

学 位 論 文 題 名

ウシ後産の細胞外マトリックスに関する研究

－羊膜コラーゲンの細胞生物学的性状－

学位論文内容の要旨

胎盤は、胎子の発育に必要不可欠な臓器として妊娠中は機能しているが、出産後には排出され、後産となる。ウシ後産は、絨毛膜と羊膜によって構成されており、全てが胎子成分からなる特殊な畜産副生物である。再生医学や組織工学の分野では、免疫寛容の誘導性、成長因子の捕捉性、未分化ゆえの多能性等に加え、細胞外マトリックスに富んだ組織として、特に羊膜組織が多様な利用が可能な生体材料として期待されている。しかし、特殊であるがゆえに実用化に向けた研究や臨床応用に必要な、羊膜の組織構造や構成要素の性状に関する知識がほとんど蓄積されていない。そこで本研究では、羊膜細胞外マトリックスの主構成要素であるコラーゲンに注目し、細胞培養、形態学、生化学的手法により羊膜、特にコラーゲンの細胞生物学的性状を明らかにすることを目的とし、以下の知見を得た。

1. ウシ後産の羊膜は、上皮細胞層、緻密層、線維芽細胞層の三層により形成された無血管、無神経組織であった。また、厚さ 100 ～ 150 μm の半透明性薄膜である羊膜は、面積が2倍になる程の伸縮性を示したが、限界を超えた場合には破水時の破裂方向である胎子の体軸方向に裂ける性状を有していた。
2. 上皮細胞層は、発達した微絨毛を有する単層立方上皮の細胞間連結装置による敷石状の外観を呈しており、免疫染色の結果、スーパーファミリータンパク質であるコラーゲンの大半の型が存在していることが明らかになった。この上皮細胞の多様なコラーゲン産生能は培養系においても確認され、角質化細胞の成長培地を用いた培養時には発達した微絨毛を有し敷石状を呈した羊膜上皮細胞は、間葉系細胞の成長培地下では微絨毛が退行し、形状が紡錘形化して線維芽細胞様の外観を呈する一方、線維芽細胞が特異的に発現するとされている間質コラーゲンの産生量が増加した。従って、羊膜上皮細胞は、環境の変化に対応して形質が変化する未分化な多能性細胞と判断された。
3. 緻密層は、羊水の防波堤の役割を果しており、本研究で検索した全 13 種のコラーゲンが共存する成体の組織では未だ報告されていない特異な結合組織であることが免疫染色像により明らかとなった。走査電子顕微鏡（SEM）による観察においてコラーゲン細線維は、緻密層表面では屈曲してランダムで密なネットワークを形成しており、断面ではほとんどが胎子の体軸および羊膜腔面に並走していた。しかし、緊密に束ねられた直線的な細線維束は少なく、コラーゲン細

線維の多くは緩やかに集合し波打って走行しており、このことが、羊膜の伸縮性と引裂方向に反映していると考えられた。さらに、この緻密層コラーゲンの特異な立体構造は、胎子が急速に成長する胎齢5ヶ月以降に形成・発達したもので、その組織化には胎子の成長に伴って急増する羊水の圧力、V型およびVI型コラーゲンが密接に関与していた。また、量的には少ない多くの型のマイナーコラーゲンの共存は、I、III、V、VI型の間質コラーゲンを主体とした羊膜緻密層の膜状構造の強度増加に構造的にも生化学的にも寄与していると考えられた。

4. 羊膜の絨毛膜への結合装置である線維芽細胞層は、体軸に対してはランダムだが羊膜腔面に対して層板状あるいは扁平な蜂の巣状に緩く束ねられたコラーゲン細線維のネットワークで形成されており、羊膜の高い伸縮性に寄与し、緻密層の補強装置として、また、緻密層が組織化されていない胎齢5ヶ月では、上皮細胞層の支持組織として機能していた。さらに、この線維芽細胞層のコラーゲンネットワークは、I型コラーゲンを含まずIII、V、VI型コラーゲンを主体として短鎖コラーゲンであるVIII、X型コラーゲンを含めて形成されており、緻密層同様、成体の組織では見られない特異な結合組織であった。
5. 緻密層と線維芽細胞層に存在する細胞は、羊膜上皮細胞から分化した線維芽細胞であったが、初代単層培養下で老化細胞様のアメーバ状形態を示し、成熟組織特有の間質コラーゲンの産生しか確認されなかったことから、未分化な上皮細胞とは逆に、線維細胞と呼ぶべき分化段階に達した細胞と判断された。
6. 羊膜のコラーゲンは、総タンパク質量の70%以上を占めており、タンパク質変性剤だけではなくペプシンあるいはコラゲナーゼによるプロテアーゼ処理によってもその80%近くが可溶化されない高い不溶性を有していた。一方、可溶化したコラーゲンは、*in vitro*での生理的条件下で再線維化するコラーゲンの割合は少ないが、高い線維形成活性を示し、組成的にはI型コラーゲン含量が最も高いが、再線維形成能を有する天然型のIII、V、VI型コラーゲンが各々容易に単離・精製できる程多く含まれており、羊膜が優れた型別コラーゲンの抽出素材であることが明かとなった。
7. 可溶化したコラーゲンから調製した組成の異なる5種類のコラーゲン溶液を *in vitro* でゲル化させた場合、形成された三次元のコラーゲンネットワークは、コラーゲン細線維の屈曲性、細線維束化の程度、網目の形状および密度が各々のゲルで異なっており、羊膜コラーゲンは、細胞培養基質として有効に作用する多様なゲル形成能を有していることがSEM像により明かとなった。さらに、線維芽細胞をゲル内で培養した場合、コラーゲンゲルのネットワークは、生体で観察される動的な構造へと再構築され、特に、V型とVI型コラーゲンを多く含むゲルでは、緻密層表面、線維芽細胞層断面および裏面に類似したネットワーク構造を呈しており、羊膜コラーゲンは、様々な応用研究に有用な生体外でのモデル構築に適していると考えられた。

