

学 位 論 文 題 名

Specific Cell Behavior of Human Fibroblast onto Carbohydrate Surface Detected by Glycoblotting Films

(糖鎖プロッティングフィルム上でのヒト線維芽細胞の特異的挙動)

学位論文内容の要旨

導入：細胞表面は様々な糖鎖に覆われており、細胞-細胞間や細胞-マトリックス間の相互作用に影響を及ぼしている。それらの相互作用を通じて、糖鎖は細胞分化や接着、増殖などの生物学的機能に様々な影響を与えている。そのなかでも、特に複雑な糖鎖であるプロテオグリカンは腱、靭帯や軟骨に対して重要な役割を果たしていることが知られている。しかし、プロテオグリカンは非常に複雑な構造であり、その構造を Scaffold 上に再現することは困難である。

生物学的機能を基盤に持たせることを目的として、糖鎖を基盤上に導入し、基盤上に細胞特異的な機能を持たせることに成功した研究も散見する。しかし、今までに行われてきた糖鎖導入方法は、複雑で時間のかかる合成方法が主体であった。そこで我々は、アミノオキシシル基をポリマー上に提示することによって糖を短時間で簡単に捕捉可能な基盤を開発した。この糖鎖捕捉基盤は、穏やかな条件下で水溶液中の糖を捕捉することが可能である。

本研究の目的は糖鎖を表面に導入することによって、基盤に線維芽細胞に対する生物学的機能を持たせることができるかどうかを検証することである。その目的のために、我々は糖鎖プロッティングの技術を用いることにより、糖を基盤表面に導入可能な糖鎖捕捉基盤を開発した。加えて6種類の糖を表面に導入した基盤を作製し、細胞に与える生物学的影響を検討した。本研究で用いられた技術及び結果は、今後、生理学的機能を持つ糖を同定し、足場材料として利用できる可能性を示唆するものである。

実験方法：アミノオキシシル基をポリマー上に提示した糖鎖捕捉基板を独自に開発した。糖が基盤表面に捕捉されていることを確認するために、蛍光ラベルされたレクチンを用いて、蛍光染色試験を行った。また、実際に6種類の糖鎖 (Lactose, cellobiose, cellotriose, maltotriose, mannotriose, chitobiose) を吸着させた基板を作製し (n=5)、ヒト線維芽細胞との細胞接着性、増殖性を評価した。また、細胞接着性の高かった糖を培養液中に混入させることによる接着阻害性を評価した。また、糖鎖-蛍光ビーズ複合体を作製し、細胞膜との親和性を評価した。統計学的評価には分散分析 (ANOVA) を用いた。

結果：蛍光レクチン染色による糖鎖捕捉能の評価では、実際に糖が基盤表面に提示されていることが確認された。また、細胞培養で用いる培養環境においても糖提示能を24時間以上保つことが確認された (Fig. 1)。

6種類の糖とヒト線維芽細胞を用いた細胞接着試験では cellobiose (コントロール比 292%)、cellotriose (249%) が他の糖鎖より有意に高かった (Fig. 2)。

次に6種類の糖の接着阻害性を評価するために、培養液中に糖を混入することによる、接着阻害性の評価を行った。基盤表面上で細胞接着性の高かった cellobiose、cellotriose が、培養液中において高い

接着阻害性を持つことが確認された (Fig. 3)。また、糖鎖ビーズを用いた蛍光染色では、接着性の高い糖鎖が、細胞との親和性が高いことが確認された (Fig. 4)。

細胞増殖試験は細胞接着試験の結果とは異なり、糖鎖基板全てがコントロールと比較して有意に高かった (Fig. 5)。

考察：

本報告ではオキシルアミノ基をポリマーに導入することによって、水溶液中の糖との簡便な反応を可能にしている。過去にはポリアクリルアミドやポリスチレンなどの合成ポリマーを用いた糖鎖捕捉基盤の報告があるが、いずれも合成に複数のステップを必要とし、その合成には時間が必要となる。その点、今回、我々が用いたポリマーは糖鎖還元末端とアミノオキシル基とのオキシム結合を利用することにより、簡便な合成を可能にしている。

また、今回の結果では cellobiose、cellotriose といった、ヒト組織内ではあまり存在しない糖が高い細胞との親和性を持つことが確認された。Kim らの報告によると、肝細胞と cellobiose との細胞接着性は Lactose などの糖と比べて低いという報告がある。そのことを考慮すると、今回確認された cellobiose、cellotriose とヒト線維芽細胞との親和性は細胞特異的な現象である可能性が高い。また本結果より、今後、細胞親和性の高い基盤をデザインする際に、非動物由来の物質も有用な候補となり得る可能性を示している。

本研究で確立された糖鎖捕捉基板を用いることで、まだ明らかにされていない糖鎖と細胞との関係を明らかにすることが可能となる。更に、今回発見された細胞接着性の高い糖鎖は、新規 Scaffold material として再生医療に応用できる可能性がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安 田 和 則
副 査 教 授 清 水 宏
副 査 教 授 三 浪 明 男

学 位 論 文 題 名

Specific Cell Behavior of Human Fibroblast onto Carbohydrate Surface Detected by Glycoblotting Films

(糖鎖ブロッティングフィルム上でのヒト線維芽細胞の特異的挙動)

