞遊走活性には、この三要因が重要であるということが経験的な法則になり得るだろうか。

コラーゲン濃度変化により 1 本のコラーゲン線維のフレキシビリティや可動性は変化しない。しかし、コラーゲン濃度が変化すると形成されるコラーゲン線維数が変動し、この影響がコラーゲン線維間相互作用、コラーゲンゲルの可塑性へと及ぶ。コラーゲン濃度が減少するに従い、コラーゲン線維数が減少するとコラーゲン線維間相互作用が減少し、コラーゲンゲルの可塑性が増加する。コラーゲン濃度が増加するに従い、コラーゲン線維数が増えるとコラーゲン線維間相互作用が増加し、コラーゲンゲルの可塑性が低下する。第1章ではコラーゲンゲルとグルコースとのインキュベーションにより、第2章ではコラーゲンゲルへの XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 の添加により得られた結果から細胞が遊走するためにはコラーゲンゲルの可塑性が低過ぎても高過ぎても抑制がかかること、至適な可塑性やコラーゲン線維間相互作用が存在することを示した。コラーゲン濃度が変化する場

合にも細胞が遊走するためにはコラーゲン濃度が低過ぎても高過ぎても抑制がかかり、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が存在すると考えられる。

(1)、(2)及び(3)のうち、最初に(2)のコラーゲンゲルの可塑性と(3)の細胞の運動によるコラーゲン線維を濃縮しようとするポテンシャルへ及ぼすコラーゲン濃度の影響について考察する。

至適な可塑性、至適なコラーゲン線維間相互作用を示すコラーゲン濃度を仮に濃度 S とする。コラーゲン濃度 S よりもコラーゲン濃度が低くなるとコラーゲン線維数の減少によりコラーゲン線維間の相互作用は減少する。XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 によるコラーゲン線維間の相互作用の減少とは異なる方法ではあるが、同様な影響を及ぼすと考えられる。また、細胞がコラーゲン線維を巻きつける際、巻きつける機会が減少する。コラーゲン線維間の相互作用が小さくなるために細胞が 1 本のコラーゲン線維を押し出そうとすると押し出し易くなる (図 38)。コラーゲン濃度 S よりもコラーゲン濃度が低くなるとコラーゲン線維数の減少によりコラーゲン線維間の相互作用が減少する結果、細胞がコラーゲン線維を引っ張ってもそれと相互作用している線維までシグナルが伝わらず、遠く隔たったところに位置する線維を巻きつけようとするのが困難となる。他方、細胞は細胞周囲のコラーゲン線維のみ巻きつけ濃縮し易くなる (図 39)。よってコラーゲン濃度 S よりもコラーゲン濃度が低くなると (2)のコラーゲンゲルの可塑性が増加し、(3)の細胞の運動によるコラーゲン線維を濃縮しようとするポテンシャルが低下すると考えられる。

コラーゲン濃度 S よりもコラーゲン濃度が高くなるとコラーゲン線維数の増加によりコラーゲン線維間の相互作用は増加する。コラーゲン分子間に形成された架橋によるコラーゲン線維間の相互作用の増加とは異なる方法ではあるが、同様な影響を及ぼすと考えられる。細胞が 1 本のコラーゲン線維を押し出そうとしてもそれと相互作用している別のコラーゲン線維にまで力を及ぼさなければならなくなる結果、コラーゲン線維を押し出しにくくなる (図 40)。細胞がコラーゲン線維を巻きつけようとする際、コラーゲン線維数増加によりある程度まで細胞がコラーゲン線維を巻きつける機会は増えるもののコラーゲン線維間の相互作用が増え、摩擦が大きくなるため細胞はコラーゲン線維を巻きつけにくくなる (図 41)。よって、コラーゲン濃度 S よりもコラーゲン濃度が高くなると(2)のコラーゲンゲルの可塑性と(3)の細胞の運動によるコラーゲン線維を濃縮しようとするポテンシャルが低下すると考えられる。

細胞遊走は(2)のコラーゲンゲルの可塑性、(3)の細胞の運動によるコラーゲン線維を濃縮しようとするポテンシャルの他に(1)のコラーゲン線維と細胞の結合に依存するが、コラーゲン濃度変化により(1)のコラーゲン線維と細胞の結合は大きく変動する。

細胞が運動するためにはコラーゲン線維と細胞の結合が強くなければならない。第 1 章にてコラーゲンゲルの糖化によりコラーゲン線維と細胞の結合部位がダメージを受けること、これが細胞遊走活性抑制の一因であると考察した。コラーゲン濃度低下によりコラーゲン線維と細胞の結合部位数が減少すると細胞はコラーゲン線維と強く結合できなくなる

(図 42)。逆にコラーゲン濃度増加によりコラーゲン線維と細胞の結合部位数が増加すると細胞はコラーゲン線維に強く結合できるようになる。しかし、細胞にとって必要な結合部位数を超えてしまうとそれ以上にコラーゲン線維と細胞の結合部位数が増加してもコラーゲン線維と細胞の結合の強さは変わらなくなる可能性、コラーゲン線維と細胞の結合が強すぎると細胞の運動が逆に抑制される可能性がある (図 43)。

コラーゲン濃度 S よりもコラーゲン濃度が低くなると(1)のコラーゲン線維と細胞の結合部位数が減少し、(2)のコラーゲングルの可塑性が促進し、(3)の細胞の運動によるコラーゲン線維を濃縮しようとするポテンシャルが抑制される。コラーゲングルがシャーレに付着した系ではコラーゲン線維-シャーレ間の相互作用が関与するためにコラーゲン濃度低下による(2)の促進作用が(3)の抑制作用へ関わること、(2)よりも(3)の要因が大きく関与すること、それに(1)の抑制作用が加わるために細胞遊走が抑制されると考えられる (図 44)。

コラーゲン濃度 S よりもコラーゲン濃度が高くなる場合、コラーゲン線維数が増加するために(1)のコラーゲン線維と細胞の結合部位数は増加する。コラーゲン線維数の増加により(1)のコラーゲン線維と細胞の結合部位数を増加させる作用が(2)のコラーゲングルの可塑性と(3)の細胞の運動によるコラーゲン線維を濃縮しようとするポテンシャルを低下させる作用よりも優位に働くならば、細胞遊走が促進されると考えられる。コラーゲン線維数の増加により(1)のコラーゲン線維と細胞の結合部位数を増加させる作用と(2)のコラーゲングルの可塑性と(3)の細胞の運動によるコラーゲン線維を濃縮しようとするポテンシャルを低下させる作用が互いに打ち消し合うならば、コラーゲン濃度 S での細胞遊走活性が保持されると考えられる。コラーゲン線維数の増加が(1)のコラーゲン線維と細胞の結合部位数を増加させる作用よりも(2)のコラーゲングルの可塑性と(3)の細胞の運動によるコラーゲン線維を濃縮しようとするポテンシャルを低下させる作用が優位に働くならば、細胞遊走が抑制されると考えられる。細胞にとって必要な結合部位数を超えてしまうとコラーゲン線維と細胞の結合部位数が増加してもコラーゲン線維と細胞の結合の強さは変わらない可能性がある。この場合、見かけ上の(1)のコラーゲン線維と細胞の結合部位数が増えなくても本質的には何ら寄与しないと考えられる。そうなるとコラーゲン線維の増加は(1)のコラーゲン線維と細胞の結合部位数の本質的な寄与は変動させずに(2)のコラーゲングルの可塑性と(3)の細胞の運動によるコラーゲン線維を濃縮しようとするポテンシャルのみに影響を与え、これを低下させるために細胞遊走が抑制されると考えられる。さらにコラーゲン線維と細胞の結合部位数が増えすぎるとコラーゲン線維と細胞の結合が強くなりすぎるために細胞の運動が抑制される可能性がある。この場合、コラーゲン線維数の増加が見かけ上の(1)のコラーゲン線維と細胞の結合部位数を増加させるものの本質的にはそれが抑制に働き、(2)のコラーゲングルの可塑性と(3)の細胞の運動によるコラーゲン線維を濃縮しようとするポテンシャルを低下させる作用と相まって細胞遊走がさらに抑制されると考えられる。従ってコラーゲン濃度 S よりもコラーゲン濃度が高い場合には、(1)のコラーゲン線維と細胞の結合部位数が増加し、(2)のコラーゲングルの可塑性と(3)の細胞の運動

によるコラーゲン線維を濃縮しようとするポテンシャルが減少する。コラーゲン濃度増加による本質的な(1)への寄与、(2)と(3)への寄与という双方の寄与程度の割合により、細胞遊走が促進される、抑制される、あるいはコラーゲン濃度 S での細胞遊走活性が保持されることが考えられる (図 44)。

今回得られた結果 (図 37) は、コラーゲン濃度 S (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) 以下の濃度範囲にて細胞遊走の挙動を示した結果である可能性が高い。コラーゲン濃度 0.2 mg/ml から濃度を上げるに従って、コラーゲン線維数が増加するために細胞はコラーゲン線維と強く結合できるようになる。また、コラーゲン線維間相互作用が増加するために細胞がコラーゲン線維を引っ張ろうとしても引っ張りにくくなる。一方、細胞が 1 本のコラーゲン線維を引っ張った時に細胞周囲の線維だけを濃縮しにくくなる。引っ張った線維と相互作用している線維にもシグナルが伝わる結果、細胞の運動によるコラーゲン線維を濃縮しようとするポテンシャルが増加し、細胞遊走が促進されることが考えられる。すなわち検討したコラーゲン濃度範囲では、コラーゲン濃度が増加すると(1)のコラーゲン線維と細胞の結合部位数が増加し、(2)のコラーゲンゲルの可塑性が低下し、(3)の細胞の運動によるコラーゲン線維を濃縮しようとするポテンシャルが増加することが考えられる。従ってコラーゲンゲルがシャーレに付着した系ではコラーゲン線維-シャーレ間の相互作用が関与するためにコラーゲン濃度増加による(2)の抑制作用が(3)の促進作用へ関わること、(2)よりも(3)の要因が大きく関与するためにコラーゲンゲル上からゲル中への細胞遊走が顕著に促進されたと考えられる。

以上をまとめると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。

第4章 組織での XII 型及び XIV 型コラーゲンの発現分布

-XII 型あるいは XIV 型コラーゲンの NC-3 ドメインによるコラーゲン線維表面の状態変化がコラーゲン線維会合体と細胞との相互作用へ及ぼす影響が生体現象へ関与する可能性の検討-

4-1. 序論

第2章にて XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 添加により I 型コラーゲンゲル上からゲル中への線維芽細胞の遊走活性が顕著に抑制されることを明らかにした。また、このことから XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 は I 型コラーゲン線維表面の状態を変化することにより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を変える可能性について示した。XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 が I 型コラーゲン線維会合体の性質を変えること、それにより細胞活性にも影響を及ぼすことが、発生や器官形成などの生体現象へいかに関与するかを調べるために XII 型及び XIV 型コラーゲンの皮膚での発現について検討した。

4-2.結果

モノクローナル抗体と XII-NC-3 及び XIV-NC-3 との反応性をウエスタンブロッティング法により解析した。モノクローナル抗体 C1J は精製 XII-NC-3 と反応したが、XIV-NC-3 とは反応しなかった。モノクローナル抗体 146E は XII-NC-3 を認識せず、XIV-NC-3 のみを認識した(図 45)。

これらの抗体を用いて、ウシ皮膚での XII 型及び XIV 型コラーゲンの発現を調べた。モノクローナル抗体 C1J、146E とともに角層を染色したが、マウス IgG を一次抗体とした場合にも角層に染色が認められたことから角層の染色は非特異的な認識によるものであると考えられた(未発表データ)。XII 型コラーゲンと XIV 型コラーゲンの発現パターンと強さは胎児ウシ皮膚と成牛皮膚にてそれぞれ異なっていた。XII 型コラーゲンは、胎児ウシ皮膚では真皮上層に強く発現していたのに対し、成牛真皮では真皮乳頭層、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 型コラーゲンは胎児ウシ皮膚にて真皮網状層に弱く発現していたが、成牛皮膚では全く発現していなかった(図 46)。成牛皮膚の成長期毛包では XII 型コラーゲンと XIV 型コラーゲンはともに強く発現していた。IV 型コラーゲンとラミニン 1 は基底膜周囲と毛乳頭に顕著に発現していたのに対し(図 47)、XII 型及び XIV 型コラーゲンは毛乳頭には全く発現しておらず、結合組織鞘周囲に発現していた(図 48)。

4-3. 考察

XII 型及び XIV 型コラーゲンの発現は、組織免疫染色法によりヒトでは新生児や成人組織において、トリやウシでは発生過程において検討されている^{41, 42, 44, 55-57}。本研究では成牛皮膚、特に毛包の結合組織である結合繊維鞘と毛乳頭での発現に着目した。XII 型コラーゲンは、ヒト成人皮膚では毛包周囲に強く発現していることが報告されている^{56, 57}。XIV 型コラーゲンは胎児ウシ皮膚の毛包に強く発現していること、ヒト成人皮膚では毛包の底部での発現が顕著であることが報告されている^{55, 57}。本研究では図 48 に示すように XII 型コラーゲンと XIV 型コラーゲンが毛包の中でも毛包結合繊維鞘に強く発現していることを明らかにした。XII 型コラーゲンは胎児ウシ皮膚では真皮上層に強く発現していたのに対し、成牛真皮では真皮乳頭層、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 型コラーゲンは胎児ウシ皮膚にて網状層に弱く発現していたが、成牛皮膚では全く発現していなかった。成牛成長期毛包では両コラーゲンともに結合繊維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。XII 型コラーゲンと XIV 型コラーゲンの発現部位と発現量が真皮乳頭層、真皮網状層、結合繊維鞘及び毛乳頭で異なることから皮膚組織に存在する間葉系の細胞が全て同じ発現パターンを示すわけではなく、細胞がどこに存在するかによりこれらのコラーゲンの発現パターンが異なると考えられる。両コラーゲンはともに成牛真皮よりも胎児ウシ真皮にて発現が高く、成牛真皮では毛包での発現が顕著であった。毛は成長期から休止期、休止期から成長期へとダイナミックなサイクル（ヘアサイクル）を経る（図 49）。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。

XII 型あるいは XIV 型コラーゲンによる I 型コラーゲン線維表面の状態変化により、コラーゲン線維の形状の可塑性が増加し、コラーゲン線維間の相互作用が減少すると考えると以下のように推察できる。

(A) 成牛真皮よりも胎児ウシ真皮にて XII 型及び XIV 型コラーゲンの発現が強い現象

胎児期、細胞は盛んに増殖し、コラーゲンを産生する。この時期に産生されたコラーゲン線維会合体の構築は不十分であるため細胞のサイトカインに対する応答性が高く、サイトカインに応じてさらに細胞は増殖を繰り返し、コラーゲンを含めた生体構成物質を多量に産生する。増殖した線維芽細胞により XII 型及び XIV 型コラーゲンが多量に産生されるとコラーゲン線維会合体の可塑性が向上するためにさらなる生体構成物質の産生と蓄積が可能になる。また、同時に多量に産生蓄積されたコラーゲン線維の再構築化が XII 型及び XIV 型コラーゲンにより促進される。最終的にはコラーゲン線維密度が高くなり、サイトカインのシグナルに対する応答性制御機能を保持した成牛の真皮組織が構築される。

(B) 成牛にて真皮-表皮接合部直下真皮乳頭層に XII 型コラーゲンの顕著な発現が認められる現象

XII 型コラーゲンが真皮乳頭層に発現することにより、真皮乳頭層中のコラーゲン線維の

可塑性が増加し、コラーゲン線維間の相互作用が低下する。外部から内部へ向けてメカニカルな刺激が加えられた場合、真皮乳頭層中のコラーゲン線維はメカニカルな刺激に応じて空間移動するが、コラーゲン線維間相互作用及びコラーゲン線維-細胞間相互作用を介して網状層中のコラーゲン線維や細胞にまでそのシグナルが伝達されることはない。そのため外部からのメカニカルな刺激を消耗してしまう緩衝材のような機能を呈する。

また、真皮乳頭層では XII 型コラーゲンが発現することによりコラーゲン線維会合体の可塑性が増加し、コラーゲン線維間相互作用が減少するために可動性が高くなる。それに対し、真皮網状層では XII 型コラーゲンが発現していないためにコラーゲン線維会合体の可塑性は低く、コラーゲン線維間相互作用が増え、摩擦が生じる。真皮が真皮乳頭層と真皮網状層から成る二層構造であるために皮膚はわずかの力にて引き伸ばすことができ、また、引き伸ばされた皮膚はそのまま保持されることなく速やかに元の状態にもどることができる。糖化、あるいは酸化反応によりコラーゲン線維間に架橋が形成されるとコラーゲン線維会合体の可塑性が低下し、コラーゲン線維間相互作用が増加するために速やかな皮膚の伸縮は起こりにくくなる。

(C)毛包結合組織鞘にて XII 型及び XIV 型コラーゲンの発現が認められる現象

毛包結合組織鞘に XII 型及び XIV 型コラーゲンが発現することにより結合組織鞘のコラーゲン線維間の相互作用が減少するために毛包構築細胞の真皮への遊走、真皮の線維芽細胞の毛包への遊走が抑制される。それゆえ毛包は真皮中に存在しながら真皮とは独立した器官として機能できる。また、毛髪は外的ストレスからの皮膚保護の役割を担うゆえ自らがストレスに曝されることになる。XII 型及び XIV 型コラーゲンが発現することにより結合組織鞘のコラーゲン線維間相互作用が減少しているため、毛が引っ張られてもその外側の真皮コラーゲン線維や線維芽細胞に外的ストレスが伝導されにくい。最悪の場合、毛が抜けることはあってもその周囲の真皮組織がダメージを受ける機会が減少する。

真皮での毛包の深さは毛周期に伴い変動するため周囲の真皮組織への結合は緩やかであることが好ましい (図 49)。XII 型及び XIV 型コラーゲンが結合組織鞘に発現することにより結合組織鞘のコラーゲン線維間の相互作用が減少するとこの部分の伸縮が自在となり、結合組織鞘を介して毛包が上下動することが容易くなる。