本研究では、上述したように、ウシ後産の細胞外マトリックス、特に羊膜コラーゲンを特徴づける細胞生物学的基礎知見を得ることができ、今後は、本研究成果に基づく羊膜細胞外マトリックスの実用化に向けた研究の展開が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	中 村 富美男
副 査	教 授	島 崎 敬 一
副 査	教 授	服 部 昭 仁
副 査	助教授	竹之内 一 昭
副 査	助教授	西 邑 隆 徳

学 位 論 文 題 名

ウシ後産の細胞外マトリックスに関する研究

－羊膜コラーゲンの細胞生物学的性状－

本論文は、6章からなり、図34、表1、文献40を含む総頁数145の和文論文であり、他に参考論文1編が付されている。

胎盤は、胎子の発育に必要不可欠な臓器として妊娠中は機能しているが、出産後には排出され、後産となる。ウシ後産は、絨毛膜と羊膜によって構成されており、全てが胎子成分からなる特殊な畜産副生物である。再生医学や組織工学の分野では、免疫寛容の誘導性、成長因子の捕捉性、未分化ゆえの多能性等に加え、細胞外マトリックスに富んだ組織として、特に羊膜が多様な利用が可能な生体材料として期待されている。しかし、特殊であるがゆえに実用化に向けた研究や臨床応用に必要な、羊膜の組織構造や構成要素の性状に関する知識がほとんど蓄積されていない。そこで本論文では、羊膜細胞外マトリックスの主構成要素であるコラーゲンに注目し、細胞培養、形態学、生化学的手法により羊膜、特にコラーゲンの細胞生物学的性状を明らかにすることを目的とし、以下の結果を得ている。

1. ウシ後産の羊膜は、上皮細胞層、緻密層、線維芽細胞層の三層により形成された無血管、無神経組織であった。また、厚さ約 120 μm の半透明膜である羊膜は、面積が2倍になる程の伸縮性を示したが、限界を超えた場合には胎子の体軸方向に裂ける性状を有していた。
2. 上皮細胞層は、発達した微絨毛を有する単層立方上皮の細胞間連結装置による敷石状の外観を呈しており、スーパーファミリータンパク質であるコラーゲンの大半の型が存在していた。この上皮細胞の多様なコラーゲン産生能は培養系においても確認され、間葉系細胞の成長培地下では線維芽細胞が特異的に発現する間質コラーゲ

ンの産生量が増加した。従って、羊膜上皮細胞は、環境の変化に対応して形質が変化する未分化な多能性細胞と判断された。

3. 緻密層は、羊水の防波堤的役割を果しており、本研究で検索した全 13 種のコラーゲンが共存する成体の組織では未だ報告されていない特異な結合組織であった。走査電子顕微鏡による観察においてコラーゲン細線維は、緻密層表面では屈曲してランダムで密なネットワークを形成しており、断面ではほとんどが胎子の体軸および羊膜腔面に並走していた。しかし、緊密に束ねられた直線的な細線維束は少なく、コラーゲン細線維の多くは緩やかに集合し波打って走行しており、このことが、羊膜の伸縮性と引裂方向に反映していると考えられた。
4. 羊膜の絨毛膜への結合装置である線維芽細胞層は、体軸に対してはランダムだが羊膜腔面に対して層板状あるいは扁平な蜂の巣状に緩く束ねられたコラーゲン細線維のネットワークで形成されており、羊膜の高い伸縮性に寄与し、緻密層の補強装置として機能していた。さらに、この線維芽細胞層のコラーゲンネットワークは、I 型コラーゲンを含まず III、V、VI 型コラーゲンを主体として形成されており、緻密層同様、成体の組織では見られない特異な結合組織であった。
5. 羊膜のコラーゲンは、総タンパク質量の 70%以上を占めており、タンパク質変性剤だけではなくプロテアーゼ処理によってもその 80%近くが可溶化されない高い不溶性を有していた。一方、可溶化したコラーゲンは、再線維形成能を有する天然型の I、III、V、VI 型コラーゲンを各々容易に精製できる程多く含んでおり、羊膜が優れた型別コラーゲンの抽出素材であることが明かとなった。
6. 可溶化したコラーゲンから調製した組成の異なる 5 種類のコラーゲン溶液をゲル化させた場合、形成された立体的なコラーゲンネットワークは、コラーゲン細線維の屈曲性、細線維束化の程度、網目の形状および密度が各々のゲルで異なっており、羊膜コラーゲンは、多様な三次元ゲルを形成することが明かとなった。さらに、線維芽細胞をゲル内で培養した場合、コラーゲンゲルのネットワークは、生体で観察される動的な構造へと再構築され、羊膜コラーゲンは、体外モデルの構築に適した培養基質と考えられた。

以上のように、本論文は、ウシ後産の細胞外マトリックス、特に羊膜コラーゲンを特徴づける細胞生物学的基礎知見を得ており、今後は、本研究成果に基づく羊膜細胞外マトリックスの再生医学や組織工学分野における臨床応用や実用化に向けた研究の展開が期待される。

よって審査員一同は、李 昇遠が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。