

氏名	日向昌司
学位（専攻分野）	博士（理学）
学位記番号	総研大甲第25号
学位授与の日付	平成4年 3月16日
学位授与の要件	生命科学研究科 分子生物機構論専攻 学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	網膜色素上皮細胞のレンズ分化転換に関わる細胞外調節因子の解析
論文審査委員	主査 教授 江口吾朗 教授 長濱嘉孝 教授 鈴木義昭

論文内容の要旨

研究目的

ニワトリ胚網膜色素上皮細胞のレンズ細胞への分化転換は、フェニルチオウレアと精巢由来とアルロニダーゼの添加によって、著しく促進される。この発見を基礎として伊藤と江口（1986）は色素上皮細胞の分化転換を自由に操作できる実験系を確立した。色素上皮細胞は、フェニルチオウレアとヒアルロニダーゼの存在下で急速に分化形質を失い、脱分化状態となる。この状態の細胞は、更に培養を続けるとレンズ細胞に分化転換し、試薬を除いて培養すると色素上皮細胞に再分化する。この実験系は、特定の分化状態の細胞が均一に得られるので、生化学的、分子生物学的方法による解析が可能であり、多くの知見が得られつつある。しかし、それらの添加物によるレンズ分化転換効果の作用機序は、明確でなく、分化転換実験系で用いた市販のヒアルロニダーゼ標品は、酵素活性が同程度のロットであっても、分化転換促進効果に著しい差がある。本研究は、まず市販のヒアルロニダーゼ標品のロット差に注目し、以下に示す解析を行って、ヒアルロニダーゼの分化転換促進効果の本質を探ることを目的としたものである。

研究方法及び結果

市販のヒアルロニダーゼ標品（以下、粗ヒアルロニダーゼと表記する）6種についてSDS-PAGEで調査した結果、どの標品も多量かつ、それぞれ異なる混在物を含んでいた。そこで、粗ヒアルロニダーゼ中の混在物が分化転換を阻害している可能性を考え、ヒアルロニダーゼを精製し、分化転換促進効果を調査した。市販の粗ヒアルロニダーゼを出発材料として、ヒアルロン酸分解活性を指標に、2段階のイオン交換カラムクロマトグラフィーにより分画し、SDS-PAGEで62 kDaの単一バンドを示すヒアルロニダーゼに精製した。この精製したヒアルロニダーゼには、分化転換を促進する効果が認められなかった。この結果から、分化転換促進効果は、粗ヒアルロニダーゼに混在する未知の因子に依ることが強く示唆された。

粗ヒアルロニダーゼに混在する分化転換促進因子として、以下に示す理由により、塩基性繊維芽細胞成長因子(bFGF)を想定した。①ヒアルロニダーゼの精製過程で、塩基性蛋白質を多く含む画分が、分化転換促進効果を示した。したがって、未知の因子は、塩基性蛋白質である可能性が高い。②bFGFは、*in vitro*において様々な細胞種の分化を誘導する。また、bFGFは、*in vitro*において、網膜色素上皮細胞から神経性網膜の再生を引き起こさせる(Park and Hollenberg, 1980)。したがって、bFGFは、色素上皮細胞に作用し得る分子で、分化転換を促進する可能性も考えられる。③bFGFは、ウシ精巣より単離されている(Ueno *et al.*, 1988)。したがって、精巣由来ヒアルロニダーゼにbFGFが混在している可能性がある。

FGF は、ヘパリンに強く結合する性質を有するので、粗ヒアルロニダーゼをヘパリンセファロースカラムにより分画した。吸着画分Ⅱ(2M塩化ナトリウムで溶出)に、分化転換促進効果が認められた。この画分をSDS-PAGEで調査した結果、主に分子量18 kDaの蛋白質が見出された。この18 kDa蛋白質を更に逆相HPLCで精製し、気相シーケンサーでアミノ末端アミノ酸配列を分析し、15残基を決定した結果、ウシbFGFのアミノ末端アミノ酸配列と一致した。アミノ末端アミノ酸配列、ヘパリンとの結合性、及び分子量から、18 kDa蛋白質は、bFGFと同定された。

次に、bFGFが、色素上皮細胞のレンズ細胞への分化転換促進効果を示すか否かを調査するため、粗ヒアルロニダーゼをウシ脳由来bFGF及び酸性FGF(aFGF)に置き換えて、色素上皮細胞を培養した。その結果、bFGFとaFGFは、どちらもほぼ同等に濃度依存的な分化転換促進効果を示した。したがって、FGF は、フェニルチオウレアの存在下で、色素上皮細胞のレンズ細胞への分化転換を促進することが明らかとなった。

研究結果の考察及び結論

FGF は、神経性網膜由来の因子として眼組織で生理的に働き得ることが知られており、*in vitro*でレンズ上皮細胞のレンズ繊維細胞への分化を促進する(McAvoy and Chamberlain, 1989)。また、bFGFは、レンズ上皮細胞の細胞分裂を促進することも知られている(Gospodarowicz *et al.*, 1977)。これらの事実を踏まえると、色素上皮細胞のレンズ細胞への分化転換過程では、色素上皮