よって、再構成 I 型コラーゲン線維を用いて得られた XII 型あるいは XIV 型コラーゲン NC-3 ドメインによる I 型コラーゲン線維表面の状態変化によるコラーゲン線維の可塑性増加と I 型コラーゲン線維間の相互作用の減少、及び、これらが細胞活性へ及ぼす影響が、実際の生命現象にも関係している可能性が高い。さらにコラーゲン線維会合体と細胞の相互作用が形態形成期や器官形成期など生体現象を緻密に制御している可能性を示していると考えられる。

総合考察

第1、2章にてグルコースとのインキュベーションによる架橋形成と XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 添加による I 型コラーゲン線維表面の状態変化が、線維芽細胞の遊走活性を抑制することを明らかにした。第3章にてコラーゲン濃度変化により細胞遊走が顕著に変動することを示した。細胞遊走は細胞の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、コラーゲン線維-シャーレ間の相互作用の重要性を示した。(第3章にて検討したコラーゲンの場合) コラーゲン濃度 0.2~1.8 mg/ml の濃度範囲では、コラーゲン濃度増加に伴いコラーゲン線維数の増加により細胞の再構築 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。I 型コラーゲン線維会合体とグルコースのインキュベーションによる線維芽細胞の遊走活性抑制は、細胞の I 型コラーゲン線維への結合が糖修飾により下降したこと、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。XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 添加による I 型コラーゲン線維会合体での線維芽細胞の遊走活性抑制は、XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 が I 型コラーゲン線維表面の状態を変化したためにコラーゲン線維の形状の可塑性が増加したこと、コラーゲン線維間の相互作用が減少したことが原因と推定される。また、グルコースとのインキュベーション、XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 添加による I 型コラーゲン線維会合体の性質変化とそれが細胞活性へ及ぼす影響から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と考えられる。第4章にて XII 型及び XIV 型コラーゲンはウシ皮膚の毛包の結合繊維部位に強く発現していることを明らかにした。XII 型あるいは XIV 型コラーゲンによる I 型コラーゲン線維表面の状態変化により、コラーゲン線維の形状の可塑性が増加し、コラーゲン線維間の相互作用が減少すると考えると成牛真皮よりも胎児ウシ真皮にて XII 型及び XIV 型コラーゲンの発現が強いこと、成牛真皮では真皮-表皮接合部直下の乳頭層に XII 型コラーゲンが局在すること、毛包の結合繊維に XII 型及び XIV 型コラーゲンが発現していることの重要性が説明できることを示した。

I 型コラーゲンは生体内にて線維が絡み合ったゲルの状態にて機能しているためゲルの構築によりどのように細胞活性が制御されているかということは興味深く、これを明らかにすることにより I 型コラーゲンの生理的意義を示すことができる。先行研究からコラーゲン線維と細胞の結合部位の分布と密度により、コラーゲン線維は細胞活性を制御する可能性が示唆されている¹⁴⁾。本研究では、これとは別の機構(コラーゲン線維と細胞の結合、コラーゲン線維会合体の可塑性、コラーゲン線維間相互作用)にてコラーゲン線維が細胞

活性を制御する可能性について示した。コラーゲン線維と細胞の結合部位の分布と密度による制御が静的な制御であるのに対し、本研究にて示した制御機構は線維の移動を伴い、より動的なものである。また、コラーゲンが線維を構築すること、その線維が細長い形態のため線維同士で相互作用しやすい性質ゆえに得られる特性を利用した制御機構である。その他、コラーゲン分子であるかコラーゲン線維であるかにより細胞が結合する際のレセプターの使い分けにより異なる情報を与える可能性等、サイトカインのような液性蛋白質ではなく、固相のそれも線維であるゆえに興味深い制御機構がある可能性が高く、これから柔軟な発想を持って、検討、解明を試みていきたい。

本研究にて検討した I 型コラーゲン線維会合体の状態変化（コラーゲン濃度変化、グルコースとのインキュベーションによる架橋形成、XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 添加による線維表面の状態変化）により、細胞活性の中でもコラーゲンゲル収縮活性が変動することが報告されている^{4, 27, 51}。このことからコラーゲン線維会合体状態の変化により、遊走活性やコラーゲンゲル収縮活性のような運動を伴う細胞活性が影響を受けることが示唆される。言い換えるならば細胞活性の中でも遊走活性やコラーゲンゲル収縮活性のような運動を伴う細胞活性は、コラーゲン線維-細胞間、コラーゲン線維間、コラーゲン線維-シャーレ間（あるいは他の細胞、溶媒分子）の相互作用により多大な影響を受けると言える。

第 3 章にてコラーゲン濃度により細胞遊走活性が変動することを示したが、Schor により報告されている細胞遊走至適コラーゲン濃度の存在を明らかにすることができなかった。他の市販コラーゲン標品についても検討したが、同様であった（未発表データ）。細胞遊走至適コラーゲン濃度があるのか否かを明白にすることは生体内でのコラーゲン線維会合体の役割や機能を説明する上で欠くべからざることであり、今後、市販コラーゲン標品ではなく、組織から調製したコラーゲンでの検討や細胞によるコラーゲン線維の再構築により線維密度を高くした系での検討等、何らかの手段により明らかにしていかなければならないと考えている。加えて、本実験にて用いた細胞遊走活性測定法は、Schor により開発された方法を改良したものであるが、多数のサンプルの解析が困難であり、また、測定値の標準偏差が高い。よってさらなる改良、あるいは別法による遊走活性測定法の確立を行う予定である。

Schor により、コラーゲンゲル上からゲル中への細胞遊走活性についていくつかの知見が明らかにされている。正常なヒト皮膚から単離した線維芽細胞では細胞密度が高くなるとゲル上からゲル中へ遊走する細胞の割合が減少し、この時、細胞によるヒアルロン酸、その中でも特に 2×10^5 よりも高分子量のヒアルロン酸の産生が減少する⁵⁵。細胞遊走活性を促進するサイトカインや MSF により細胞が産生するヒアルロン酸量が増加するが、その一部、あるいは全作用がヒアルロニダーゼにより消失することからコラーゲンゲル上からゲル中への細胞遊走のメカニズムの一経路としてヒアルロン酸が関与する可能性が高い^{13, 53}。しかし、細胞により産生されたヒアルロン酸が細胞の周囲に分布するのか、あるいはコラーゲンゲル上に分布するのかという発現部位や発現量についての詳細な検討がなされておらず、

また、ヒアルロン酸が細胞遊走を促進する機序についても明らかにされていない。シャーレ上、I 型コラーゲンをコーティングした培養シャーレ上にて二次元的に細胞が遊走する際には、ヒアルロン酸とヒアルロン酸レセプターである CD44、あるいは RHAMM が結合することにより、インテグリンを介したシグナル伝達経路の focal adhesion kinase pp125^{FAK} のチロシンリン酸化のレベルが変動し、細胞遊走が影響を受けることが報告されている⁶⁰⁻⁶²。これと同様な機構によりコラーゲンゲル上からゲル中への細胞遊走が促進される可能性等が考えられている^{13, 58}。

グルコースとのインキュベーション、XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 の添加、及び、コラーゲン濃度変化による I 型コラーゲン線維会合体の状態変化が線維芽細胞のヒアルロン酸産生へ及ぼす影響については検討を行っていないが、以下の理由からヒアルロン酸産生量の違いでは単純に説明できないと考えている。第 2 章にて考察したように XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 は細胞と直接結合しないので、サイトカインや MSF の場合のように（サイトカインあるいは MSF を認識する）レセプターに結合した後にシグナルが伝達されてヒアルロン酸産生が変動する経路は考えにくい。一方、XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 によるコラーゲンゲルの可塑性増加がシグナルとなり、それが伝達されて、ヒアルロン酸の合成、合成と分解のバランスが変動することは十分に考えられる。仮にヒアルロン酸量が高くなると細胞遊走が促進される傾向があるとするならば、XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 添加によりコラーゲンゲルの可塑性が高くなることがシグナルとなって、ヒアルロン酸の産生が低下する、ヒアルロン酸の合成と分解のバランスが分解側へずれるために細胞遊走が抑制されることになる。同様に考えるとグルコースとのインキュベーションにより架橋を形成し、可塑性が低下したコラーゲンゲルでは、可塑性低下がシグナルとなって、ヒアルロン酸の産生が増加する、ヒアルロン酸の合成と分解のバランスが合成側へずれるために細胞遊走が促進されることになるが、第 1 章にて示したように実際に得られた結果とは一致しない。よって、本実験にて得られた結果を単純にヒアルロン酸量の違いにより説明することはできない。

本実験では、いくつかの実験結果、今まで得られている知見を十分に説明し得る経験則を得ようとする事により、通常の方法では解析し得ないコラーゲン線維会合体の状態変化について考察した。細胞遊走は細胞の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る現象であるという本研究にて得られた経験則がさらなる新たな実験結果をも説明し得るのか、説明できないとするとなが足りないのかを熟慮して新たな経験則を得ようとする事により、一步一步、生体にて起きている現象の本質に近づけるはずである。また、今後、この仮説に基づいた分子レベルでの実体に踏み込んだ研究も必要である。コラーゲン線維会合体の状態変化の解析が困難である状況には変わりはないが、導き出された経験則を元にコラーゲン線維会合体の電顕レベルでの観察、メカニカルな性質の検討に加えて、細胞運動にて重要な役割を担うレセプター、細胞骨格蛋白質、特に力を発揮する際に寄与するアクチンストレスファイバーの形成や形態、基質-レセプター-細

胞骨格間のシグナル伝達等について検討していきたい。

本研究にて I 型コラーゲン線維会合体の状態変化により細胞活性が影響を受けることを示したが、I 型コラーゲンを含めた ECM と細胞との関係は、ECM が一方的に細胞活性を制御するというような一方向性のものではない。細胞が I 型コラーゲン、XII 型コラーゲン及び XIV 型コラーゲンを合成し、合成されたコラーゲンを分解する MMP、その阻害作用を示す TIMP をも作り出し、生化学的な代謝作用を制御している。何らかの要因により、コラーゲン代謝の分解のレベルが下がると生体内でのコラーゲンのターンオーバーが長くなり、血液中の糖により修飾を受ける機会が増加する。糖化反応が進行すると糖化されたコラーゲン線維により細胞活性が影響を受ける。また、細胞はコラーゲングル収縮活性によってコラーゲン線維の再構築を行うが、細胞自らが作り出したコラーゲン線維構築状態によって逆に細胞活性が制御される。ECM と細胞の間には非常に密接な相互に行き交う関係が成り立っている。

最後に本研究により、コラーゲン線維は生体内にて組織を支持構築すると同時に濃度変化、様々な修飾反応による変化、他の ECM との相互作用を介して、コラーゲン線維-細胞間、コラーゲン線維間の相互作用をダイナミックに変動し、細胞活性（特に運動をともし細胞活性）に大きく影響を与え、形態形成や器官形成などの生体現象を緻密に制御する可能性を示した。

材料及び方法

1. 材料

1-1. XII 型及び XIV 型コラーゲンの NC-3 ドメイン (XII-NC-3 と XIV-NC-3) の精製

XII-NC-3 と XIV-NC-3 は Lunstrum らの方法に従って精製した⁴²⁾。体長 20~60 cm の胎児ウシ (Pel-Freez、Ark、USA) の皮膚を剥離切断後 (5 mm x 5 mm 程度)、抽出溶液^{注 1)} (ウェット皮膚組織重量に対して 0.5 倍量) を加え、ブレンダーにて粉碎した。さらに抽出溶液 (ウェット皮膚組織重量に対して 2.0 倍量) を追加し、4°C にて 2 日間攪拌後、ふるいにかけて組織片を除去した溶液を遠心した (1.3×10^4 rpm にて 20 分間)。抽出溶液にて平衡化した DEAE-cellulose (製品名 DE52、Whatman Inc.、NJ、USA、ウェット皮膚組織重量 1 g に対して 1 ml) を遠心上清に加え、4°C にて 2 時間攪拌後、DEAE-cellulose 及びそれへの吸着物を除去するために遠心した (1.3×10^4 rpm にて 30 分間)。得られた遠心上清を透析膜 (SPECTRUM、TX、USA) の中に入れ、高塩溶液^{注 2)} を外液として 4°C にて一晩透析し、透析による塩濃度の増加に伴い生じた沈殿を遠心した (1.3×10^4 rpm にて 60 分間)。遠心沈殿をコラゲナーゼ分解溶液^{注 3)} (ウェット皮膚組織重量 1 g に対して 0.4 ml) に溶解後、蛋白質分解酵素の働きを止めるために DFP (ALDRICH Chemical Company Inc.、WI、USA、最終濃度: 5 μ l/ml) を加え、激しく攪拌後、氷上にて 3 時間静置した (DFP は猛毒であるためこれらの操作は手袋と眼鏡を装着し、ドラフト内にて行った)。DFP 処理後の溶液を透析膜の中へ入れ、コラゲナーゼ分解溶液を外液として 4°C にて一晩透析した。透析溶液を超遠心し (4.25×10^4 rpm にて 120 分間)、遠心上清に細菌由来コラゲナーゼ (Worthington Biochemical Corporation、NJ、USA、最終濃度: 50 units/ml) を加え、フィルター滅菌後、室温にて 5 日間コラゲナーゼ分解反応を行った。EDTA (最終濃度: 5 mM 以上) を加えて反応終了後、硫酸アンモニウムを加え (硫酸アンモニウム飽和度: 50% 飽和)、4°C にて一晩放置した。遠心し (1.3×10^4 rpm にて 60 分間)、遠心沈殿を分画 [Superose 6] 溶液^{注 4)} (溶解可能な最小量) に溶解し、フィルター (目の大きさ: 0.2 μ m) 濾過したものを Superose 6 (Pharmacia LKB Biotechnology、Uppsala、Sweden) 高速液体クロマトグラフィーにて分画した (流速: 1.0 ml/分)。サンプルアプライから 30 分後の画分を 2 ml ずつ分取し、280 nm での吸光度測定により蛋白質量を求め、ウェスタンブロッティング法 (方法については後述参照) により XII-NC-3 及び XIV-NC-3 の解析を行った。XII-NC-3 及び XIV-NC-3 含有画分を透析膜の中に入れ、分画 [Mono Q] 溶液^{注 5)} を外液として 4°C にて一晩透析した。透析内液をフィルター (目の大きさ: 0.2 μ m) 濾過後、Mono Q (Pharmacia LKB Biotechnology、Uppsala、Sweden) 高速液体クロマトグラフィーにて分画した (流速: 4.0 ml/分)。サンプルアプライ後、分画 [Mono Q] 溶液にて 5 分間洗浄し、NaCl 濃度勾配《グラジエントメーカーの一方に分画 [Mono Q] 溶液、他方に分画 [Mono Q] 溶液の NaCl 濃度を 1.0 M に高めた溶液を設置し、40 分間かけて NaCl 濃度を 0.1 から 1.0 M に変化させた》をかけて溶出した。6 ml ずつ分取し、280 nm

での吸光度測定により蛋白質量を求め、ウェスタンブロッティング法により XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 の解析を行い、XII-NC-3 標品と XIV-NC-3 標品を別々に得た。蛋白質濃度の測定は bicinchoninic acid based assay (Pierce Chemical Co., IL, USA) により測定し、-80°Cにて保存した。標品を融解し、DMEM にて透析し、滅菌フィルターにて濾過したものを実験に用いた。

注 1) 抽出溶液

200 mM NaCl

25 mM Tris (pH 7.8)

10 mM EDTA

12.5 mg/l N-EM (微量のイソプロパノールに溶解後、混合した)

6.0 mg/l PMSF (微量のイソプロパノールに溶解後、混合した)

6.0 mg/l PCMB (微量の 100 mM NaOH に溶解後、混合した)

注 2) 高塩溶液

2.7 M NaCl

25 mM Tris (pH 7.8)

1 mM EDTA

12.5 mg/l N-EM (微量のイソプロパノールに溶解後、混合した)

6.0 mg/l PMSF (微量のイソプロパノールに溶解後、混合した)

注 3) コラゲナーゼ分解溶液

2 M 尿素

200 mM NaCl

25 mM Tris (pH 7.8)

5 mM CaCl_2

12.5 mg/l N-EM (微量のイソプロパノールに溶解後、混合した)

6.0 mg/l PMSF (微量のイソプロパノールに溶解後、混合した)

注 4) 分画[Superose 6]溶液

200 mM NaCl

25 mM Tris (pH 7.8)

1 mM EDTA

注 5) 分画[Mono Q]溶液

100 mM NaCl

25 mM Tris (pH 7.8)

1-2. XII 型及び XIV 型コラーゲン特異的認識抗体

XII 型コラーゲンの NC-3 ドメインを認識するモノクローナル抗体としては C1J、XIV 型コラーゲンの NC-3 ドメインを認識するモノクローナル抗体としては 146E を用いた^{41, 42, 61}。これらの抗体は、Lunstrum らによるとウシ胎児皮膚から精製した XII 型あるいは XIV 型コラーゲンの NC-3 ドメインを抗原として作製したモノクローナル抗体で、ハイブリドーマ培地から Protein G-Sepharose にて精製したものである。実験には、精製した状態、あるいはハイブリドーマ培地に溶解している状態の抗体を用いた。

XII 型及び XIV 型コラーゲンを認識するポリクローナル抗体は、Keene らによるとウシ胎児皮膚から精製した XII 型あるいは XIV 型コラーゲンの NC-3 ドメインを抗原として作製したもので、抗血清から Protein G-Sepharose にて精製したものを^{41, 42}を用いた。

2. 方法

2-1. コラーゲンゲルの調製

グルコースあるいは NaIO_4 とのインキュベーション（第 1 章での検討）がコラーゲン線維会合体と線維芽細胞との相互作用へ及ぼす影響について検討する場合にはコラーゲン溶液 A を調製した。XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 添加（第 2 章での検討）がコラーゲン線維会合体と細胞との相互作用へ及ぼす影響について検討する場合にはコラーゲン溶液 B を調製した。コラーゲン濃度変化（第 3 章での検討）がコラーゲン線維会合体と線維芽細胞との相互作用へ及ぼす影響について検討する場合にはコラーゲン溶液 C を調製した。コラーゲン溶液 A、B 及び C は、滅菌された市販品、あるいは溶液調製後に滅菌フィルター等にて滅菌したものを⁴¹用いて無菌下にて調製した。

