

氏名(本籍)	むら さわ ゆう すけ 村 澤 裕 介 (神奈川県)		
学位の種類	博 士 (生物工学)		
学位記番号	博 甲 第 4856 号		
学位授与年月日	平成 20 年 11 月 30 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	V型コラーゲン線維を軸 ECM としたニッチダイナミクス制御および腎組織形成誘導		
主査	筑波大学教授	工学博士	國府田 悦 男
副査	筑波大学教授	農学博士	佐 藤 誠 吾
副査	筑波大学教授	農学博士	内 山 裕 夫
副査	筑波大学教授	工学博士	王 碧 昭

論 文 の 内 容 の 要 旨

V型コラーゲンは腎線維症時の糸球体基底膜発現、老年症時の腎糸球体メサンギウム基質発現など、アダルトの腎組織では病気の原因となる細胞外マトリクス (ECM) と見られていた。一方、V型コラーゲンは腎間質マトリクス、基底膜マトリクス形成の起因 ECM であり、腎組織成熟誘導を担っている。文、腎発生において、糸球体形成部分に一過的な発現の報告もあったが、通常 V型コラーゲンが何をしているのか、V型コラーゲンの腎における役割は不明であった。本研究では、in vitro の培養系を用い、腎糸球体初代培養から単離した豚腎糸球体内皮細胞と V型コラーゲン線維との関係を初めて明らかにした。特に、生体 ECM タンパクとして、安定な接着、増殖、細胞死の抑制など見出し、生体系ではポジティブな ECM であることを解明した。従来の概念では、生体組織形成する際、細胞が基底層に固定接着しなければいけないと考えられ、細胞外微細環境の流動を誘導するため ECM を使用しようとする考え方自体が存在しなかった。本研究では、独自の方法で V型コラーゲンを線維化させ、構成された V型コラーゲン線維が、腎糸球体内皮細胞自身の働きと連動し、組織再形成に必要な流れを誘導できる ECM であることを明示した。即ち、安定と流動の繰り返し連鎖を誘導、仲介する ECM という意味で、腎再生医療において、再生プロセスを仲介する“場”として重要な意味をもつことを提示した。これらの解明にあたって、具体的には、V型コラーゲン線維からの情報伝達を NG2、インテグリン $\beta 1$ による受容、PaxillinPY118、FAKPY861 による細胞内リン酸化、MT1-MMP による ECM 消化、V型コラーゲン線維消化後の IV型コラーゲン、フィブロネクチンの高次構造の形成という一連の inside-out, outside-in の経路を明らかにした。

本研究は更に、発生期腎形成における V型コラーゲンの役割を明らかにする為、in vitro における発生腎組織培養の足場として V型コラーゲン再構成線維を用い、発生期腎形成に V型コラーゲンの及ぼす現象を解析すると同時に、マウスの各発生期腎形成におけるネフロン形成、糸球体形成と糸球体尿管融合の過程を詳しく見つけ、未成熟かつ過疎的な前基底膜微小環境 (ニッチ) が安定基底膜ニッチへ軟接着する過程における V型コラーゲンの働きを論考した。in vitro 系では、V型コラーゲン線維の影響は、尿管芽中細胞と、間充織細胞のダイナミズムの遊走上昇にあることが判明した。in vivo における V型コラーゲンの働きにつ

いては、ECMの消化において、分解酵素MMP2、MMP9が関与した。ECM形成において、V型コラーゲン、XVIII型コラーゲン、VI型コラーゲン、IV型コラーゲン、ラミニン α 5鎖が関与し、細胞の動的接着シグナルにおいて、FAKPY861が関与した。これらすべては糸球体形成過程の細胞周囲微細環境に影響を与えた。その結果、新規組織形成部位直前でのV型コラーゲン発現とそのV型コラーゲンの影響による細胞周囲微細環境のダイナミズムの発生が明らかとなった。又、同時進行でXVIII型コラーゲンが組織独立性維持と幼弱基底膜維持を受け持ち、V型コラーゲン由来の自由度の中での区画整理が明らかとなった。更に、新規に形成された組織では、MMP9によりV型コラーゲン消化が起こり、消化後の部位には、細胞とVI型、ラミニン α 5がパッチ状に形成した小基底ECMがカマボコとカマボコ板の様に結合したものの集積が観察され、過疎的な前基底膜ニッチから安定基底膜世界への軟接着様式が明らかとなった。腎ネフロン複雑な臓器形成には、細胞運動と非運動、細胞の不安定接着と安定接着、細胞外環境の消化と分泌、形成と破壊、独立と相関という、相反する相の移り変わりが共存協調しうる細胞周囲微細環境が要求される。このようにダイナミックとスタティックの相反する作用を許す自由度を持つ細胞周囲微細環境をFree Microenvironmentと名付けられ、V型コラーゲンが発生期腎形成Free Microenvironmentの先駆的役割をもつことを示唆した。

本研究の得られた知見をもとに、*in vitro*での腎小器官の融合を試みた。発生原基と分化前駆の間充細胞にアダルト糸球体を混入した系を考案、発生期の過渡的環境を演出するV型コラーゲンを起動ECMとして軸に置き、超高次構造ECMを介したcell-ECM-cell間相互作用を誘導、新旧組織融合を可能化した。V型コラーゲンの持つFree Microenvironmentの先駆的性質は、静置培養で維持されにくいことから、RWV（ロータリングウオールベセル）装置を用い、微少重力かつ微少流力のある環境中で発生期尿管芽とアダルト糸球体との融合、かつ尿路血路のバランスと機能を持つネフロン再生を行なった。その結果、通常人工腎臓で構成し難い微小血管が糸球体と尿管芽の結合により、微小血管新生した組織の形成に成功した。

審査の結果の要旨

現在の再生医療では、細胞外マトリクス（ECM）タンパクを利用する場合、安定な接着、増殖、細胞死の抑制という意味でのみの利用に終わり、組織形成用ECMのコンセプトが存在しない。本研究では、組織形成の主軸として、細胞外微細環境流動の誘導を置くことで、新たな臓器再生において以下のコンセプトを打ち立てた。①腎形成において、V型コラーゲンというECMが、線維フォームで有効な働きをすることを明示した。つまり、V型コラーゲン線維が腎糸球体内皮細胞自身の働きで、組織再形成に必要な流れを誘導できるECMであることを明示し、安定と流動の繰り返し連鎖を誘導、仲介するECMという意味で、腎再生医療において、再生プロセスを仲介する“場”として重要な意味をもつことを提示した。②未成熟かつ過疎的な前基底膜ニッチが安定基底膜ニッチへ織り込む過程における、ダイナミックとスタティックの相反する両相を許す自由度を持つ細胞周囲微細環境の創造こそが、V型コラーゲン線維の働きであることを明確化した。これらの知見をもとに、発生原基と分化前駆の間充細胞にアダルト糸球体を混入した系を考案、発生期の過渡的環境を演出するV型コラーゲンを起動ECMとして軸に置き、超高次構造ECMを介したcell-ECM-cell間相互作用を誘導、新旧組織融合を可能化した。V型コラーゲン線維に対する考究は、再生医療への応用面で実利を示すことが示唆され、新しい医療の切り口の基盤をなす研究として本論文は評価できる。

よって、著者は博士（生物工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。