

学 位 論 文 題 名

Study on Mechanism of Cryogelation

(クリオゲル形成の機構に関する研究)

学位論文内容の要旨

炎症性疾患血漿に見られるクリオゲル化現象は、細胞性 EDA(+)フィブロネクチン(EDA(+)FN)・血漿フィブロネクチン(pFN)・フィブリノーゲン(Fbg)・ヘパリン(HP)からなる熱可逆性の血漿ゲル化現象である。生体内におけるクリオゲルの形成は、関節炎症反応の促進、抹消血管の循環障害等に関与しているとされるが、その形成メカニズムに関しては明らかでない。本研究では、このクリオゲルを *in vitro* で再現し、その過程を物理化学的な測定（動的光散乱測定・濁度測定・円偏光二色性測定・透過電子顕微鏡観察）から解析することで、ゲル形成のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

まずクリオゲルを構成する成分を細胞および血漿から各々抽出・精製し、再び組成比を変えて混合した溶液中の会合体形成挙動について検討した。動的光散乱測定からは、温度変化に伴う流体力学的な会合体サイズの変化を検討した。FN/Fbg、FN/HP、Fbg/HP の 2 成分系溶液では温度依存的な変化は見られなかったが Fbg/FN/HP の 3 成分系では 15℃以下で会合体サイズの増加が見られ、30℃のサイズで規格化すると、5℃では pFN を含む場合で 17 倍、EDA(+)FN を含む場合では 2000 倍程度増加した(Fig.1)。これは、EDA(+)FN/HP 相互作用が Fbg 共存下で大きく作用することによると考えられた。濁度測定から温度変化に伴う会合体形成量の変化を検討した結果、Fbg/FN/pFN/EDA(+)FN/HP 4 成分系会合がゲル形成量が多く、得に FN 中の組成比(pFN : EDA(+)FN)がゲル形成に大きく関わるのがわかり、種々の検討からクリオゲル化最適条件はモル比換算で Fbg: EDA(+)FN: pFN: HP= 15 : 0.05 : 0.95 : 1であることを明らかにした。

次にクリオゲルの高次構造変化に関する情報を円偏光二色性分光測定により検討し、4 成分による最適会合体形成条件で Fbg の構造変化を確認した。Fbg 単独での測定結果は pFN を加えない系と同一であることから pFN による Fbg の構造変化作用が示唆された。この推測は、クリオゲル構造を透過型電子顕微鏡による直接観察(Fig. 3)からも支持され、最適会合体形成条件下で作成

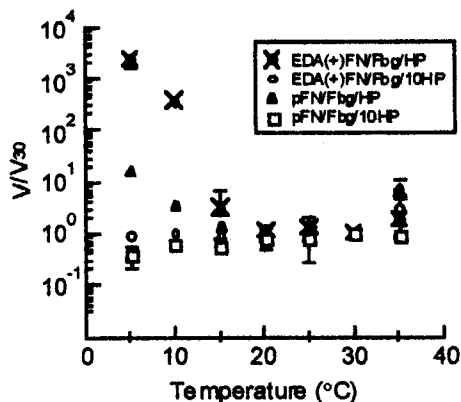


Fig. 1 The temperature-dependence of volume swelling ratio (V/V_{30}) of protein aggregation [Three-element (FN/HP/Fbg) solutions]. V/V_{30} was normalized to V at 30°C (V_{30}) at several temperatures. Sample solutions were diluted with 25mM HEPES (pH 7.6). Solution temperature was lowered from 35 to 5°C . Scattering angle was set at 90° . Fbg is 6.3×10^{-7} M, FN is 4.4×10^{-6} M, HP is 5.4×10^{-7} M (HP) and 5.4×10^{-6} M (10HP).

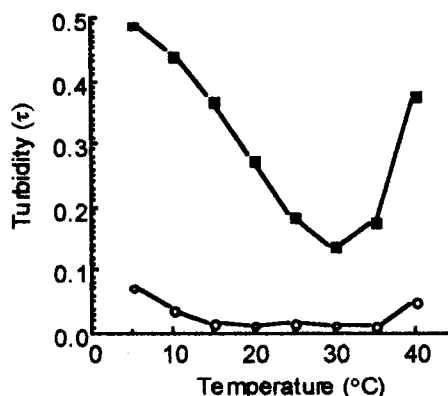


Fig. 2 The temperature-dependence of turbidity (τ) of protein mixture of four-element solutions, where τ was obtained for various concentrations of four-element (EDA(+)/FN/pFN/Fbg/Hep) solutions containing Fbg (2.5×10^{-4} M) and Hep (2.2×10^{-7} M). Other element concentrations were as follows: (○), EDA(+)/FN (1.8×10^{-7} M); (■), pFN (1.7×10^{-7} M) + EDA(+)/FN (8.9×10^{-8} M).