最終濃度 1 mg/ml のコラーゲン溶液 A を作製する場合には、氷上にて 6 ml のペプシン処理 I 型コラーゲン溶液（新田ゼラチン株式会社、大阪、濃度：3 mg/ml）、9 ml の 1 倍濃度の PBS(-)^{注1)}、3 ml の 3 倍濃度の PBS(-) を泡が入らないように迅速に混合した。

最終濃度 1 mg/ml のコラーゲン溶液 B を作製する場合には、4.4 ml のペプシン処理 I 型コラーゲン（株式会社高研、東京、濃度：5 mg/ml）、1.17 ml の 5 倍濃度の DMEM、16.08 ml の 1 倍濃度の DMEM^{注2)} [XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3、及び、ポリクローナル抗体含有 DMEM。XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 の最終濃度が 0、10 及び 50 $\mu\text{g/ml}$ になるように調製した。ポリクローナル抗体の影響について検討する場合には XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 の最終濃度、及び、ポリクローナル抗体の最終濃度が 50 $\mu\text{g/ml}$ になるように調製した]、0.02 ml の 0.12 M NaOH、0.04 ml の FBS (SIGMA CHEMICAL CO.、MO、USA)、0.29 ml の 24 g/l NaHCO_3 を氷上にて泡が入らないように迅速に混合した。最終コラーゲン濃度 b mg/ml のコラーゲン溶液 B を作製する場合には、4.4 x b ml のペプシン処理 I 型コラーゲン、1.19 x b ml

の 5 倍濃度の DMEM、0.02 x b ml の 0.12 M NaOH、0.04 ml の FBS、0.29 x b ml の 24 g/l NaHCO₃ 溶液を混合し、最終体積が 22 ml になるように 1 倍濃度の DMEM 量を加えた。

最終濃度 1 mg/ml のコラーゲン溶液 C を作製する場合には、6 ml のペプシン処理 I 型コラーゲン溶液（新田ゼラチン株式会社、大阪、濃度：3 mg/ml）、7.2 ml の 1 倍濃度の DMEM、3 ml の 3 倍濃度の DMEM、1.8 ml の FBS を氷上にて泡が入らないように迅速に混合した。最終コラーゲン濃度 c mg/ml のコラーゲン溶液 C を作製する場合には、6 x c ml のペプシン処理 I 型コラーゲン溶液、3 x c ml の 3 倍濃度の DMEM、1.8 ml の FBS を混合し、最終体積が 18 ml になるように 1 倍濃度の DMEM 量を加えた。

調製したコラーゲン溶液 A、あるいは B、あるいは C のうち 2 ml を直径 35 mm シャーレ（Becton Dickinson Labware, NJ, USA）へ加え、37°C、CO₂ インキュベーター（CO₂ 濃度：5%）中にてインキュベーションした。1 時間後にコラーゲン溶液が線維化し、線維会合体であるゲルになっていることを確認した。

注 6) PBS(-)

1 l 作製用の CaCl₂ 非含有 PBS 粉末（GIBCO 社、NY、USA）/l

3.7 g/l NaHCO₃

50 units/l ペニシリン

50 μg/l ストレプトマイシン

pH 7.4 に調製した。

注 7) DMEM

10 g/l DMEM（日水製薬株式会社、東京）

3.7 g/l NaHCO₃

50 units/l ペニシリン

50 μg/l ストレプトマイシン

pH 7.4 に調製した。

2-2. コラーゲングルと試薬のインキュベーション、インキュベーション後の試薬の洗浄及び熱処理

グルコースとのインキュベーション

上述のようにコラーゲングルを作製してから 24 時間後に生体血中濃度から線維化したコラーゲンを脱重合しない濃度になるように 0、0.012、0.12、0.22、0.34、0.44、0.56、0.66、0.78、0.9、1.0 及び 1.12 M のグルコース溶液[PBS(-)]2 ml をコラーゲングルに上載し、37°C、CO₂ インキュベーター中にて 1、3 及び 7 日間インキュベーションした。14 及び 21 日間インキュベーションする場合には、7 日後に 0、0.006、0.06、0.11、0.17、0.22、0.28、

0.33、0.39、0.45、0.5 及び 0.56 M のグルコース溶液[PBS(-)]に変換し、以降 7 日ごとにグルコース溶液の交換を行った。

NaIO₄ とのインキュベーション

上述のようにコラーゲンを作製してから 24 時間後に 0、0.02、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 及び 4.0 mM の NaIO₄ (和光純薬工業株式会社、大阪) 溶液[PBS(-)]2 ml をコラーゲンゲルに上載し、37°C、CO₂ インキュベーター中にて 15 時間インキュベーションした。NaIO₄ 溶液[PBS(-)]を吸引除去後、8 ml のグリシン溶液 (20 g/l、pH 7.0) を加え、37°C、CO₂ インキュベーター中にて 3 時間インキュベーションした¹⁶⁾。

グルコースあるいは NaIO₄ とのインキュベーション後のコラーゲンゲルの洗浄

グルコースあるいは NaIO₄ とのインキュベーション後のグルコース、NaIO₄ 及びグリシンを除去するためにコラーゲンゲルの洗浄を行った。インキュベーション時の溶液を除去後、8 ml の PBS(-)[コラーゲン化学構造分析及び生化学的解析用サンプルの場合]あるいは 10%FBS/DMEM 培地[細胞活性検討用サンプルの場合]をコラーゲンゲルに上載した。37°C、CO₂ インキュベーター中にて 2 時間インキュベーションした後で溶液を除去した。この操作をさらに 7 回繰り返してコラーゲンゲルの洗浄を行った。

XII-NC-3 と XIV-NC-3 の熱処理

濃度 250 µg/ml の XII-NC-3 及び XIV-NC-3 の溶液 (DMEM) を湯浴中 60°C にて 5、15 及び 30 分間処理後、氷上にて急冷した。

2-3. 化学構造分析及び生化学的解析

アミノ酸分析

2 mg のコラーゲンゲルを遠心し (1x10⁴ rpm にて 10 分間)、遠心沈殿に 4 ml の 6 M HCl を加え、105°C にて 24 時間加水分解した。加水分解反応液を遠心エバポレーター (東京理化学器械株式会社、東京) にて乾固後、10 ml のミリ Q 水に溶解し、アミノ酸含量を日立 L-8500 アミノ酸分析計 (株式会社日立製作所、日立) にて測定した。5 個のコラーゲンゲルにて測定を行った。

コラーゲンの酢酸溶解性とペプシン分解性

2 mg のコラーゲンゲルを遠心し (1x10⁴ rpm にて 10 分間)、遠心沈殿に 1 ml の 0.5 M 酢酸あるいはペプシン溶液[10 mg/l (0.5 M 酢酸)]を加え、室温にて 2、6 及び 22 時間振とうした。遠心後 (1x10⁴ rpm にて 10 分間)、沈殿を凍結乾燥した。「アミノ酸分析」にて記載した方法にて加水分解後、ヒドロキシプロリン量を求め、コラーゲン量に換算した。5

個のコラーゲンゲルにてコラーゲン量を求め、平均値と標準偏差±SD を求めた。

CNBr 分解と SDS-PAGE

2 mg のコラーゲンゲルを遠心し (1×10^4 rpm にて 10 分間)、遠心沈殿に 0.4 ml の 70% ギ酸 (和光純薬工業株式会社、大阪) と 8 mg の CNBr (和光純薬工業株式会社、大阪) を加え、30℃ にて 24 時間振とうした。10 倍量の冷水を加えて反応停止後、凍結乾燥し、200 μ l の可溶化溶液^{注 8)} に懸濁溶解した。このうち 8 μ l と 5 倍濃度のサンプル溶液^{注 9)} 2 μ l を混合後、100℃ にて 3 分間熱処理した。ポリアクリルアミド電気泳動槽 (テフコ社、東京) にポリアクリルアミドゲル (テフコ社、東京、ゲル濃度 : 4-20%) と電気泳動用緩衝液^{注 10)} をセットし、サンプルをアプライした。120 V にて 15 分間、続いて 170 V にて 30~40 分間電気泳動後、ゲル板から剥離したアクリルアミドゲルを染色液^{注 11)} 中にて 30 分間振とうし、次に脱色液^{注 12)} 中にて一晩振とうした。

注 8) 可溶化溶液

40 g/l SDS

15 g/l Tris

注 9) 5 倍濃度のサンプル溶液

0.2 M Tris (pH 6.8)

16% グリセロール

4% SDS

8% 2-メルカプトエタノール

20 mg/l BPB

注 10) 電気泳動用緩衝液

14.35 g/l グリシン

1.75 g/l Tris

1.0 g/l SDS

注 11) 染色液

0.1% CBB

40% メタノール

10% 酢酸

注 12) 脱色液

10% メタノール

7.5% 酢酸

ウェスタンブロッティング法 (XII 型及び XIV 型コラーゲン検出)

ミニプロティアン II システム製品 (BIORAD、CA、USA) (アクリルアミド作製用ゲル板、アクリルアミド電気泳動槽、ウェスタンブロッティング用泳動槽、電極等一式を含む) を用いて、ポリアクリルアミド電気泳動及びウェスタンブロッティング法を行った。グラジエントアクリルアミドゲル作製装置 (Hoefer Scientific Instrument、CA、USA) [小さな穴を介して連結されている二つの槽 (A 槽と B 槽) から構成され、片方の槽 (A 槽) からチューブが伸びた構造をしている。A 槽には連結穴から混入する B 槽の溶液を A 槽の溶液と混合するための攪拌機能があり、拡散混合された溶液がチューブから出ていく仕組みになっている] の A 槽に濃度 5% のアクリルアミド溶液^{注 13)} を B 槽に濃度 3% のアクリルアミド溶液^{注 14)} を加え、ポリアクリルアミドゲル作製用ガラス板 2 枚の間 (厚さ: 1 mm) へ 2 分間かけて注入し、重合反応を行ってグラジエントアクリルアミドゲル (濃度: 3-5%) を作製した。その上に濃縮ゲル溶液^{注 15)} を加え、泳動用のコームをセットして重合反応を行った。これを電気泳動槽にセットし、電気泳動用緩衝液を加えた。濃度 5~10 μg の XII-NC-3 あるいは XIV-NC-3 を含有するサンプル溶液 8 μl と 5 倍濃度のサンプル溶液 2 μl を混合し、100°C にて 3 分間熱処理後にアプライし、120 V にて 15 分間、続いて 170 V にて 30~40 分間電気泳動した。泳動終了後、アクリルアミドゲルをニトロセルロース膜 (BIORAD Corp.、CA、USA) に被せ、これをブロッティングペーパー (BIORAD Corp.、CA、USA) 2 枚にてサンドウィッチ状に包み、ウェスタンブロッティング用泳動槽へセット後、ウェスタンブロッティング用緩衝液^{注 16)} を加え、4°C にて 100 V、1 時間転写した。転写終了後、ニトロセルロース膜を BSA 溶液《40 g BSA (SIGMA CHEMICAL CO.、MO、USA) / 1 PBST [0.5 g Tween 20 / 1 PBS(-)]》中にて室温、30 分間振とうし、続いて一次抗体 (XII 型コラーゲン検出の際には C1J モノクローナル抗体含有ハイブリドーマ培地、XIV 型コラーゲン検出の際には 146E モノクローナル抗体含有ハイブリドーマ培地) を加え、4°C にて一晩振とうした。ニトロセルロース膜を PBST にて洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体 (ORGANON TEKNIKA CORPORATION、NC、USA、2% BSA/PBST にて 500 倍に希釈した溶液) を加え、室温にて 30 分間振とうした。PBST にて洗浄後、ニトロセルロース膜を HRP 発色キットにて処理した。4-クロロ-1-ナフトール溶液 [60 mg 4-クロロ-1-ナフトール (BIORAD Corp.、CA、USA) / 20 ml 冷メタノール] と過酸化水素溶液^{注 17)} を混合後、ニトロセルロース膜へ添加して振とうした。蛋白質バンドが出現し、適度な濃淡になったことを確認後、水道水にて洗浄した。

注 13) 5% アクリルアミド溶液

5 ml 1.5 M Tris (pH 8.8)

3.3 ml アクリルアミド (Boehringer Mannheim corporation、IN、USA)

11.2 ml ミリ Q 水

0.5 ml 1%APM

5 μ l TEMED

注 14) 3%アクリルアミド溶液

5 ml 1.5 M Tris (pH 8.8)

2 ml アクリルアミド (Boehringer Mannheim corporation, IN, USA)

12.5 ml ミリ Q 水

0.5 ml 1%AMP

5 μ l TEMED

注 15) 濃縮ゲル溶液

2.5 ml 濃縮ゲル用緩衝液 (60.6 g/l Tris、10 ml/l TEMED、pH 6.8)

1.0 ml アクリルアミド (Boehringer Mannheim corporation, IN, USA)

6.0 ml ミリ Q 水

0.5 ml 1%APM

注 16) ウエスタンブロッティング用緩衝液

3.02 g/l Tris

14.4 g/l グリシン

200 ml/l メタノール

注 17) 過酸化水素溶液

0.24 g の Tris、2.92 g の NaCl をミリ Q 水に溶解し、pH 7.5 に調製後、100 ml にメスアップした。この溶液に 60 μ l の過酸化水素を加えた。

2-4. 細胞生物学的手法による検討

細胞調製

線維芽細胞は、explant 法により 0 歳ヒト包皮から単離したものを使用した¹⁾。採取したヒト包皮に付着している脂肪を除去後、細かく切断し (2 mm x 2 mm 程度)、5~6 個の皮膚片の真皮側を下に表皮側を上にして直径 60 mm のシャーレ (Becton Dickinson Labware, NJ, USA) に付着後、2~3 分間室温にて放置した。その後、皮膚片がシャーレから剥離しないように 5 ml の 10%FBS/DMEM 培地を加え、培養した。2 日に 1 回の割合で培地交換を行い、培養を続けていくと最初に表皮細胞が皮膚片からシャーレ上へ遊走増殖し、それに引き続いて皮膚片からシャーレ上へ遊走増殖した線維芽細胞が表皮細胞に置き換わった。このサブコンフルエント線維芽細胞を初代培養細胞とした。サブコンフルエント細胞を 1 ml のト

トリプシン-EDTA 溶液^{注18)}にて剥離し、9 ml の 10%FBS/DMEM 培地を加えて遠心した (1×10^3 rpm にて 5 分間)。上清を除去後、沈殿を 10 ml の 10%FBS/DMEM 培地に懸濁し、培養シャーレ 2 枚へ植えつけた。さらに継代し、継代数 3 代目の細胞を凍結し、液体窒素中にて保存した。保存した細胞を起こし、継代を重ね、継代数 16~19 代の細胞を実験に用いた。コラーゲン線維会合体が細胞活性へ及ぼす影響について検討する際には、10%FBS/DMEM に懸濁した 1×10^5 細胞数の細胞をコラーゲンゲル上へ植えつけた。

注 18) トリプシン-EDTA 溶液

5.41 g の KH_2PO_4 、57.25 g の $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、80.06 g の NaCl をミリ Q 水に溶解し、pH 7.4 に調製後、1 l にメスアップした (0.2 M PBS 溶液)。0.2 g の EDTA をミリ Q 水に溶解後、0.5g のトリプシン (DIFCO 社製品、MI、USA)、100 ml の 0.2 M PBS を加え、1 l にメスアップした。

細胞接着活性の検討

細胞植えつけから 5、10、30 及び 60 分後の培地を除去後、2 ml の PBS(-) にて 3 回洗浄した。トリプシン-EDTA 溶液 2 ml を加えて細胞剥離後、剥離した細胞を遠心 (1×10^3 rpm にて 5 分間)、上清を除去後、トリプシン-EDTA 溶液にて 2 回洗浄し、最終体積を 0.25 ml に合わせた。この後、Labarca と Paigen らの方法により細胞の DNA 量を測定した⁶⁴⁾。調製した細胞懸濁トリプシン-EDTA 溶液 0.25 ml に 0.02 M PBS 溶液^{注19)} 0.25 ml を加え、超音波粉碎機 (株式会社セントラル科学貿易、東京) にて 10 秒間粉碎後、Hoechst33258 溶液^{注20)} を 0.5 ml 加えた。標準サンプルは、DNA 溶液^{注21)} を 0.02 M PBS にて希釈して作製し (濃度 : 0、0.1、0.5、1.0、2.0、5.0 及び 10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、体積 : 0.25 ml)、トリプシン-EDTA 溶液 0.25 ml と Hoechst33248 溶液 0.5 ml を加えた。サンプル及び標準サンプル溶液の蛍光強度 (励起波長 : 356 nm、蛍光波長 : 460 nm) を蛍光強度計 [製品名フルオロスキャンアセトン FL、大日本製薬株式会社、大阪] にて測定した。標準サンプルの測定から得た標準直線を元に DNA 量を求めた後、10 pg DNA / 細胞の値を用いて DNA 量から細胞数へ換算した。5 個のサンプルについて平均値と標準偏差 \pm SD を求めた。

注 19) 0.02 M PBS

0.54 g/l KH_2PO_4
5.73 g/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
8.01 g/l NaCl
pH 7.4 に調製した。

注 20) Hoechst33258 溶液

20 mg の Hoechst33258 (商 品 名 Bisbenzimidazole H33258 Fluorochrome 、

Calbiochem-Novabiochem Corporation, CA, USA) を 100 ml のミリ Q 水に溶解し、この溶液を 0.02 M PBS にて 100 倍希釈した。

注 21) DNA 溶液

10 mg の牛胸腺 DNA (SIGMA, MI, USA) に 25 ml のミリ Q 水を加え、4℃にて一晩攪拌後、濾紙にて濾過して不溶物を除去した。濾液の一部をとり、260 nm での吸光度を測定後、濃度 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の DNA 溶液の吸光度を 0.023 として、DNA 溶液の濃度を補正した（市販の DNA は水分、蛋白質、塩等の混入があり、また不溶物を除去するため補正が必要である）。