細胞がまずレンズ上皮細胞に分化転換し、それが増殖するのにFGFが有効に働く結果、分化転換を見かけ上促進している可能性が考えられる。一方、FGFが分化転換過程に直接関与している可能性も排除できない。細胞外基質の成分であるコラーゲン上で、色素上皮細胞のレンズ細胞への分化転換は、阻害される(Eguchi, 1976; Yasuda, 1978)。FGFは、コラゲナーゼやプラスミノージェンアクチベーターを誘導する(Moscatelli *et al.*, 1988; Presta *et al.*, 1986; Edwards *et al.*, 1987)。プラスミノージェンアクチベーターは、潜在型のコラゲナーゼを活性化する。また、プラスミノージェンアクチベーターや活性型コラゲナーゼは、細胞外基質成分やそのレセプターを破壊する。これらの事実を考察すると、色素上皮細胞のレンズ細胞への分化転換過程においても、FGFが、それらのプロテアーゼを誘導し、コラーゲンなどの細胞外基質が破壊される結果、分化転換過程に促進的に働く可能性示唆される。脱分化状態となった色素上皮細胞を電子顕微鏡で観察すると、わずかな細胞外基質成分しか存在しないことは、その可能性を裏付ける。

フェニルチオウレアの分化転換促進における作用機序についての解析は、それほど進んでいない。しかし、フェニルチオウレア存在下の培養色素上皮細胞は、細胞外基質成分であるチネイシンとラミニンの会合状態が変化している事実(児玉、未発表)、あるいは、細胞膜の機能が修飾されているという事実(Masuda and Eguchi, 1984)などを考え合わせると、やはり、この物質は、色素上皮細胞と細胞外基質との相互作用に何らかの影響を及ぼしていると考えられる。

本研究は、FGFが、フェニルチオウレアと共に働いて、色素上皮細胞のレンズ細胞への分化転換を著しく促進することを初めて明らかにした。また、FGFなどの環境因子の作用により、色素上皮細胞の細胞外基質が変化し、そのレンズ細胞への分化転換を効果的に促進される可能性を考察した。今後、この分化転換過程について細胞外基質の分子構成の解析を詳細に実施していくことによって、組織・細胞の分化形質の安定性・転換性の分子機構を解明する糸口が得られると考える。

論文の審査結果の要旨

脊椎動物の色素上皮細胞は細胞培養条件下で、レンズ細胞に分化形質を転換することが知られており、ニワトリ胚細胞について、この分化転換の全過程を人為制御することが可能な細胞培養実験系が確立されている。

申請者、日向昌司は、この実験系が細胞分化の調節機構を解析的に研究する上ですぐれたシステムであることに注目し、この実験系での培養環境の主要成分のひとつである精巢由来ヒアルロニダーゼの作用機作の解明しようとした。使用に供せられる酵素標品の色素上皮細胞からレンズ細胞への分化転換を促進する効果が、標品ロットによって著しく異なる事実に着目し、まず、ヒアルロニダーゼ標品の精製をおこない、ヒアルロニダーゼの酵素活性そのものには、分化転換促進効果が全く認められないこと、また、本酵素標品の分化転換促進作用は、酵素標品に含まれる不純物に帰せられることを明らかにした。次いで、ヒアルロニダーゼの酵素活性のない不純物をヘパリンカラムクロマトグラフィーによって分画し、各分画の分化転換促進効果を詳細に検討した。その結果、分子量18kDa の分子を含む唯一の画分に効果を認め、18kDa 分子のN末アミノ酸配列を決定し、ヒアルロニダーゼの分化転換促進作用が同酵素の標品に混在する微量の塩基性繊維芽細胞増殖因子(bFGF)に依ることを明らかにした。さらに、酸性FGF(aFGF)にも同様な作用のあることをも示した。

以上のごとく、本論文は、従来久しく未知であった精巢由来ヒアルロニダーゼの色素上皮細胞の分化転換促進作用の本体を明らかにした研究を内容とするもので、脊椎動物色素上皮細胞の分化転換の調節機構及びその因子を明かにしていく上で、非常に重要な発見であり、学位論文としての価値があると判断した。

また、提出された学位論文の内容を詳細に報告させ、論文の主要な部分について各審査委員が試問をおこない、申請者の研究の意義、独創性、得られた知見の学術的価値等を厳密に検討審査した。次いで、申請者の研究の背景となる関連研究の動向及び研究の基礎となる一般的知識について、試問をおこない、申請者の研究者としての独立性及びそのレベルを検討した。その結果、提出された学位論文の研究内容は、指導の下に申請者自身によってなされ、脊椎動物

色素上皮細胞の分化転換の調節機構を解明する上で学術的にも価値のあることが認められた。上記試験の結果、申請者は学位を取得するに値すると判定した。