

細胞外マトリックス糖タンパク質による 皮膚の再生・修復のグリコバイオロジー

お茶の水女子大学大学院・糖鎖科学教育研究センター

小川 温子

We discovered that the survival of rat hepatic stellate cells (rHSC) were suppressed on vitronectin (VN) which had been synthesized in the early stage of liver regeneration after partial hepatectomy¹). The changes in glycosylation of VN, especially decreased sialylation plays a modulatory role for rHSC spreading. In this study, we aimed at elucidating whether VN regulates the dermal fibroblast adhesion and motility during the tissue-remodeling. Primary culture of the mouse dermal fibroblast (MDF) was isolated and analyzed for adhesion and spreading on glycosylation-modified VNs. It was found that decreased sialylation of VN not only attenuated the cell adhesion and spreading but changed the cellular signaling of dermal fibroblasts, MDF and Swiss 3T3.

1. 緒言

組織再生時において細胞外マトリックス (ECM) の分子性状は、糖鎖合成に関わる多くのタンパク質の発現と活性が変動するために正常組織のものとは異なる。ECM分子は生物過程や疾患において多くの役割を果たしているが、主要なECM分子の1つであるビトロネクチン (VN) は主に肝臓で産生され、血漿中や組織中に存在する多機能性糖タンパク質である。VNは多くのリガンドと結合とする (図1)。細胞表面のインテグリンと結合して細胞接着や細胞運動に関わるほか、1型プラスミノゲン活性化因子阻害因子 (PAI-1)、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子 (uPA)、およびuPA受容体 (uPAR) と結合して組織溶解に関連する細胞挙動を調節するなど、組織再生において重要な役割を果たす。VNはこのようなりガンド結合ならびに組織溶解系、血液凝固系の調節を介してマトリックスの再構築に関わる。またそのN-型糖鎖結合部位はよく保存され、シアリル化糖鎖の存在は動物種間で共通性が高い²⁾ (図1)。

当研究室ではこれまでに、ラット肝再生初期過程におけるVNのシアリル化の低下がコラーゲン結合性を増強する一方^{3,4)}、肝星細胞の生存につながる接着伸展を著しく抑制し、その過剰な活性化を抑制調節していることを報告した¹⁾。同時期のフィブロネクチンでは、VNの様な糖鎖変化は観測されなかった⁵⁾。

本研究では、肝とならんで再生能力の高い組織である皮膚組織の再生時に、主要な役割を果たすマウス皮膚線維芽

細胞 (MDF、Swiss3T3) に着目した。MDFはVNレセプターである α Vインテグリンを発現するので、初代培養によりMDFを単離し、組織再生時に重要な細胞の接着・伸展ならびに形態変化を中心に、VNの糖鎖調節機構を明らかにすることを目的とした。

2. 実験

1) ラットの部分的肝切除手術と血液採取

5週齢のMale Wistar rats (平均体重約110g、日本生物材料) を、飼育室 (23.5°C, 明6:00–18:00, 暗18:00–6:00) で飼育した。70%部分肝切除はエーテル麻酔後、HigginsとAndersonの方法⁶⁾に従って行った。シャム手術は体外に肝臓を出し、切除せずに再び肝臓を体内に戻す操作を行った。何も処置をしていないラットを非手術 (Non-operated: NO) とした。術後24, 48, 72時間経過後に、採血量の約10% (v/v) の3.8%クエン酸ナトリウムを抗凝固剤としてそれぞれ腹部大動脈より採血を行った。これを4°Cで1,200xg、10分間遠心分離により、上清を集め血漿とし、-80°Cで保存した。

2) 血漿ビトロネクチンの精製

Yatohgoらの方法⁷⁾に従い、非手術 (NO)、シャム手術24時間後 (SH)、部分肝切除24時間後 (PH) のラット血漿あるいはブタ血漿からVNの精製を行った。ヘパリン-Sepharose 4Bは還元アミノ化法で調製した。血漿に1/50量 (v/v) の1.0 M CaCl₂ (終濃度20mM) を加え攪拌したのち、室温で約1時間放置し血漿を凝固させた。さらに4°Cで1時間以上放置した後、凝固した血漿をはさみで細断し、13,000g, 4°C, で10分間遠心分離を行って血清を得た。この血清にフッ化フェニルメチルスルホニル (PMSF) (終濃度1mM) とエチレンジアミン-N,N,N',N'-四酢酸二ナトリウム (EDTA) (pH 7.0, 終濃度5mM) を加え、Sepharose 4Bカラムをプレカラムとするヘパリン-Sepharose 4Bカラムにかけた。通過画分を集め、尿素を最終濃度8Mまで加えて



Glycobiology of an extracellular matrix glycoprotein, vitronectin, during skin regeneration and repair

Haruko Ogawa

Graduate School of Humanities and Sciences and Glycoscience Institute, Ochanomizu University