細胞伸展形態の解析

細胞植えつけから 6 時間後の細胞の板状仮足の伸展と伸展後の細胞面積に着目して観察を行い、写真撮影した。

細胞増殖活性の検討

細胞植えつけから 7 日間培養後の細胞をコラーゲンゲルごと 5 ml チューブへ移し、1 ml の細胞分散用コラゲナーゼ溶液^{注 22)}を加え、37℃にて 30 分間インキュベーションし、コラーゲン蛋白質を分解した。その後、遠心し (1×10^3 rpm にて 10 分間)、上清を除去後、トリプシン-EDTA 溶液にて 2 回洗浄した。この後、Labarca と Paigen らの方法により細胞の DNA 量を測定した⁶⁴⁾（詳細は細胞接着活性の検討の項目を参照のこと）。さらに 10 pg DNA / 細胞の値を用いて求めた DNA 量を細胞数に換算した。5 個のサンプルについて平均値と士標準偏差 SD を求めた。

注 22) 細胞分散用コラゲナーゼ溶液

2 g/l コラゲナーゼ（和光純薬工業株式会社、大阪）

1 l 作製用の CaCl_2 含有 PBS 粉末（GIBCO 社、NY, USA）/l

コラーゲンゲル上からゲル中への細胞遊走活性の検討

Schor は、コラーゲンゲル上へ植えつけた線維芽細胞がコラーゲンゲルの中へ遊走する活性を以下の方法にて測定した⁶⁵⁾。1 個のコラーゲンゲルについて、シャーレの直径を横切る線上からランダムに抽出した 20 ケ所についてそれぞれ $0.9 \times 0.65 \text{ cm}^2$ の面積範囲内のコラーゲンゲル上に位置する細胞とゲル中に位置する細胞の数を位相差顕微鏡の視野を上から下へと下げながら測定した。これを 3 個のコラーゲンゲルについて行い、全細胞数当たりの遊走細胞数の割合（パーセント）の平均値と標準偏差を求めた。この方法では、植えつける細胞数によっては、コラーゲンゲル上に存在する細胞が一部重なるために数の測定が困難であり、また、ゲル表面近傍領域では、細胞がゲル上に存在するのか、ゲル中に存在

するのかを識別しにくい等の問題があった。そこで、Schorの方法を元に改良を加え、以下の方法にて遊走細胞数の測定を試みた。指定した5ヶ所についてそれぞれ5 mm²の面積範囲内のコラーゲンゲル表面から100 μmよりも下に位置する細胞の数を位相差顕微鏡の視野を上から下へと下げながら測定した。これを5個のコラーゲンゲルについて行い、遊走した細胞数の平均値と標準偏差±SDを求めた。コラーゲン濃度の異なるコラーゲンゲル上に細胞を植えつけ、3日後の細胞遊走活性についてSchorの方法と改良法にて測定したところ、両法ともにコラーゲン濃度依存的な細胞遊走の促進が認められた(図50)。そこで、本研究では改良法を用いて、細胞植えつけから3日後の細胞遊走活性を求めた。

2-5. 組織免疫学的手法による解析

組織免疫染色法

体長20～60 cmの胎児ウシあるいは成牛(Pel-Freez, Ark, USA)から皮膚を剥離し、固定せずにTISSUE-TEK(Miles Inc. Diagnostics Division, IN, USA)にて包埋し、-80℃にて凍結した。クライオスタットにて厚さ7 μmの切片を作製し、冷アセトンにて10分間固定後、PBS(-)にて洗浄した。30%ヤギ血清(Chemicon international Inc., CA, USA)を加えて室温にて30分間インキュベーション後、一次抗体[IV型コラーゲンとラミニン1を認識するポリクローナル抗体は、株式会社エル・エス・エル製品(東京)でPBS(-)にて500倍希釈したものを用了。XII型コラーゲン検出の際にはC1Jモノクローナル抗体含有ハイブリドーマ培地、XIV型コラーゲン検出の際には146Eモノクローナル抗体含有ハイブリドーマ培地を用了]を加え、4℃にて一晩インキュベーションした。PBS(-)にて洗浄後、FITCラベルされたヒツジ抗マウスIgG抗体(Sigma BioScience製品、MO, USA)[PBS(-)にて50倍希釈したもの]あるいはヤギ抗ウサギIgG抗体[Sigma BioScience製品、MO, USA、PBS(-)にて50倍希釈したもの]を加え、室温にて30分間インキュベーションした。PBS(-)にて洗浄後、封入して蛍光顕微鏡にて組織での発現分布の観察と写真撮影を行った。

参考文献

- 1 Nishiyama T, Tsunenaga M, Nakayama Y et al. Growth rate of human fibroblasts is repressed by the culture within reconstituted collagen matrix but not by the culture on the matrix. *Matrix* 1989; 9: 193-9.
- 2 Nishiyama T, Horii I, Nakayama Y et al. A distinct characteristic of the quiescent state of human dermal fibroblasts in contracted collagen gel as revealed by no response to epidermal growth factor alone, but a positive growth response to a combination of the growth factor and saikosaponin b1. *Matrix* 1990; 10: 412-9.
- 3 Nishiyama T, Akutsu N, Horii I et al. Response to growth factors of human dermal fibroblasts in a quiescent state owing to cell-matrix contact inhibition. *Matrix* 1991; 11: 71-5.
- 4 Nishiyama T, Tominaga N, Nakajima K et al. Quantitative evaluation of the factors affecting the process of fibroblast-mediated collagen gel contraction by separating the process into three phases. *Coll Relat Res* 1988; 8.
- 5 Nishiyama T, Tsunenaga M, Akutsu N et al. Dissociation of actin microfilament organization from acquisition and maintenance of elongated shape of human dermal fibroblasts in three-dimensional collagen gel. *Matrix* 1993; 13: 447-55.
- 6 Schor SL. Cell proliferation and migration on collagen substrata in vitro. *J Cell Sci* 1980; 41: 159-75.
- 7 Paye M, Nusgens BV, Lapiere CM. Modulation of cellular biosynthetic activity in the retracting collagen lattice. *Eur J Cell Biol* 1987; 45: 44-50.
- 8 Hayashi T, Nishiyama T, Adachi E. Collagen as a potent regulator for cellular activity collagen matrix-to-cell contact inhibition. Kyoto: Kagaku-Dojin, 1991.
- 9 Mauch C, Hatamochi A, Scharffetter K et al. Regulation of collagen synthesis in fibroblasts within a three-dimensional collagen gel. *Exp Cell Res* 1988; 178: 493-503.
- 10 Le Panse R, Mitev V, Houdebine LM et al. Protein kinase C-independent activation of mitogen-activated protein kinase by epidermal growth factor in skin fibroblasts. *Eur J Pharmacol* 1996; 307: 339-45.
- 11 Haas TL, Davis SJ, Madri JA. Three-dimensional type I collagen lattices induce coordinate expression of matrix metalloproteinases MT1-MMP and MMP-2 in

- microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 3604-10.
- 12 Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med* 1962; 115: 453-66.
- 13 Ellis I, Banyard J, Schor SL. Differential response of fetal and adult fibroblasts to cytokines: cell migration and hyaluronan synthesis. *Development* 1997; 124: 1593-600.
- 14 Schor SL, Schor AM, Grey AM et al. Foetal and cancer patient fibroblasts produce an autocrine migration-stimulating factor not made by normal adult cells. *J Cell Sci* 1988; 90: 391-9.
- 15 Grey AM, Schor AM, Rushton G et al. Purification of the migration stimulating factor produced by fetal and breast cancer patient fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 2438-42.
- 16 Mauron J. The Maillard reaction in food; a critical review from the nutritional standpoint. *Prog Food Nutr Sci* 1981; 5: 5-35.
- 17 Fu MX, Wells-Knecht KJ, Blackledge JA et al. Glycation, glycooxidation, and cross-linking of collagen by glucose. Kinetics, mechanisms, and inhibition of late stages of the Maillard reaction. *Diabetes* 1994; 43: 676-83.
- 18 Sell DR, Monnier VM. Isolation, purification and partial characterization of novel fluorophores from aging human insoluble collagen-rich tissue. *Connect Tissue Res* 1989; 19: 77-92.
- 19 Tanaka S, Avigad G, Brodsky B et al. Glycation induces expansion of the molecular packing of collagen. *J Mol Biol* 1988; 203: 495-505.
- 20 Andreassen TT, Oxlund H, Danielsen CC. The influence of non-enzymatic glycosylation and formation of fluorescent reaction products on the mechanical properties of rat tail tendons. *Connect Tissue Res* 1988; 17: 1-9.
- 21 Kohn RR, Cerami A, Monnier VM. Collagen aging in vitro by nonenzymatic glycosylation and browning. *Diabetes* 1984; 33: 57-9.
- 22 Galeski A, Kastelic J, Baer E et al. Mechanical and structural changes in rat tail tendon induced by alloxan diabetes and aging. *J Biomech* 1977; 10: 775-82.
- 23 Torp S, Baer E, Friedman B. Effects of age and of mechanical deformation on the ultrastructure of tendon. London: Butterworths, 1975.
- 24 Bai P, Phua K, Hardt T et al. Glycation alters collagen fibril organization. *Connect Tissue Res* 1992; 28: 1-12.
- 25 Kawano E, Takahashi S, Sakano Y et al. Nonenzymatic glycation alters properties of collagen as a substratum for cells. *Matrix* 1990; 10: 300-5.

- 26 Nishikawa A, Taira T, Yoshizato K. In vitro maturation of collagen fibrils modulates spreading, DNA synthesis, and collagenolysis of epidermal cells and fibroblasts. *Exp Cell Res* 1987; 171: 164-77.
- 27 Howard EW, Benton R, Ahern-Moore J et al. Cellular contraction of collagen lattices is inhibited by nonenzymatic glycation. *Exp Cell Res* 1996; 228: 132-7.
- 28 Yoshizato K, Taira T, Shioya N. Collagen-dependent growth suppression and changes in the shape of human dermal fibroblasts. *Ann Plast Surg* 1984; 13: 9-14.
- 29 Muona P, Jaakkola S, Salonen V et al. Diabetes induces the formation of large diameter collagen fibrils in the sciatic nerves of BB rats. *Matrix* 1989; 9: 62-7.
- 30 Staatz WD, Fok KF, Zutter MM et al. Identification of a tetrapeptide recognition sequence for the alpha 2 beta 1 integrin in collagen. *J Biol Chem* 1991; 266: 7363-7.
- 31 Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 1984; 309: 30-3.
- 32 Yamada KM, Kennedy DW. Dualistic nature of adhesive protein function: fibronectin and its biologically active peptide fragments can autoinhibit fibronectin function. *J Cell Biol* 1984; 99: 29-36.
- 33 Yamato M, Yamamoto K, Hayashi T. Decrease in cellular potential of collagen gel contraction due to in vitro cellular aging : a new aging index of fibroblast with high sensitivity. *Connective Tissue* 1992; 24: 157-62.
- 34 Yamato M, Yamamoto K, Hayashi T. Age-related changes in collagen gel contraction by cultured human lung fibroblasts resulting in cross-over of contraction curves between young and aged cells. *Mech Ageing Dev* 1993; 67: 149-58.
- 35 Yamato M, Adachi E, Yamamoto K et al. Condensation of collagen fibrils to the direct vicinity of fibroblasts as a cause of gel contraction. *J Biochem (Tokyo)* 1995; 117: 940-6.
- 36 Tiollier J, Dumas H, Tardy M et al. Fibroblast behavior on gels of type I, III, and IV human placental collagens. *Exp Cell Res* 1990; 191: 95-104.
- 37 Tsunenaga M, Nishiyama T, Horii I et al. Effect of hyaluronate on physicochemical and biological properties of collagen solution which could be used as collagen filler. *Connect Tissue Res* 1992; 28: 113-23.

- 38 Snowden JM, Eyre DR, Swann DA. Vitreous structure. VI. Age-related changes
in the thermal stability and crosslinks of vitreous, articular cartilage and
tendon collagens. *Biochim Biophys Acta* 1982; 706: 153-7.
- 39 Schnider SL, Kohn RR. Effects of age and diabetes mellitus on the solubility
and nonenzymatic glucosylation of human skin collagen. *J Clin Invest* 1981;
67: 1630-5.
- 40 Kohn RR. Effects of age and diabetes mellitus on cyanogen bromide digestion
of human dura mater collagen. *Connect Tissue Res* 1983; 11: 169-73.
- 41 Keene DR, Lunstrum GP, Morris NP et al. Two type XII-like collagens localize
to the surface of banded collagen fibrils. *J Cell Biol* 1991; 113: 971-8.
- 42 Lunstrum GP, Morris NP, McDonough AM et al. Identification and partial
characterization of two type XII-like collagen molecules. *J Cell Biol* 1991;
113: 963-9.
- 43 Lunstrum GP, McDonough AM, Marinkovich MP et al. Identification and partial
purification of a large, variant form of type XII collagen. *J Biol Chem* 1992;
267: 20087-92.
- 44 Yamagata M, Yamada KM, Yamada SS et al. The complete primary structure of
type XII collagen shows a chimeric molecule with reiterated fibronectin type
III motifs, von Willebrand factor A motifs, a domain homologous to a
noncollagenous region of type IX collagen, and short collagenous domains with
an Arg-Gly-Asp site. *J Cell Biol* 1991; 115: 209-21.
- 45 Gerecke DR, Foley JW, Castagnola P et al. Type XIV collagen is encoded by
alternative transcripts with distinct 5' regions and is a multidomain protein
with homologies to von Willebrand's factor, fibronectin, and other matrix
proteins. *J Biol Chem* 1993; 268: 12177-84.
- 46 Sugrue SP, Gordon MK, Seyer J et al. Immunoidentification of type XII collagen
in embryonic tissues. *J Cell Biol* 1989; 109: 939-45.
- 47 Oh SP, Griffith CM, Hay ED et al. Tissue-specific expression of type XII
collagen during mouse embryonic development. *Dev Dyn* 1993; 196: 37-46.
- 48 Castagnola P, Tavella S, Gerecke DR et al. Tissue-specific expression of type
XIV collagen--a member of the FACIT class of collagens. *Eur J Cell Biol* 1992;
59: 340-7.
- 49 Walchli C, Koch M, Chiquet M et al. Tissue-specific expression of the
fibril-associated collagens XII and XIV. *J Cell Sci* 1994; 107: 669-81.
- 50 Trachslin J, Koch M, Chiquet M. Rapid and reversible regulation of collagen
XII expression by changes in tensile stress. *Exp Cell Res* 1999; 247: 320-8.

- 51 Nishiyama T, McDonough AM, Bruns RR et al. Type XII and XIV collagens mediate interactions between banded collagen fibers in vitro and may modulate extracellular matrix deformability. *J Biol Chem* 1994; 269: 28193-9.
- 52 Brown JC, Mann K, Wiedemann H et al. Structure and binding properties of collagen type XIV isolated from human placenta. *J Cell Biol* 1993; 120: 557-67.
- 53 Docherty R, Forrester JV, Lackie JM et al. Glycosaminoglycans facilitate the movement of fibroblasts through three-dimensional collagen matrices. *J Cell Sci* 1989; 92: 263-70.
- 54 Schor SL, Schor AM, Winn B et al. The use of three-dimensional collagen gels for the study of tumour cell invasion in vitro: experimental parameters influencing cell migration into the gel matrix. *Int J Cancer* 1982; 29: 5762.
- 55 Lethias C, Descollonges Y, Garrone R et al. Expression of type XIV collagen during the differentiation of fetal bovine skin: immunolabeling with monoclonal antibody is prominent in morphogenetic areas. *J Invest Dermatol* 1993; 101: 92-9.
- 56 Sasaki T, Akutsu N, Nishiyama T et al. Type XII collagen in human skin: studies on its localization with monoclonal antibodies. *Arch Dermatol Res* 1996; 289: 62-4.
- 57 Berthod F, Germain L, Guignard R et al. Differential expression of collagens XII and XIV in human skin and in reconstructed skin. *J Invest Dermatol* 1997; 108: 737-42.
- 58 Ellis IR, Schor SL. Differential effects of TGF-beta1 on hyaluronan synthesis by fetal and adult skin fibroblasts: implications for cell migration and wound healing. *Exp Cell Res* 1996; 228: 326-33.
- 59 Ellis I, Grey AM, Schor AM et al. Antagonistic effects of TGF-beta 1 and MSF on fibroblast migration and hyaluronic acid synthesis. Possible implications for dermal wound healing. *J Cell Sci* 1992; 102: 447-56.
- 60 Thomas L, Byers HR, Vink J et al. CD44H regulates tumor cell migration on hyaluronate-coated substrate. *J Cell Biol* 1992; 118: 971-7.
- 61 Sankar S, Mahooti-Brooks N, Hu G et al. Modulation of cell spreading and migration by pp125FAK phosphorylation. *Am J Pathol* 1995; 147: 601-8.
- 62 Hall CL, Wang C, Lange LA et al. Hyaluronan and the hyaluronan receptor RHAMM promote focal adhesion turnover and transient tyrosine kinase activity. *J Cell Biol* 1994; 126: 575-88.
- 63 Sakai LY, Keene DR, Morris NP et al. Type VII collagen is a major structural component of anchoring fibrils. *J Cell Biol* 1986; 103: 1577-86.

- 64 Labarca C, Paigen K. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* 1980; 102: 344-52.

