

論文内容要旨

報告番号	甲栄第 293 号	氏名	天宅 あや
題 目	Proximal deposition of collagen IV by fibroblasts contributes to basement membrane formation by colon epithelial cells <i>in vitro</i> (結腸上皮細胞の <i>in vitro</i> 基底膜形成における近傍線維芽細胞由来IV型コラーゲンの寄与)		
<p> 上皮細胞の足元には基底膜と呼ばれる細胞外基質タンパク質で出来たシート状の膜が存在し、主にラミニン、IV型コラーゲン、ニドゲン、パーレカンから構成される。基底膜は上皮組織と間質を隔てる物理的な膜であるだけでなく、上皮細胞表面の基質受容体と結合し種々の細胞内シグナルを送る。これにより上皮細胞の極性や運動性を制御し、細胞の運命決定を行うなど上皮に多面的な影響を与える。そのため基底膜は上皮組織の形態や機能に大きく影響し、その形成に異常を来すと組織線維化や腎機能障害、がん浸潤などの様々な病態に繋がる。従って基底膜形成機構の理解は正常上皮の振舞いや上皮病態の理解に極めて重要と言える。 </p> <p> これまでに基底膜形成機構として、ラミニンネットワークが形成された後にIV型コラーゲンが会合する、といった段階的な過程が明らかとなっている。これらの基底膜成分は上皮細胞だけでなく、周辺の間質細胞からも供給される。中でもIV型コラーゲンは皮膚や腸管上皮において主に間質の線維芽細胞に由来することが報告されている。また生化学的研究から、細胞外に分泌されたIV型コラーゲンは自己集合して多量体を形成し、不溶化する性質を持つことが知られている。しかし、線維芽細胞由来IV型コラーゲンがなぜ間質で不溶性の凝集体を形成することなく、基底膜という限られた場所まで輸送されて組み込まれるのか、その機構は明らかでない。 </p> <p> 本研究では、ヒト胎児由来線維芽細胞(OUMS-36T-2細胞、以下36T-2細胞)を含むI型コラーゲングル上にヒト結腸上皮細胞(DLD-1細胞)を培養することで、DLD-1細胞の基底面に基底膜様構造が形成される<i>in vitro</i>共培養系を構築した。この共培養系では36T-2細胞がほぼ全てのIV型コラーゲンの供給源となっていた。これを利用して線維芽細胞由来IV型コラーゲンの動態解析を行い基底膜での会合機構の解明を試みた。 </p> <p> 初めに一細胞から分泌されたIV型コラーゲンの行方を調べるために、蛍光標識したIV型コラーゲン(EGFP-COL4A1)を安定発現する36T-2細胞を樹立し、野生株に少量混ぜて上記の共培養を行った。その結果EGFP-COL4A1は発現細胞近傍の限られた範囲に分布したため、DLD-1細胞の基底面近傍の36T-2細胞がIV型コラーゲンを供給することが示唆された。これを検証するために、36T-2細胞を含むI型コラーゲングル上に細胞を含まないゲルを重層して36T-2細胞とDLD-1細胞の間に距離を作って培養したところ、基底膜中のIV型コラーゲンが大きく減少した。一方、IV型コラーゲンと同様に線維芽細胞から供給されるニドゲンの量に大きな変化は認められなかった。さらにトランズウェルインサートを用いて両細胞が接触しない条件で共培養した場合にも同様の結果が得られた。これらの結果から、ニドゲンはゲル中での分子拡散により基底膜に取り込まれるが、IV型コラーゲンは分子拡散でゲルを通過できず、36T-2細胞がDLD-1細胞に直接接触することで基底膜に沈着することが示唆された。実際に生細胞イメージングにより共培養系の基底膜形成過程におけるEGFP-COL4A1の挙動を調べたところ、36T-2細胞はDLD-1細胞の基底面直下を通過する際にIV型コラーゲン凝集体を沈着させる様子が観察された。また、36T-2細胞のアクチン結合タンパク質を発現抑制して運動性を低下させると基底膜中のIV型コラーゲンが減少し、36T-2細胞の細胞運動がIV型コラーゲンの均一な沈着に寄与することが示唆された。 </p> <p> 以上の結果から、上皮細胞のごく近傍に存在する線維芽細胞が主に基底膜のIV型コラーゲンの会合に寄与することが示された。これはIV型コラーゲンが間質で異常に会合することなく基底膜に取り込まれるために、供給源である線維芽細胞が基底膜領域まで輸送する役割を持つことを示唆している。本研究結果は基底膜形成過程の一端を解明したものであり、基底膜による上皮組織の形態形成や機能制御についての理解を進めるうえで重要な貢献を成すと考えられる。さらに本研究で解明された機構により、今後基底膜異常に起因する疾患に対する理解が進み、IV型コラーゲンを補い修復するような治療への応用が期待される。 </p>			