細胞表面は様々な糖鎖に覆われており、細胞-細胞間や細胞-マトリックス間の相互作用に影響を及ぼしている。それらの相互作用を通じて、糖鎖は細胞分化や接着、増殖などの生物学的機能に様々な影響を与えている。そのなかでも、特に複雑な糖鎖であるプロテオグリカンは腱、靭帯や軟骨に対して重要な役割を果たしていることが知られている。しかし、プロテオグリカンは非常に複雑な構造であり、その構造を Scaffold 上に再現することは困難である。

生物学的機能を基盤に持たせることを目的として、糖鎖を基盤上に導入し、基盤上に細胞特異的な機能を持たせることに成功した研究も散見する。しかし、今までに行われてきた糖鎖導入方法は、複雑で時間のかかる合成方法が主体であった。そこで我々は、アミノオキシ基をポリマー上に提示することによって糖を短時間で簡単に捕捉可能な基盤を開発した。この糖鎖捕捉基盤は、穏やかな条件下で水溶液中の糖を捕捉することが可能である。

本研究の目的は糖鎖を表面に導入することによって、基盤に線維芽細胞に対する生物学的機能を持たせることができるかどうかを検証することである。その目的のために、我々は糖鎖ブロッティングの技術を用いることにより、糖を基盤表面に導入可能な糖鎖捕捉基盤を開発した。加えて6種類の糖を表面に導入した基盤を作製し、細胞に与える生物学的影響を検討した。本研究で用いられた技術及び結果は、今後、生理学的機能を持つ糖を同定し、足場材料として利用できる可能性を示唆するものである。

最初に、アミノオキシ基をポリマー上に提示した糖鎖捕捉基板を独自に開発した。糖が基盤表面に捕捉されていることを確認するために、蛍光ラベルされたレクチンを用いて、蛍光染色試験を行った。また、実際に6種類の糖鎖 (lactose, cellobiose, cellotriase, maltotriose, mannotriose, chitobiose) を吸着させた基板を作製し (n=5)、ヒト線維芽細胞との細胞接着性、増殖性を評価した。また、細胞接着性の高かった糖を培養液中に混入させることによる接着阻害性を評価した。また、糖鎖-蛍光ビーズ複合体を作製し、細胞膜との親和性を評価した。統計学的評価には分散分析 (ANOVA) を用いた。蛍光レクチン染色による糖鎖捕捉能の評価では、実際に糖が基盤表面に提示されていることが確認された。また、細胞培養で用いる培養環境においても糖提示能を24時間以上保つことが確認された。

6種類の糖とヒト線維芽細胞を用いた細胞接着試験では cellobiose(コントロール比292%)、cellotriose(249%)が他の糖鎖より有意に高かった。次に6種類の糖の接着阻害性を評価するために、培養液中に糖を混入することによる、接着阻害性の評価を行った。基盤表面上で細胞接着性の高かった cellobiose、cellotriose が、培養液中において高い接着阻害性を持つことが確認された。また、糖鎖ビーズを用いた蛍光染色では、接着性の高い糖鎖が、細胞との親和性が高いことが確認された。

細胞増殖試験は細胞接着試験の結果とは異なり、糖鎖基板全てがコントロールと比較して有意に高かった。

本報告ではオキシルアミノ基をポリマーに導入することによって、水溶液中の糖との簡便な反応を可能にしている。過去にはポリアクリルアミドやポリスチレンなどの合成ポリマーを用いた糖鎖捕捉基盤の報告があるが、いずれも合成に複数のステップを必要とし、その合成には時間が必要となる。その点、今回、我々が用いたポリマーは糖鎖還元末端とアミノオキシル基とのオキシム結合を利用することにより、簡便な合成を可能にしている。また、今回の結果では cellobiose、cellotriose といった、ヒト組織内ではあまり存在しない糖が高い細胞との親和性を持つことが確認された。Kimらの報告によると、肝細胞と cellobiose との細胞接着性は Lactose などの糖と比べて低いという報告がある。そのことを考慮すると、今回確認された cellobiose、cellotriose とヒト線維芽細胞との親和性は細胞特異的な現象である可能性が高い。また本結果より、今後、細胞親和性の高い基盤をデザインする際に、非動物由来の物質も有用な候補となり得る可能性を示している。

口頭発表にあたり、副査清水宏教授から、細胞表面の分子の中で糖鎖の占める割合と、糖鎖が接着性に与える影響に関して、また、糖鎖を利用するコストに関して、更に各臓器による糖鎖の特異性に関する質問があった。また主査安田和則教授から、通常の培養基盤と本研究で用いたポリマーとの性能の違いに関して、また糖鎖が細胞の分化に対して与える影響に関して質問があった。最後に副査三浪明男教授からヒト線維芽細胞以外の細胞と糖鎖基盤との関係に関して、また基盤の方向性に関する質問があった。

これらの質問に対して、申請者は学位論文に使用したデータや過去に発表された論文に基づいて概ね妥当な回答を行った。

本論文で確立された糖鎖捕捉基板を用いることで、まだ明らかにされていない糖鎖と細胞との関係を明らかにすることが可能となる。更に、今回発見された細胞接着性の高い糖鎖は、新規 Scaffold material として再生医療に応用できる可能性がある。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。