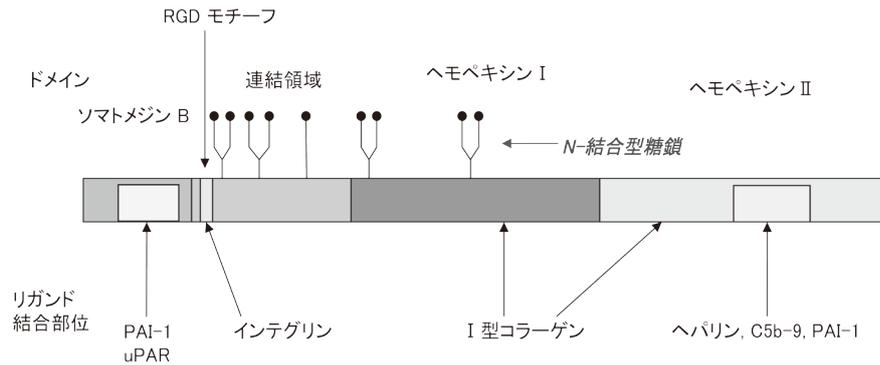


図1 ラットVNの一次構造とリガンド結合部位

溶解し、室温で2時間以上静置した。その後、8 M 尿素を含む0.13 M NaCl, PB-EDTAで平衡化したヘパリン-Sepharoseカラムに通過画分をかけ、平衡化溶液で洗浄、ついで10 mM 2-メルカプトエタノール (2-ME) を含む0.13 M NaCl, PB-EDTAをゲル体積の2倍以上流した後カラムを止め、2時間静置した。その後、同緩衝液で全量でゲル体積の5倍以上流した後に、0.5 M NaCl, Phosphate buffer (PB)-EDTAでヘパリン結合タンパク質を溶出した。さらに2.0 M NaCl, PB-EDTAで完全に溶出を行った。各フラクションについて280 nmにおける吸光度を測定することによりタンパク質の検出を行い、溶出ピークが現れている画分を集め、SDS-PAGEでVNの精製を確認した。回収した画分は透析によって尿素濃度、ついでNaCl濃度を下げ、最終的に0.13 M NaCl, PB-EDTAに対して透析し、タンパク質濃度をBCA法によって決定し、 -20°C で保存した。

3) 精製VNのグリコシダーゼ処理

①ノイラミニダーゼ (シアリダーゼ) 処理

精製VNを 4°C で50 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.3) に対して透析し、 CaCl_2 を加えた (終濃度4 mM)。これをタンパク定量した後ノイラミニダーゼを加え (VN 0.8 mgに対し0.02 U)、 37°C で24時間消化したのち、TBSに対して透析した。

②N-グリコシダーゼF (PNGase F) 処理

精製VNを 4°C において0.13 M NaCl, PB-EDTAに対して透析し、N-グリコシダーゼFを加え (VN 0.3 mgに対し2 U)、 37°C で48時間消化したのちTBSに対して透析した。

4) 細胞接着伸展活性の測定

①細胞継代培養

生後3日目の新生マウスの皮膚より初代培養を行い、MDFを単離した。MDFとSwiss3T3細胞 (お茶の水女子大学宮本泰則准教授より提供) を以下の条件下で継代、培養を行った。

10% FBS, 1% ペニシリン-ストレプトマイシンを含むDMEM培地中で、 37°C 、5% CO_2 条件下で培養し、継代は3-4日

ごとに0.25%トリプシン, 0.02% EDTA, PBS (5 mL/10 cm 径ディッシュ) を加えて 37°C 、5分間処理し、細胞を回収して行った。

②接着伸展実験

Adhesion medium: 攪拌しながら5 M NaCl, 1 M KCl, 1 M MgCl_2 , 0.5 M Na_2HPO_4 , 1 M KH_2PO_4 および1 M CaCl_2 を、MilliQに対してそれぞれ終濃度が150 mM, 3 mM, 0.5 mM, 6 mM, 1 mM および1 mMになるように順に加え、約1時間攪拌した。沈殿が生じていないことを確認してから $0.22\ \mu\text{m}$ 孔径のフィルター (Millex-GV, Millipore) でろ過し、以下の操作に用いた。

継代後の細胞浮遊液を室温で130 g, 3分間遠心後上清を捨てた。さらにAdhesion mediumを加えてよく懸濁したのち、再び130 gで3分間遠心し、上清を捨てた。この操作を2回行った後、Adhesion mediumを2 mL加え、血球計算盤を用いて細胞数を計測した。 2.0×10^5 cells/mLとなるようにAdhesion mediumに懸濁し、これを細胞懸濁液とした。組織培養プレート (96穴) の各ウェルに2倍希釈列 ($10\ \mu\text{g}/\text{mL}$) を作成したVNを $100\ \mu\text{L}$ ずつ加え、 37°C で1時間以上あるいは 4°C で一晩固定化させた。組織培養プレートからVN溶液を排液し、細胞懸濁液を $100\ \mu\text{L}$ ずつ加え、 37°C 、5% CO_2 条件下で60-120分間インキュベートした。ピペットで各ウェルから $50\ \mu\text{L}$ ずつ液を吸引、排液し、ただちに12.3%パラホルムアルデヒド溶液を $50\ \mu\text{L}$ 加え、室温で30分以上固定した。ウェルをPBSで満たし、スライドガラスを乗せ、位相差顕微鏡で観察した。各ウェルで3視野ずつ、各視野ごとに細胞100個前後中の伸展している細胞数を数え、伸展率 (%) = 伸展細胞数 / 全細胞数を求めた。同一の培養細胞について少なくとも3回、異なる2回の培養細胞でそれぞれ実験を行った。