報告番号	甲 栄 第 293 号	氏名	天宅 あや
審査委員	主査 竹谷 豊 副査 二川 健 副査 瀬川 博子		
題目	Proximal deposition of collagen IV by fibroblasts contributes to basement membrane formation by colon epithelial cells <i>in vitro</i> (結腸上皮細胞の <i>in vitro</i> 基底膜形成における近傍線維芽細胞由来IV型コラーゲンの寄与)		
著者	Aya Tentaku, Shusaku Kurisu, Kurumi Sejima, Toshiki Nagao, Akira Takahashi, Shigenobu Yonemura		
	令和 4 年 6 月 22 日 The FEBS Journal に発表済		
要旨	<p>基底膜は上皮組織と間質を隔てる物理的な膜であるだけでなく、上皮細胞表面の基質受容体と結合し上皮細胞の極性や運動性などを制御する。基底膜の主な構成成分はラミニン、IV型コラーゲン、ニドゲン、パーレカンなどであり、基底膜形成異常は、組織線維化や腎機能障害、がん浸潤などの様々な病態に関連していることが知られている。この中でIV型コラーゲンは皮膚や腸管上皮において主に間質の線維芽細胞に由来することが報告されているが、IV型コラーゲンの分泌、輸送、基底膜への組み込み過程には明確でない点がある。</p> <p>本研究は線維芽細胞由来IV型コラーゲンの基底膜での会合機構を明らかにするために、独自に構築した <i>in vitro</i> 基底膜形成モデルを利用している。ヒト胎児由来線維芽細胞 (OUMS-36T-2細胞、以下36T-2細胞) とI型コラーゲンを含むゲル上にヒト結腸上皮細胞 (DLD-1細胞) を共培養することで基底膜様構造を <i>in vitro</i> で再現し、36T-2細胞由来IV型コラーゲンの動態を解析したものである。</p> <p>初めに一細胞から分泌されたIV型コラーゲンの行方を調べるために、蛍光タンパク質で標識したIV型コラーゲン (EGFP-COL4A1) を安定発現する36T-2細胞を野生株に少量混ぜて上記の共培養を行ったところ、EGFP-COL4A1は発現細胞近傍の限られた範囲に分布した。また36T-2細胞を含むI型コラーゲンゲル上に細胞を含まないゲルを重層して36T-2細胞とDLD-1細胞の間に距離を作って培養したところ、基底膜中のIV型コラーゲンが大きく減少した。一方、同じく線維芽細胞に由来するニドゲンは減少するもののある程度維持された。さらにトランズウェルインサートを用いて両細胞を非接触で共培養した場合にも同様の結果が得られたことから、IV型コラーゲンは分子拡散でゲルを通過できず、36T-2細胞がDLD-1細胞に接触することで基底膜に取り込まれることが示唆された。実際に生細胞イメージングにより共培養系の基底膜形成過程におけるEGFP-COL4A1の挙動を調べたところ、36T-2細胞がDLD-1細胞の基底面を通過する際にIV型コラーゲン凝集体を沈着させる様子が観察された。また、36T-2細胞のアクチン結合タンパク質を発現抑制して運動性を低下させたところ、基底膜中のIV型コラーゲンが減少し、ゲル中での36T-2細胞の細胞運動がIV型コラーゲンの均一な沈着に寄与することが示唆された。</p> <p>以上の結果から、上皮細胞のごく近傍に存在する線維芽細胞が主に基底膜へのIV型コラーゲンの集積に寄与することが示された。これはIV型コラーゲンが間質で異常に会合することなく基底膜に取り込まれるために、</p>		

供給源である線維芽細胞が上皮細胞基底面まで IV 型コラーゲンを輸送する役割を持つことを示唆している。

本研究結果は基底膜形成過程の一端を解明したものであり、基底膜による上皮組織の形態形成や機能制御についての理解と共に、基底膜異常に起因する疾患に対する理解にも寄与すると考えられることから博士（栄養学）の学位授与に値すると判定した。