表1 グルコースとインキュベーション後のコラーゲンのリジン、アルギニン、アスパラギン酸、グリシン、グルタミン酸及びアラニン残基数 (1000 残基数当たりの残基数)

グルコース濃度 (M)	反応時間 (日)	K	R	D	G	E	A
0.06	1	23	50	33	345	84	112
0.06	21	23	50	33	345	84	112
0.56	1	23	50	33	345	84	112
0.56	7	23	50	33	345	84	112
0.56	14	21**	45**	33	345	84	112
0.56	21	21**	45**	33	345	84	112
コントロール		23	50	33	345	84	112

グルコースとインキュベーション後のコラーゲングルに 6M HCl を加え、105℃にて 24 時間加水分解後、アミノ酸分析した。コントロールは、グルコースとインキュベーションしていないコラーゲングルである。K；リジン、R；アルギニン、D；アスパラギン酸、G；グリシン、E；グルタミン酸、及び、A；アラニン残基を示す。

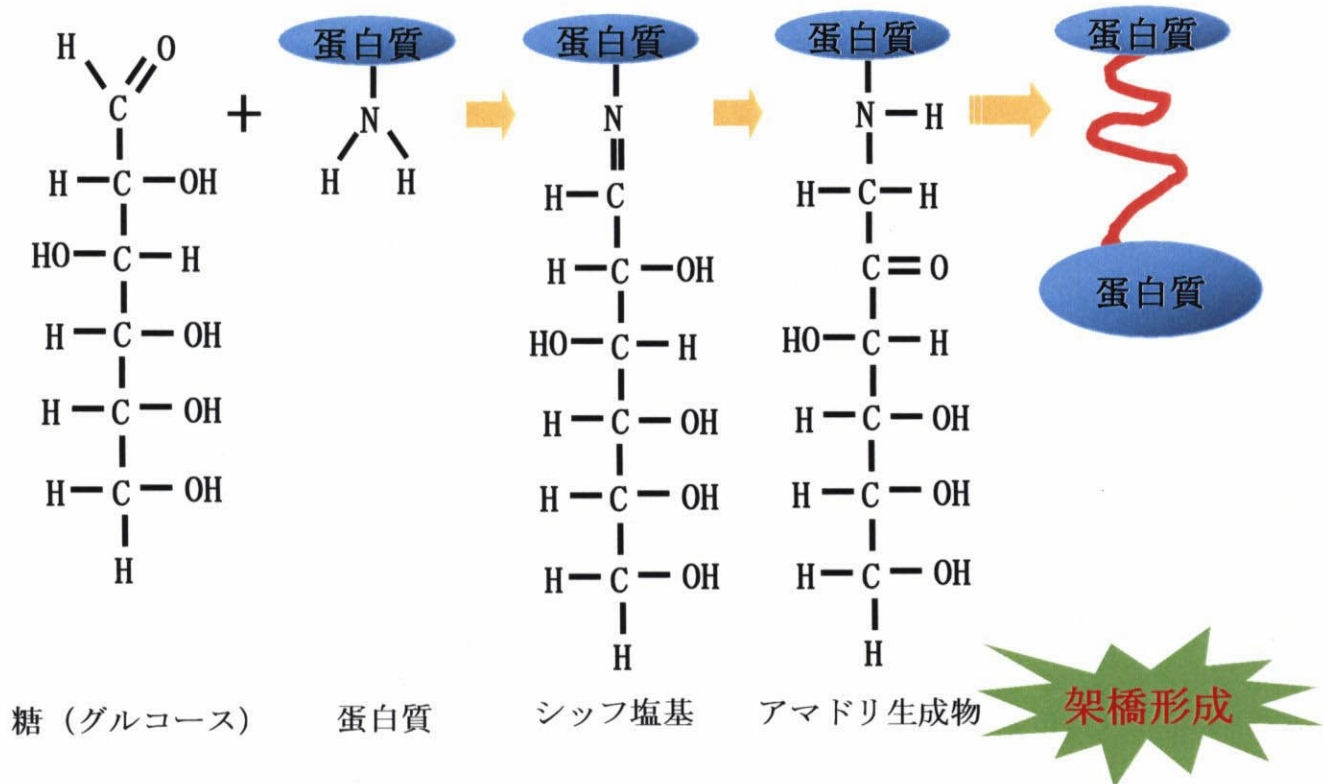
*有意差；p<0.05、**有意差；p<0.01

表2 グルコースとインキュベーション後のコラーゲンの酢酸溶解性、ペプシン分解性

溶解溶液	処理時間 (時間)	コントロールコラーゲンの不溶性物質の割合 (%)	グルコースとインキュベーション後のコラーゲンの不溶性物質の割合 (%)
酢酸	2	79.9±7.3	86.0±11.1
	6	76.2±4.5	85.2±4.2*
	22	11.2±1.2	86.0±6.0**
ペプシン/酢酸	2	89.6±5.8	102.7±17.6
	6	48.5±3.1	83.4±6.8**
	22	6.9±1.8	63.6±3.4**

0.56 M のグルコースにて 21 日間インキュベーションしたコラーゲングルを 0.5 M 酢酸あるいはペプシン溶液[10 mg/1 (0.5 M 酢酸)]中にて 2、6 及び 22 時間、室温にて振とうした。コントロールは、グルコースとインキュベーションしていないコラーゲングルである。5 サンプルの平均値と標準偏差±SD をプロットした。

*有意差；p<0.05、**有意差；p<0.01



コラーゲンのようなターンオーバーの長い蛋白質の場合には、糖化反応の寄与が大きい

図1 糖化反応

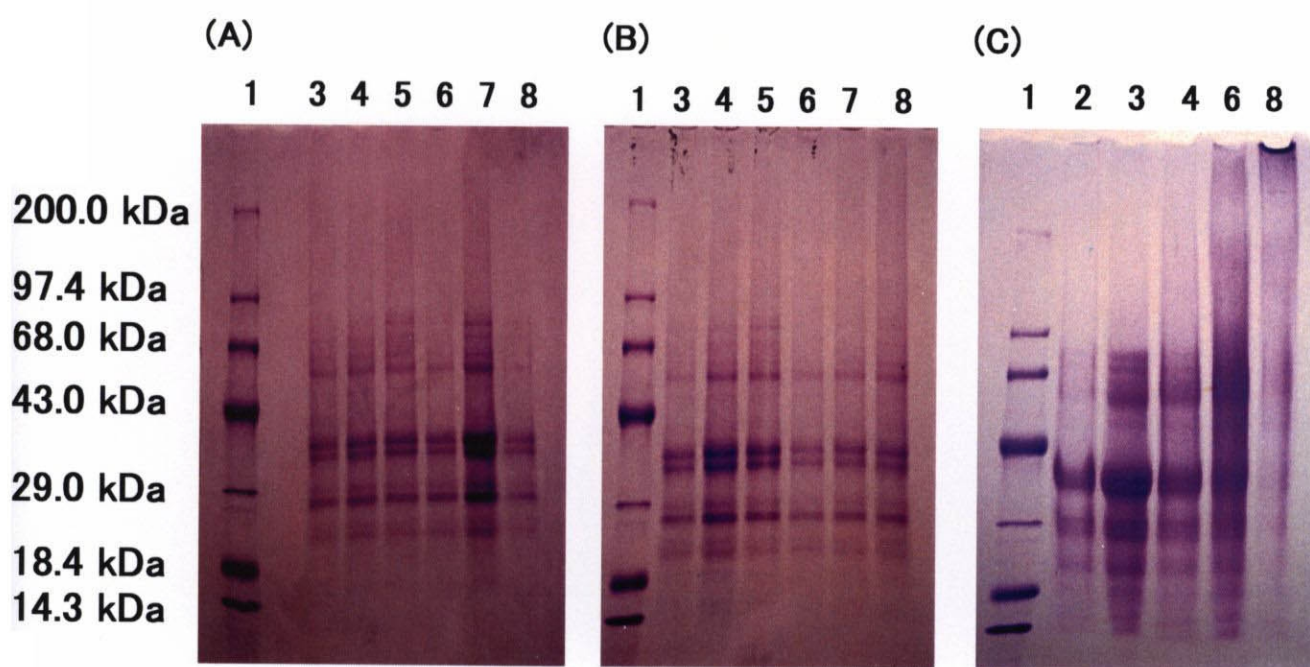


図2 コラーゲンゲルとグルコースのインキュベーションがコラーゲンゲルのCNBr分解後のペプチドバンドパターンへ及ぼす影響

コラーゲンゲルを0 (A)、0.06 (B) 及び0.56 M (C) のグルコース溶液にて1日 (レーン3)、3日 (レーン4)、5日 (レーン5)、7日 (レーン6)、14日 (レーン7) 及び21日間 (レーン8) インキュベーション後、PBSにて洗浄した。CNBr分解後、分解産物をSDS-PAGEにて解析した (ゲル濃度：4～20%)。レーン1：分子量マーカー、レーン2：コントロール (コラーゲン溶液)

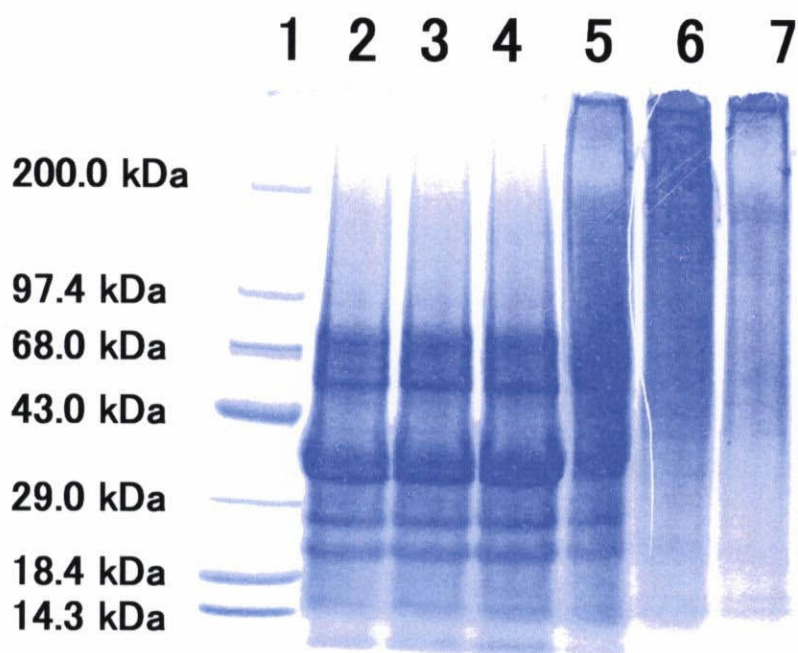
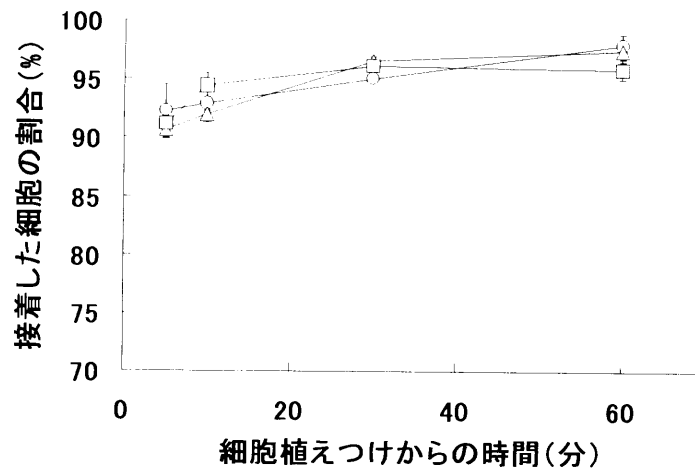


図3 コラーゲンゲルと NaIO_4 のインキュベーションが
コラーゲンゲルのCNBr分解後のペプチドバンドパターンへ
及ぼす影響

コラーゲンゲルを0 (レーン2)、0.01 (レーン3)、0.1 (レーン4)、0.5 (レーン5)、1.0 (レーン6)、2.0 mM (レーン7)の NaIO_4 にてインキュベーション後、PBSにて洗浄し、CNBr分解後、分解産物をSDS-PAGEにて解析した(ゲル濃度：4～20%)。レーン1：分子量マーカー

(A)



(B)

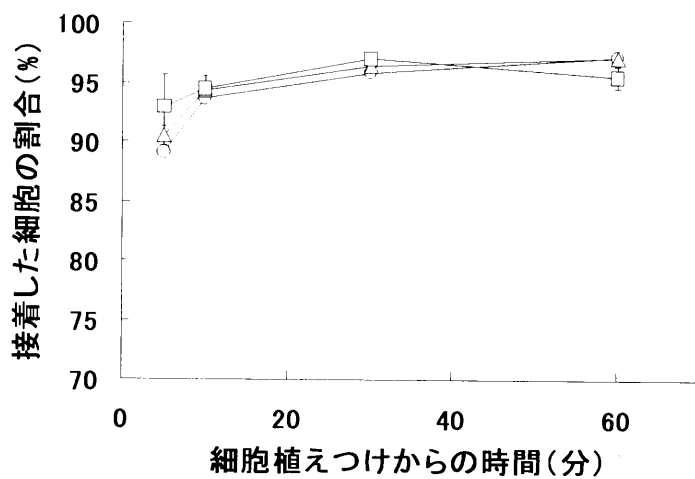


図4 コラーゲンゲルとグルコースのインキュベーションがコラーゲンゲル上での線維芽細胞接着活性へ及ぼす影響

コラーゲンゲルを0 (○)、0.056 (△) 及び0.56 M (□) のグルコース溶液にて1日 (A) あるいは21日間 (B) インキュベーションした。洗浄後、 1×10^5 細胞数の線維芽細胞を植えつけ、5、10、30及び60分後にゲル上に接着した細胞数を求めた。5サンプルの平均値と標準偏差 \pm SDをプロットした。

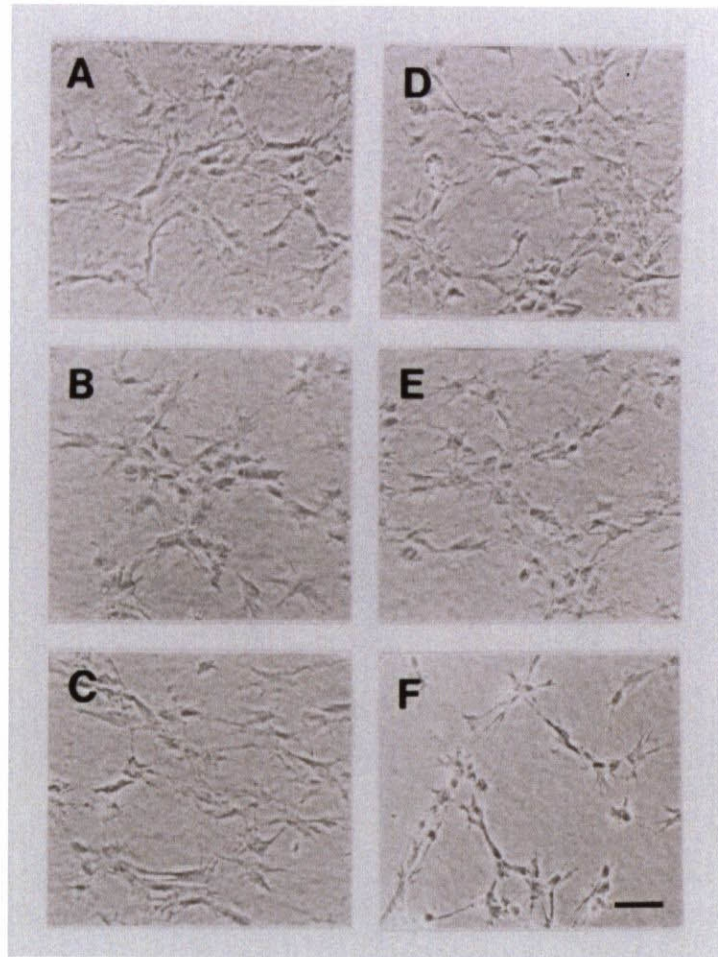


図5 コラーゲンゲルとグルコースのインキュベーションがコラーゲンゲル上での線維芽細胞伸展形態へ及ぼす影響

コラーゲンゲルを0 (A) 、0.006 (B) 及び0.56 M (C) のグルコース溶液にて1日、あるいは、0 (D) 、0.006 (E) 及び0.56 M (F) のグルコース溶液にて21日間インキュベーションした。洗浄後、 1×10^5 細胞数の線維芽細胞を植えつけ、6時間後の細胞伸展形態を写真撮影した。

バー：200 μm

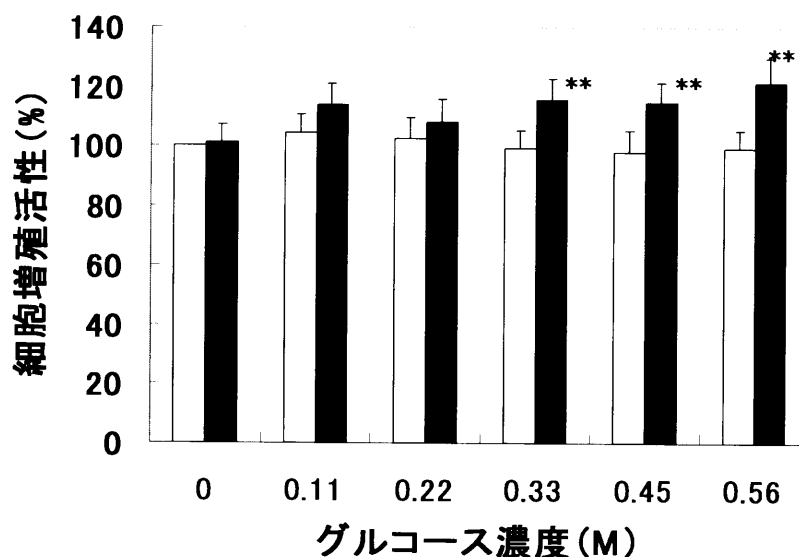


図6 コラーゲンゲルとグルコースのインキュベーションがコラーゲンゲル上での線維芽細胞増殖活性へ及ぼす影響

コラーゲンゲルをグラフ中にて示した濃度のグルコース溶液にて1日 (□)、21日間 (■) インキュベーションした。洗浄後、 1×10^5 細胞数の線維芽細胞を植えつけ、7日間培養後の細胞数を測定した。0 Mグルコース溶液とコラーゲンゲルを1日インキュベーションした場合の細胞数を100とした相対値を求めた。5サンプルの平均値と標準偏差 \pm SDをプロットした。0 Mのグルコースにて21日間インキュベーションしたコラーゲンゲルに対する有意差：* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$