した溶液中 (b) では Fbg 粒子 (繊維) 間架橋した網目状構造が形成され、pFN を加えない系 (a) とは会合構造が明らかに異なることがわかった。

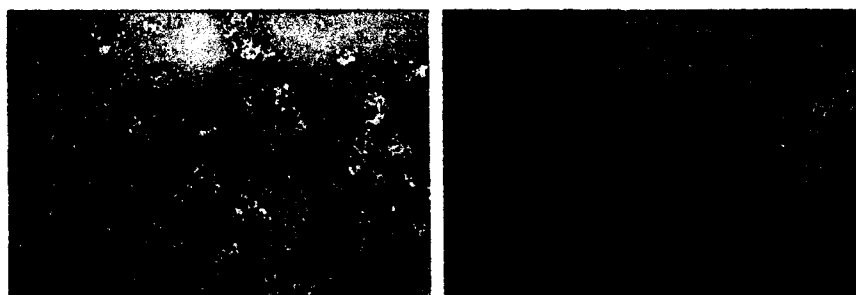


Fig. 3 Electron micrographs of negatively stained cryogel. Cryogel that formed on the grid surface at 4°C was dried before staining with 2% phosphorus-tungsten acid (negative staining). Electron micrograph of cryogel under several conditions. Magnification, $\times 10,000$.

以上の結果から、クリオゲルは Fbg の会合に対し EDA(+)/FN が HP を介して Fbg 粒子間を結合し、pFN による Fbg の構造変化がさらに会合体形成を促進することでマクロなネットワーク構造が構築されゲル化に至ると結論づけた。

正常血漿中の EDA(+)/FN 濃度は総 FN の 1% 以下にしか過ぎないが、炎症性疾患患者血漿中の EDA(+)/FN 比率は総 FN のおよそ 2~3% にまで増大している。本研究で明らかにしたクリオゲル形成最適条件は EDA(+)/FN が総 FN の 5% であり、患者血漿中の状態がゲル形成最適条件と良く一致していることは生体内の形成メカニズムのモデルに類似していると考えられる。

以上本研究によりクリオゲル形成の条件およびその会合構造を明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 紳一郎

副 査 教 授 駒 井 喬 (三重大学)

副 査 教 授 長 田 義 仁

副 査 助教授 佐々木 直 樹

学 位 論 文 題 名

Study on Mechanism of Cryogelation

(クリオゲル形成の機構に関する研究)

クリオゲル化現象は、自己免疫疾患や感染症などの炎症性疾患血漿に生じる熱可逆性の血漿ゲル化現象で、関節炎症反応の促進、抹消血管の循環障害等に関与しているとされるが、その詳細は明らかでない。本論文は、クリオゲル化現象の解明を目的に、*in vitro* でのクリオゲル再現過程を種々の物理化学的測定（動的光散乱・濁度・円偏光二色性・透過電子顕微鏡観察）を駆使してクリオゲルの形成機構という観点から実験・解析・考察を実施している。

はじめにクリオゲルを構成する成分（細胞性 EDA(+)フィブロンネクチン(EDA(+)FN)・血漿フィブロンネクチン(pFN)・フィブリノーゲン(Fbg)・ヘパリン(HP)) の混合溶液中の会合体形成挙動について検討している。動的光散乱測定により、温度変化に伴う流体力学的な会合体サイズの変化を検討した結果 EDA(+)FN と HP の相互作用が Fbg 共存下で大きく作用することで、会合体サイズが増大することを明らかにした。また濁度測定により、温度変化に伴う会合体形成量の変化を検討した結果、FN 中の組成比(pFN : EDA(+)FN)がゲル形成に最も影響することがわかり、クリオゲル化の最適条件を明らかにした。

次にクリオゲルの構造を円偏光二色性分光測定から検討し、pFN による Fbg の構造変化効果を発見した。また透過型電子顕微鏡による直接観察から、クリオゲル形成条件下では Fbg 粒子間で架橋した網目状構造が形成され、pFN を加えない系とは会合構造が全く異なることも明らかにした。

最後に以上の結果から、クリオゲルは Fbg の会合に対し EDA(+)FN が HP を介して Fbg 粒子間を結合し、pFN による Fbg の構造変化が更に会合体形成を促進することでマクロなネットワーク構造が構築され、その結果としてゲル化に至ると結論している。

以上のように申請者はクリオゲル形成条件とゲル構造に関する多くの知見を示した。即ち本論

文は、ウリオゲル形成機構解明に関する重要な発見と、生体内での炎症性疾患の病態解明に貢献する形成モデルの提案が含まれており、審査員一同はこれらの成果を高く評価し、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認めた。