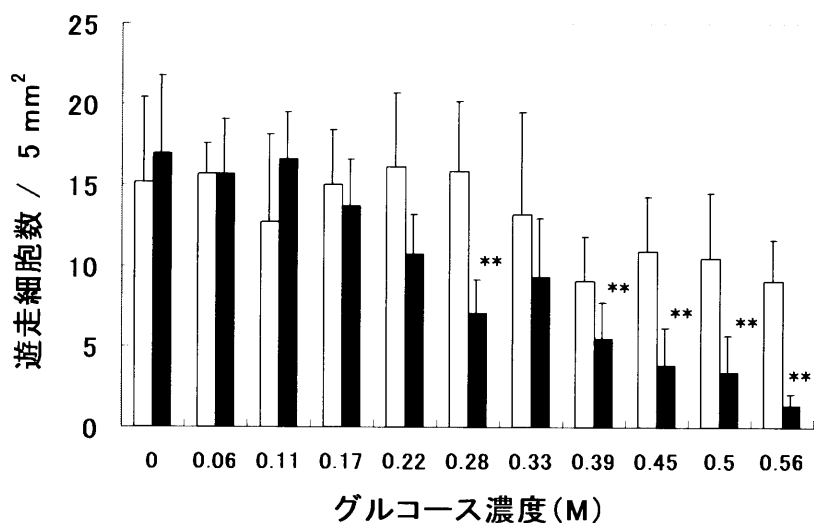


図7 コラーゲンゲルとグルコースのインキュベーションがコラーゲンゲル上からゲル中への線維芽細胞遊走活性へ及ぼす影響

コラーゲンゲルをグラフ中にて示した濃度のグルコース溶液にて1日 (□)、21日間 (■) インキュベーションした。洗浄後、 1×10^5 細胞数の線維芽細胞をコラーゲンゲル上へ植え付け、3日間培養した。ゲル表面から100 μm よりも深く遊走した細胞数を測定して、遊走細胞数とした。5サンプルの平均値と標準偏差 \pm SDをプロットした。0 Mのグルコース溶液にて21日間インキュベーションしたコラーゲンゲルに対する有意差：* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$

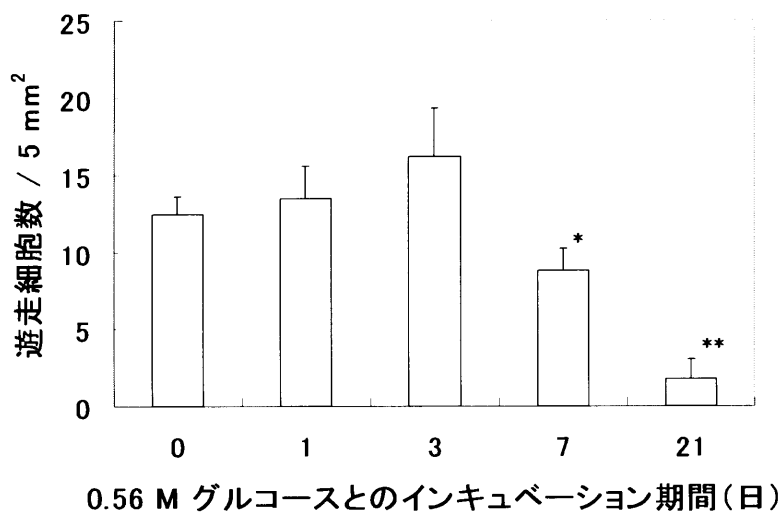


図 8 0.56 Mグルコースとコラーゲンゲルのインキュベーションがコラーゲンゲル上からゲル中への線維芽細胞遊走活性へ及ぼす影響

コラーゲンゲルを0.56 Mグルコース溶液にて、1、3、7及び21日間インキュベーションした。1x10⁵細胞数の線維芽細胞をコラーゲンゲル上に植えつけ、3日間培養し、ゲル中へ遊走した細胞数を測定した。5サンプルの平均値と標準偏差±SDをプロットした。非インキュベーションコラーゲンゲルに対する有意差：*p<0.05、**p<0.01

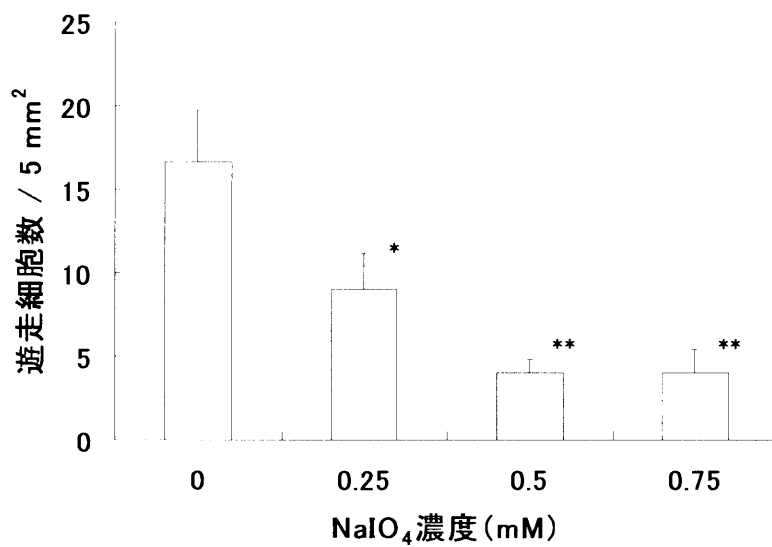


図9 コラーゲンゲルとNaIO₄のインキュベーションがコラーゲンゲル上からゲル中への線維芽細胞遊走活性へ及ぼす影響

コラーゲンゲルを0、0.25、0.50及び0.75 mMのNaIO₄にてインキュベーションした。洗浄後、1x10⁵細胞数の線維芽細胞をコラーゲンゲル上へ植えつけ、3日間培養し、遊走細胞数を測定した。5サンプルの平均値と標準偏差±SDをプロットした。NaIO₄未処理コラーゲンに対する有意差：*p<0.05、**p<0.01

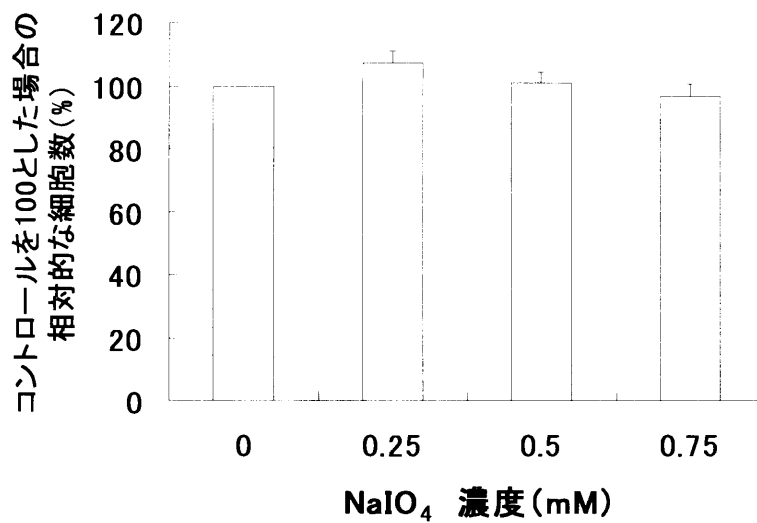


図 1 0 コラーゲンゲルとNaIO₄のインキュベーションがコラーゲンゲル上での線維芽細胞増殖活性へ及ぼす影響

コラーゲンゲルをグラフ中にて示した濃度のNaIO₄にてインキュベーションした。洗浄後、 1×10^5 細胞数の線維芽細胞をコラーゲンゲル上へ植えつけ、7日間培養し、細胞数を求めた。5サンプルの平均値と標準偏差 \pm SDをプロットした。

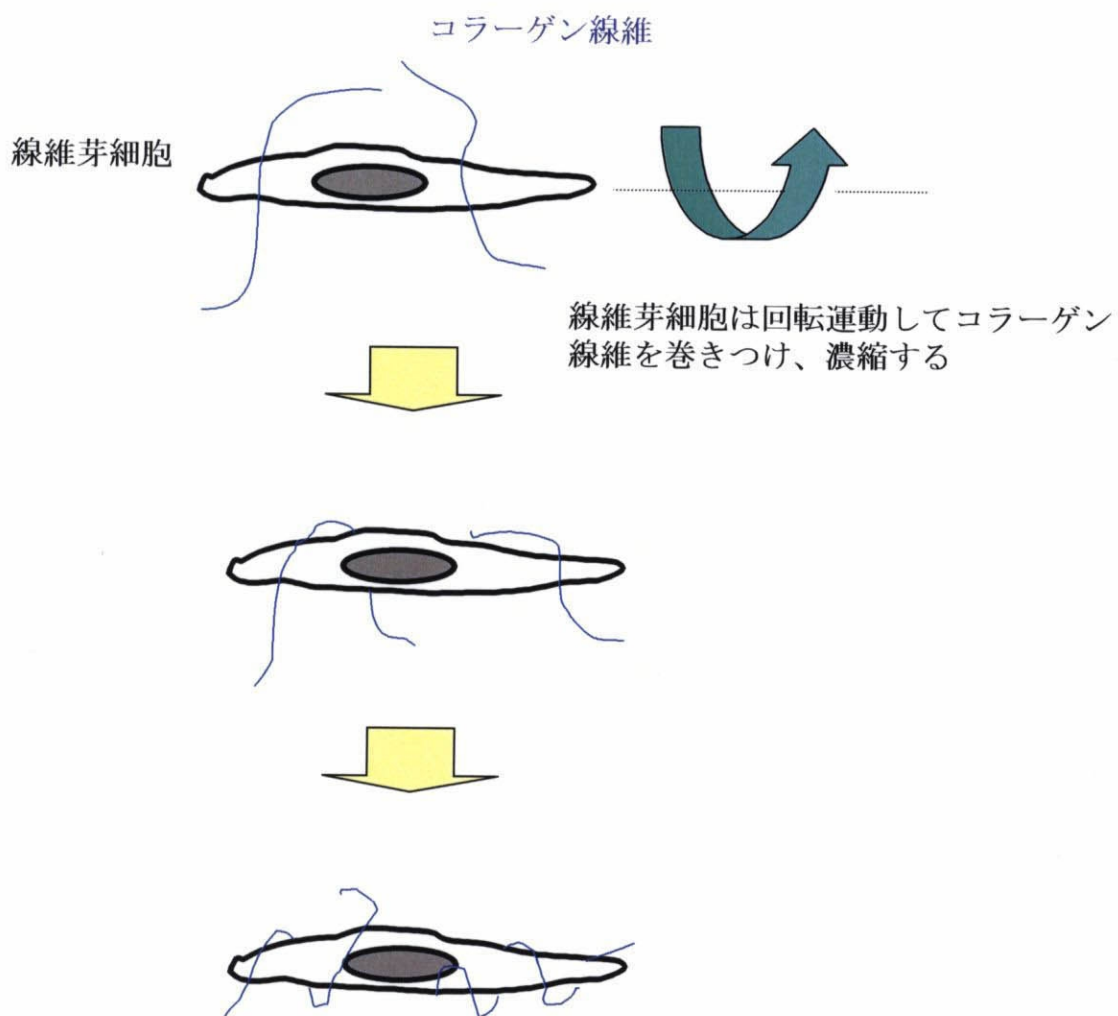
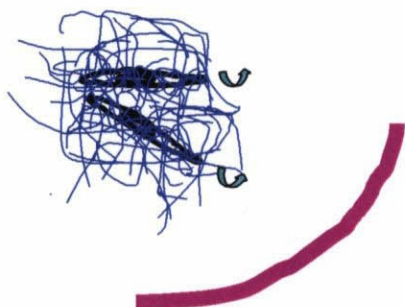
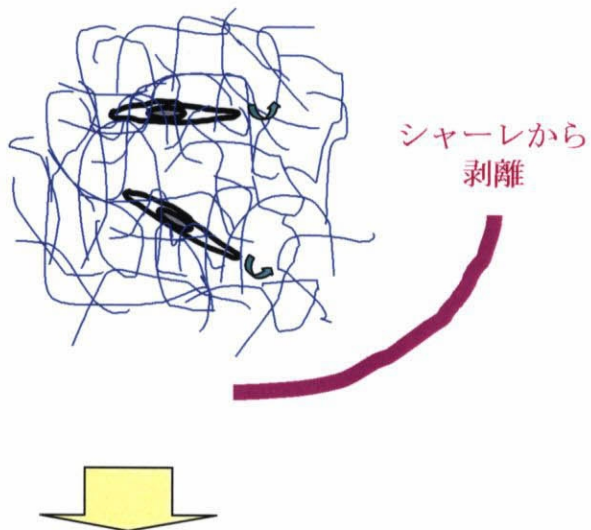
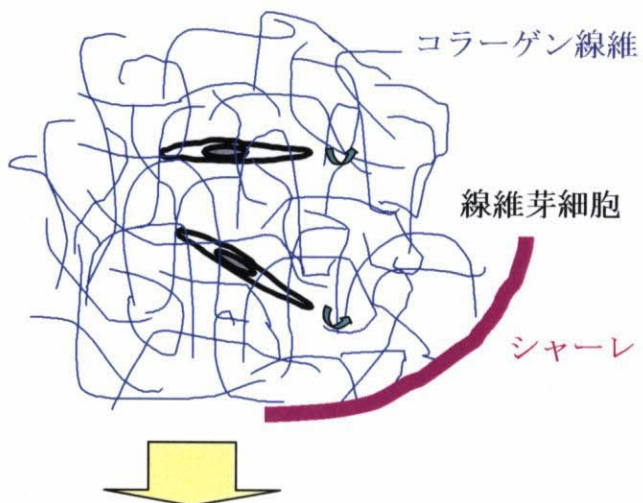


図 1 1 線維芽細胞が回転運動によりコラーゲン線維を巻きつける様子

(A) コラーゲングルとシャーレが
剥離した系

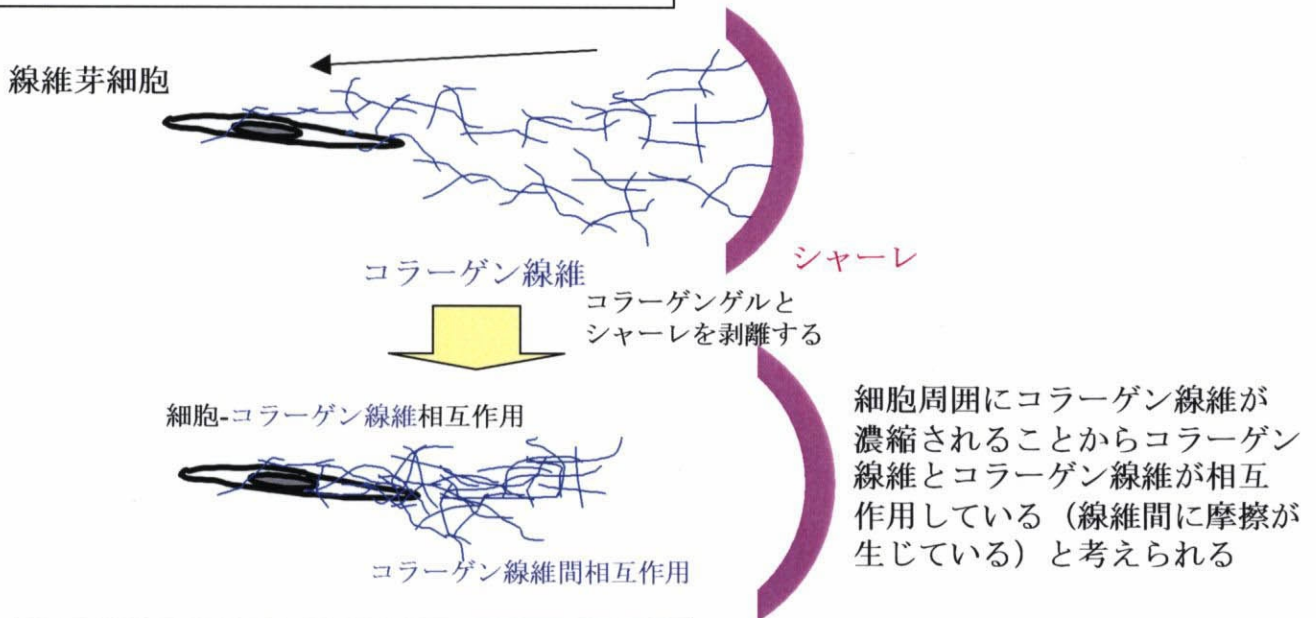
(B) コラーゲングルとシャーレが
付着した系



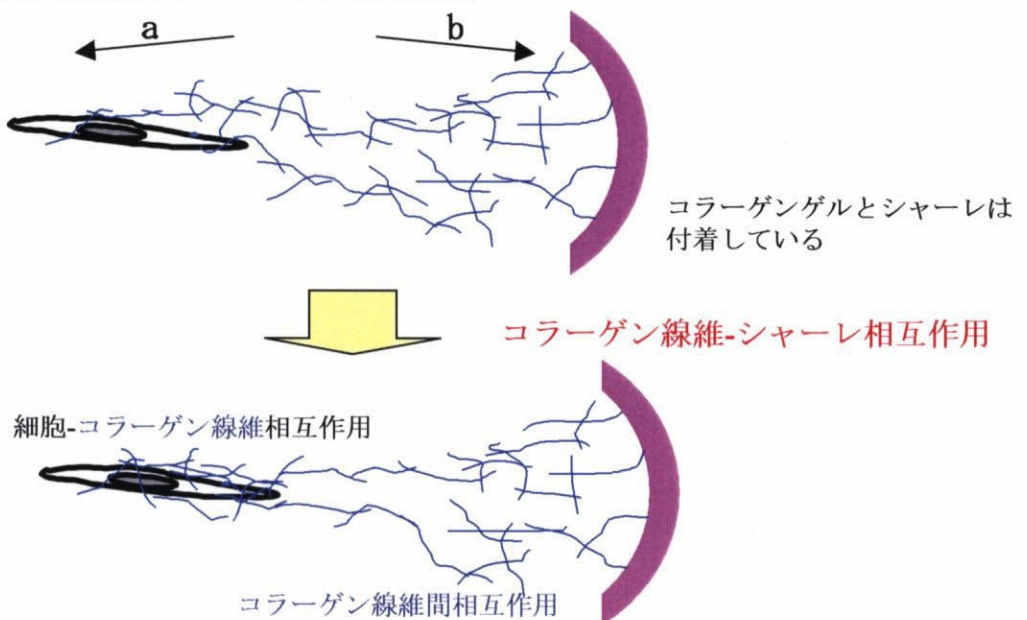
細胞は相互作用しているコラーゲン線維、その線維と相互作用している別のコラーゲン線維を細胞周囲に濃縮する

図12 コラーゲングルがシャーレから剥離された系とシャーレに付着している系での線維芽細胞の回転運動によるコラーゲン線維の巻きつけ

(A) コラーゲングルとシャーレが剥離した系



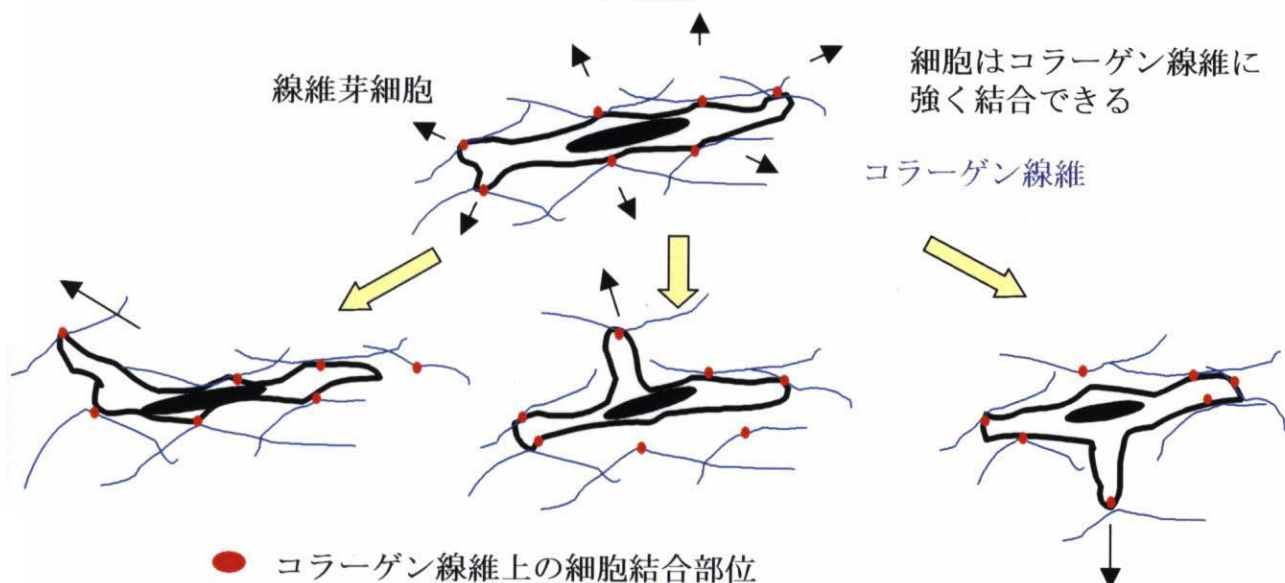
(B) コラーゲングルとシャーレが付着した系



コラーゲングルとシャーレが付着している場合にはコラーゲン線維-シャーレ間の相互作用が生じる。コラーゲン線維-細胞間相互作用、コラーゲン線維間相互作用 (a) により細胞近傍のコラーゲン線維は濃縮される。細胞から隔たった場所のコラーゲン線維は、コラーゲン線維-シャーレ間相互作用 (b) のために細胞周囲に濃縮されることはない

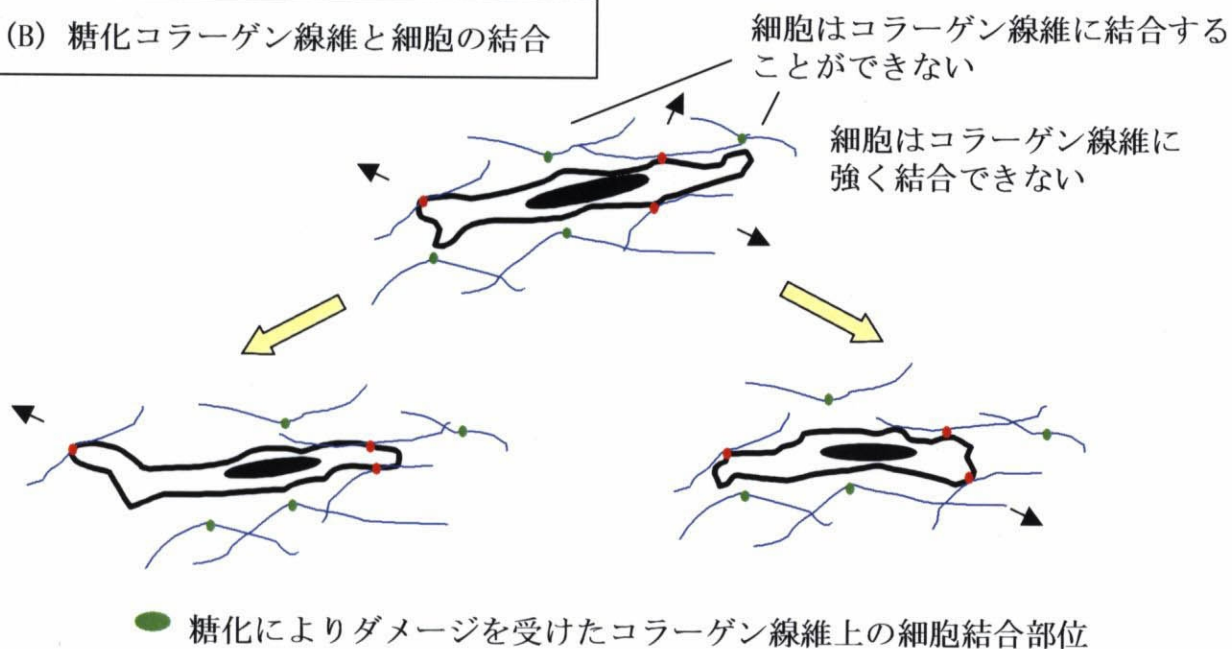
図 1 3 コラーゲン線維-細胞間、コラーゲン線維間、コラーゲン線維-シャーレ間相互作用が線維芽細胞の回転運動によるコラーゲン線維濃縮へ及ぼす影響

(A) 非糖化コラーゲン線維と細胞の結合



コラーゲン線維と細胞の結合部位数が多いと細胞はコラーゲン線維に強く結合できる。様々な方向へ運動することが可能になる

(B) 糖化コラーゲン線維と細胞の結合



糖化によりコラーゲン線維と細胞の結合部位数が減少すると細胞はコラーゲン線維と強く結合できなくなる。細胞の運動が制限される

図14 糖化によるコラーゲン線維と細胞の結合部位のダメージがコラーゲン線維と細胞の結合へ及ぼす影響

異なるコラーゲン線維間に形成される架橋

異なるコラーゲン線維を形成している異なるコラーゲン分子の
ポリペプチド鎖間に形成される架橋

コラーゲン線維

線維を構成している
コラーゲン分子

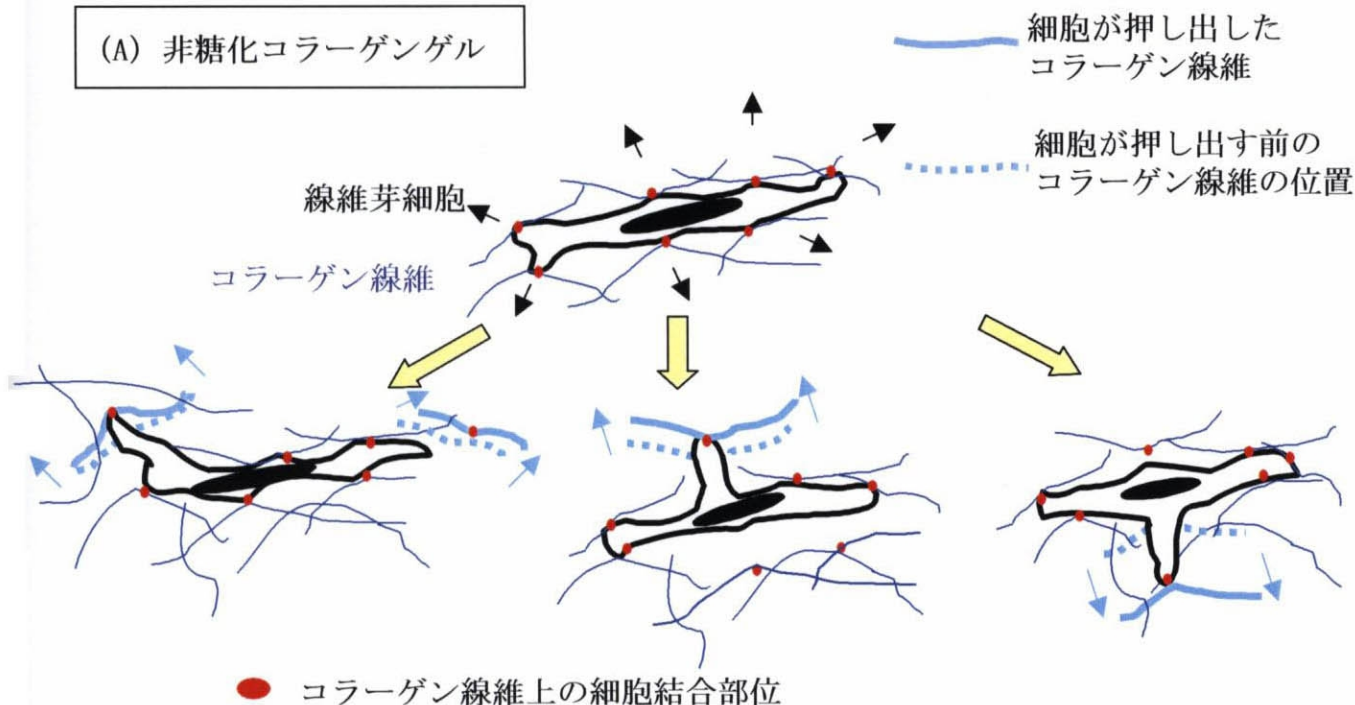
同じ線維の中の異なるコラーゲン分子をそれぞれ構
成しているポリペプチド鎖間に形成される架橋

コラーゲン分子を構成しているポリペプチド鎖間に
形成される架橋

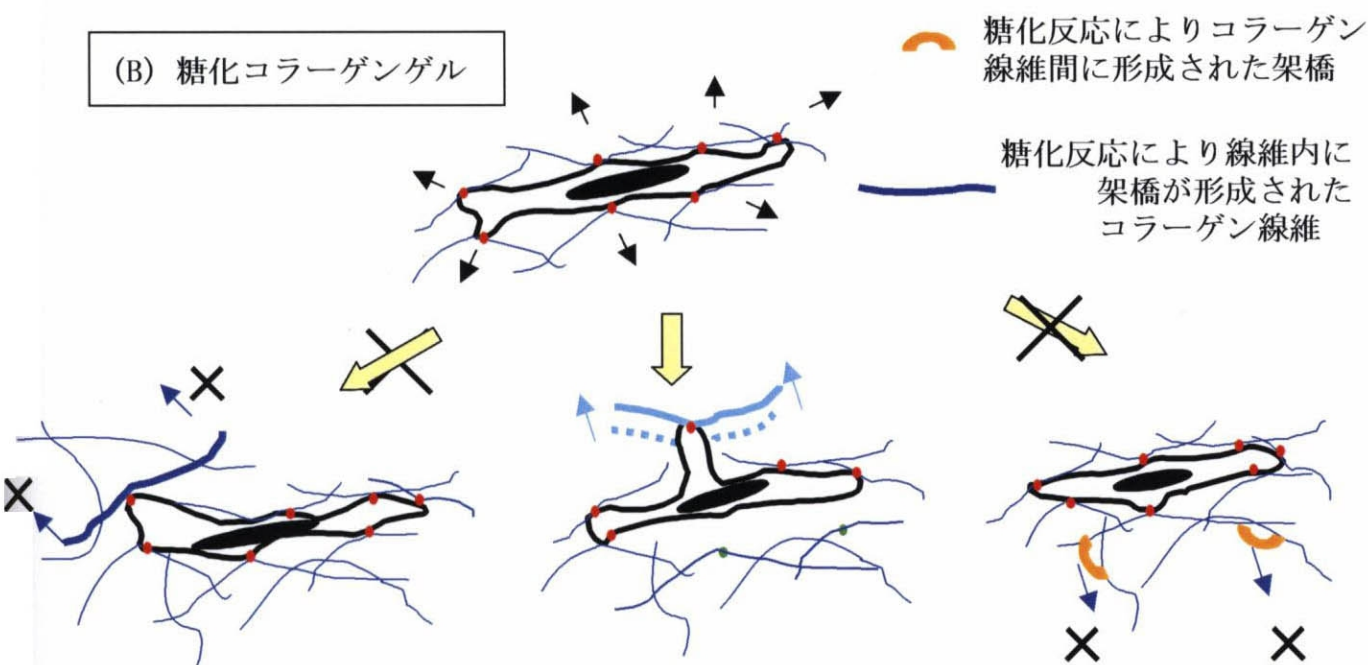
1本のコラーゲン線維中に形成される架橋

図15 糖化によりコラーゲン線維中、あるいは異なる
コラーゲン線維間に形成される架橋

(A) 非糖化コラーゲングル



(B) 糖化コラーゲングル

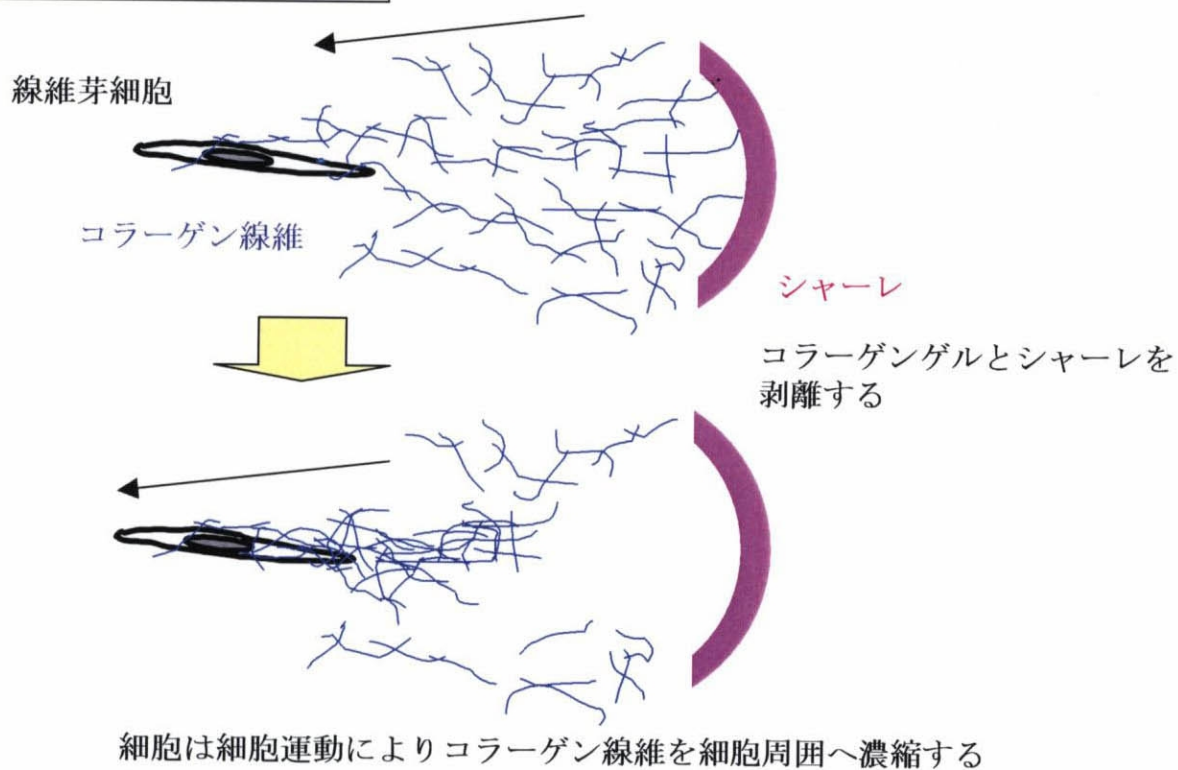


糖化反応により線維内に架橋が形成されたコラーゲン線維はフレキシビリティーが低下するため細胞による線維の押し出しが困難となる

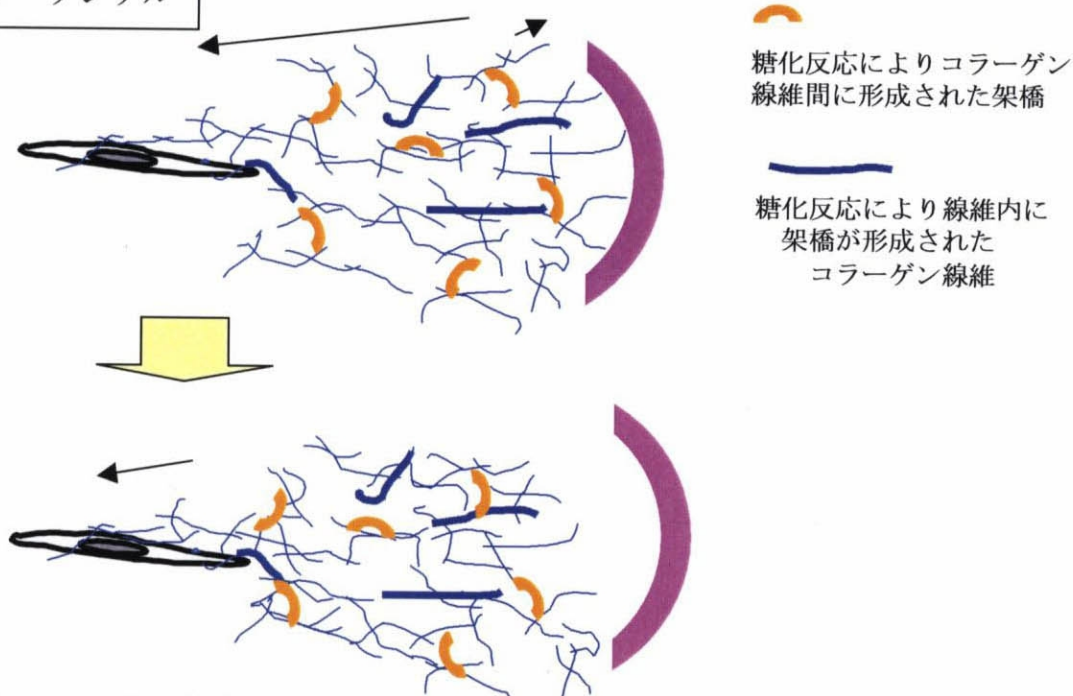
細胞がコラーゲン線維を押し出そうとしてもその線維と架橋を形成した他のコラーゲン線維にも力を及ぼさなければならなくなる 結果、線維を押し出しにくくなる

図 1 6 コラーゲングルの糖化がコラーゲングルの可塑性へ及ぼす影響

(A) 非糖化コラーゲングル



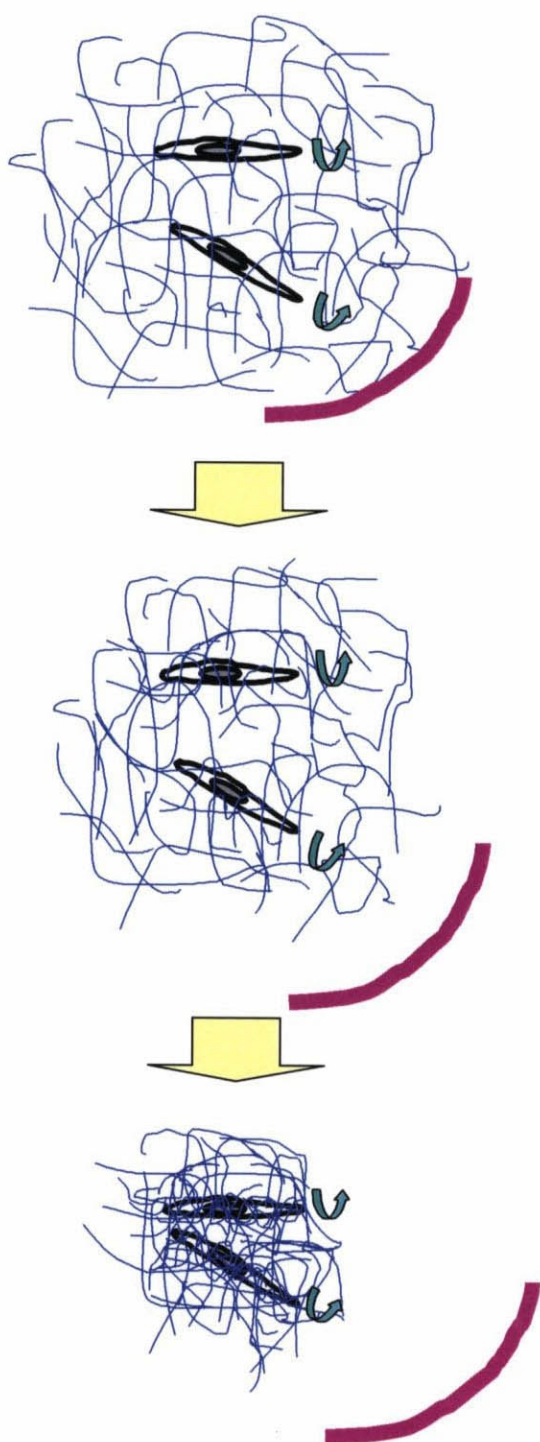
(B) 糖化コラーゲングル



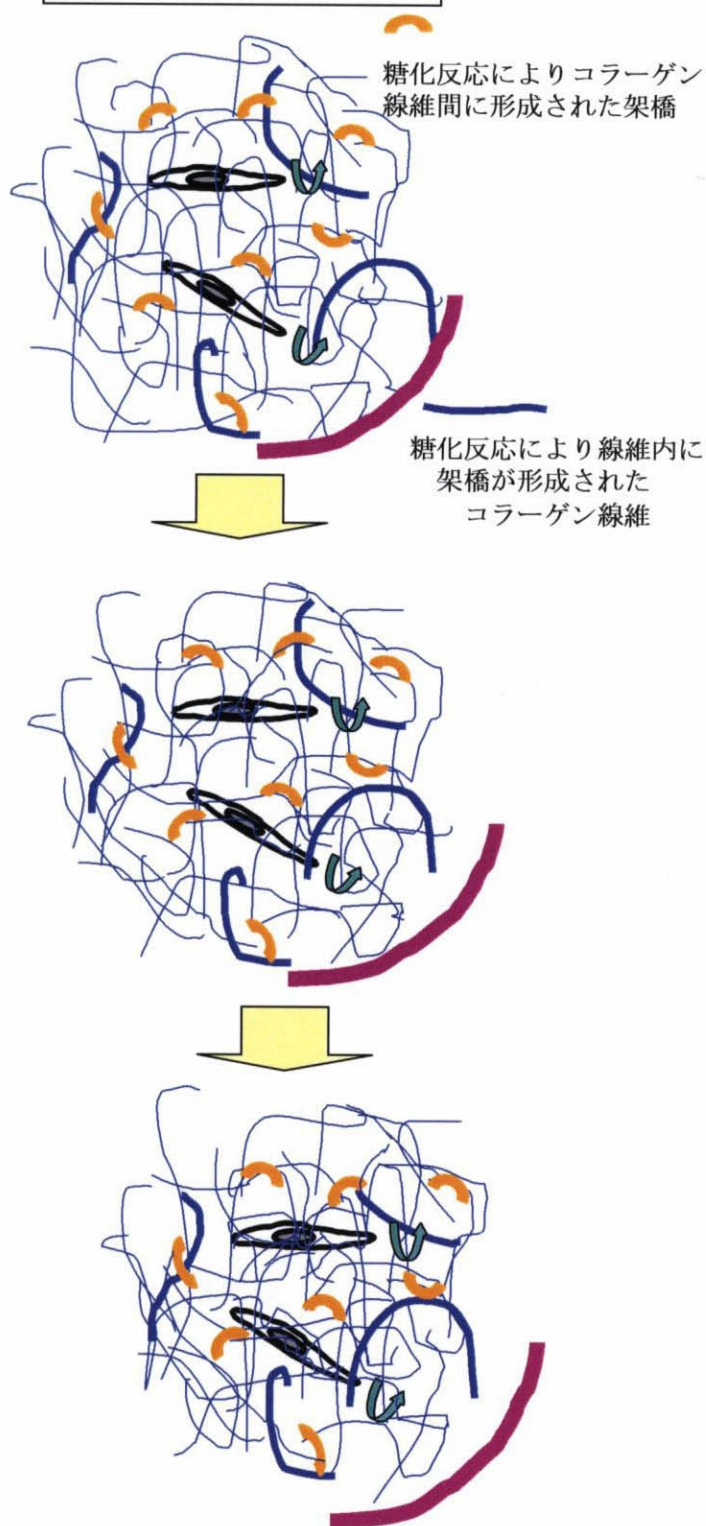
糖化によるコラーゲン分子間架橋の形成により、コラーゲン線維のフレキシビリティが低下し、コラーゲン線維間相互作用が増加するために細胞の運動によるコラーゲン線維の濃縮が困難となる

図 1 7 コラーゲングルの糖化が細胞の運動によるコラーゲン線維濃縮へ及ぼす影響

(A) 非糖化コラーゲングル



(B) 糖化コラーゲングル



糖化によりコラーゲン線維と細胞の結合部位数が減少し、コラーゲングルの可塑性が低下し、細胞の運動によるコラーゲン線維の濃縮が困難になるためにコラーゲングル収縮活性は抑制される

図 18 コラーゲングルの糖化が線維芽細胞のコラーゲングル収縮活性へ及ぼす影響

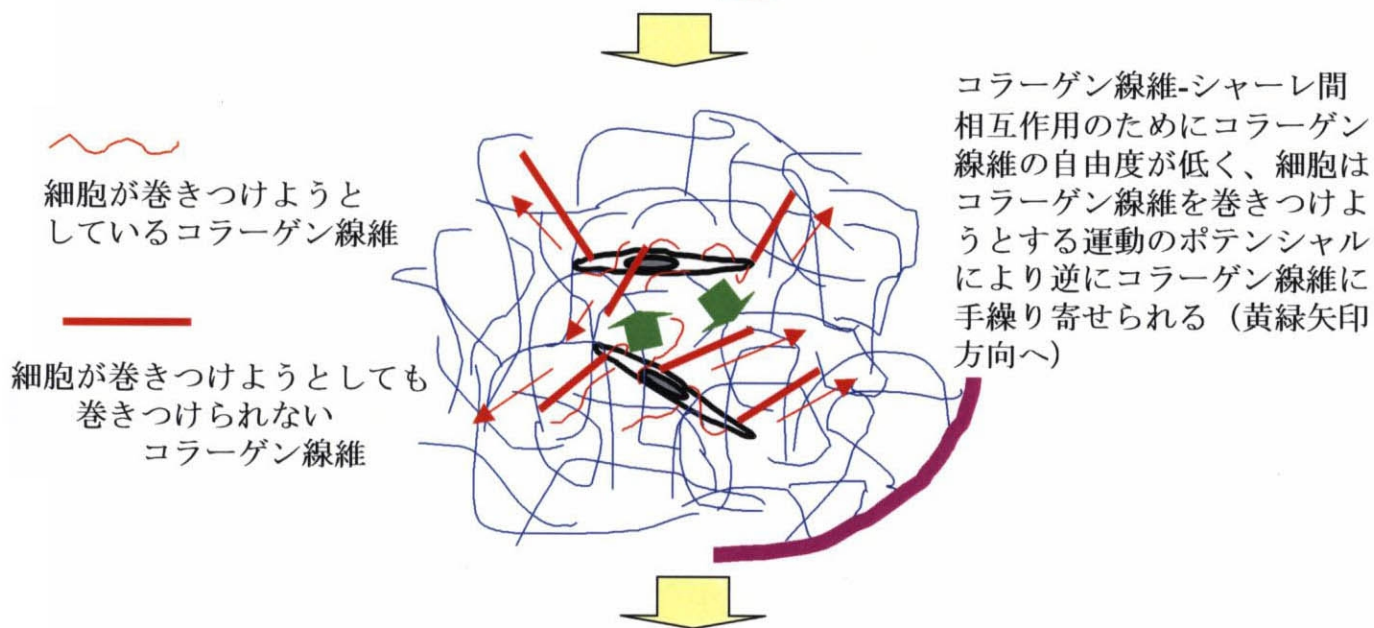
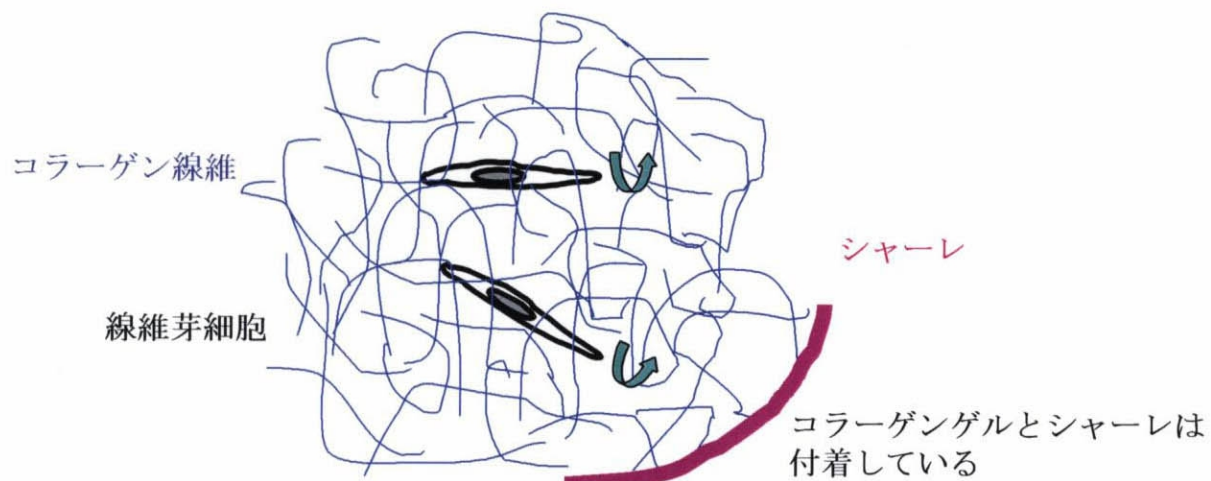
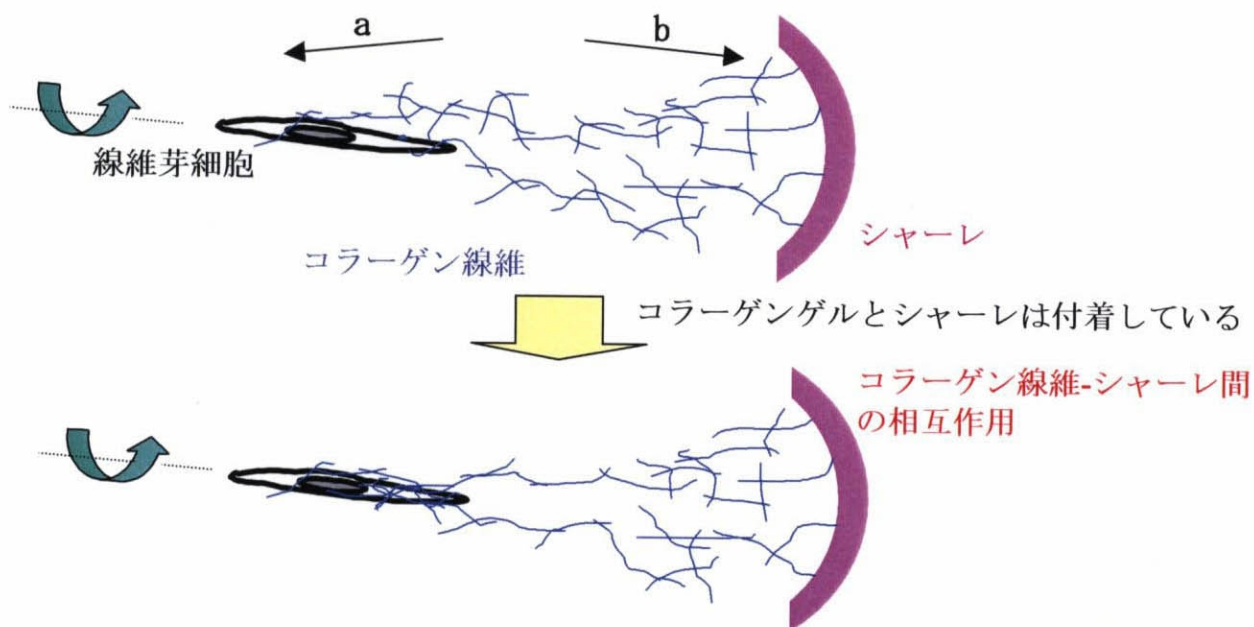


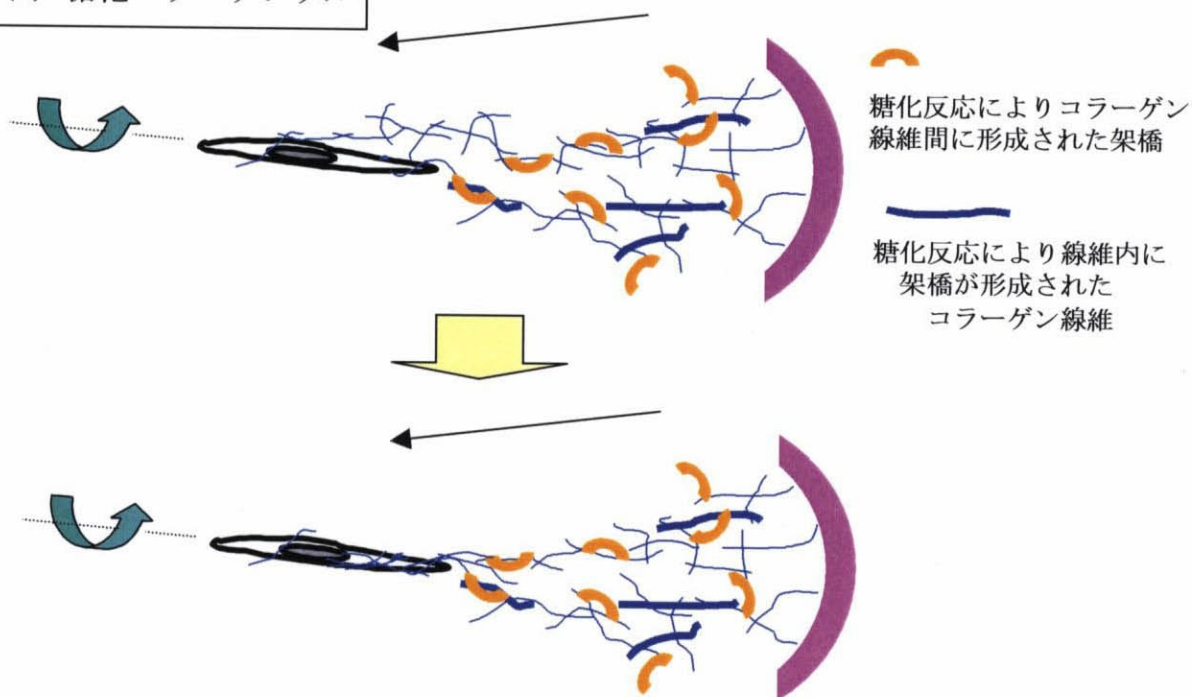
図 1 9 コラーゲングル中での線維芽細胞の遊走

(A) 非糖化コラーゲングル



細胞の回転運動によるコラーゲン線維を濃縮しようとするポテンシャルがある

(B) 糖化コラーゲングル



糖化によるコラーゲン分子間架橋の形成により、コラーゲン線維のフレキシビリティーが低下し、コラーゲン線維間相互作用が増加するために細胞の回転運動によるコラーゲン線維を濃縮しようとするポテンシャルが低下する

図 20 コラーゲングルの糖化が細胞の運動によるコラーゲン線維を濃縮しようとするポテンシャルへ及ぼす影響