③細胞接着伸展形態の観察

滅菌したカバーガラス上に種々濃度のVNをコートし、洗浄後、細胞を播種し、 37°C 、5% CO_2 条件下で90分間インキュベートした。3.7%パラホルムアルデヒド溶液で20分間固定し、PBSで洗浄した。0.1% Triton X-100/リン酸緩衝液で5分間、透過処理を行い、PBS洗浄後、10% BSA

/PBSで室温にて60分間ブロッキングした。PBSにより洗浄後、1.5% BSA/PBSに溶解した抗ヘパリン硫酸抗体またはAlexa488-ファロイジンと室温、60分間反応させた。PBSにより洗浄後、10% BSA/PBSに溶解した二次抗体と反応させた。蛍光顕微鏡FSX-100（オリンパス）で観察、撮影した。

3. 結果

1) VN 上での MDF の細胞接着伸展活性

70%肝切除手術 (PH)、コントロールとしての偽手術 (SH) を行い、術後24時間後のラット及び非手術 (NO) ラットから血漿を採取し、肝手術 (PH)・シャム手術 (SH)・非手術ラット (NO) の各精製VN基質上でのMDFならびにSwiss 3T3細胞の接着伸展率を測定した。その結果、肝切除後24時間のVN (PH-VN) 基質上では、NO-およびSH-VNに比べ、著しくMDFおよび3T3細胞の接着伸展が低下した (図2)。われわれは以前に、肝再生初期過程における各VNにはそれぞれ高シアル化された分子種と、相対的にシアル酸含量が低い分子種が存在し、PH-VNではいずれのシアル化も著しく減少することを見出した¹⁾ので、ノイラミニダーゼ処理したNO-VN上での初代培養MDFおよびSwiss3T3線維芽細胞の接着伸展率を測定したところ、いずれもコントロール処理の約7割以下に減少することが示された (データ示さず)。この結果は、ラット肝再生に重要な役割を担う肝星細胞の接着伸展が、NO-およびSH-VNと比較してPH-VN上で約1/2にまで減少し、VNのノイラミニダーゼ処理によっても同様に細胞接着伸展率が大きく減少したと一致した。よってMDFおよびSwiss3T3細胞ではラット肝星細胞と同様に、VNのシアル化糖鎖の減少による細胞生存の抑制が示唆された。

2) VN 上の糖鎖によるストレスファイバー形成への影響

VNのノイラミニダーゼ処理前後の変化から、MDF接着伸展率ばかりでなく、伸展した細胞の形状においても著

しく異なる状況を示唆された。そこで細胞骨格を形成するストレスファイバーの状態を比較した。ラット血漿からのVN精製量は少ないため、正常なブタ血漿から精製したVN (pVN) を用いて、ノイラミニダーゼ処理、またはN-グリコシダーゼ処理により糖鎖を除去し、各VN基質上で接着伸展したMDF細胞において、アクチンストレスファイバーをファロイジンにより染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

ノイラミニダーゼ処理pVN上では、未処理pVN上で伸展したMDF細胞と比較して、アクチンフィラメントの短小化と辺縁部への分布の変化、および伸展面積の有意な減少が見出され、ラメリポディア (糸状仮足) の形成が示唆された (図3上段)。このような伸展形態の変化から、細胞上のレセプターが異なる可能性が考えられた。以前の細胞伸展とシグナル伝達に関連するSaoncella⁸⁾ならびにHall⁹⁾らの研究報告より、図3下段に示すように、細胞のストレスファイバー形成と伸展状態の変化には、インテグリンとヘパリン硫酸プロテオグリカン (シンデカン) が関与している。これらはいずれもVNのレセプターであるが、シンデカン依存性なシグナル伝達と非依存性な伝達では、形成されるストレスファイバーの分布が異なることがSwiss3T3細胞を用いて示されている^{8,9)}。細胞の接着と移動が行われるためには細胞表面のインテグリンとシンデカンの相互作用が必要であるが、本研究結果から、VN上のシアル化の変化がこれらのシグナル伝達を調節する事が示唆された。一方、細胞のヘパラーゼ処理によって細胞表面のシンデカンのヘパリン硫酸鎖を酵素的に除去したり、ヘパリンを細胞に添加することによりVNとの相互作用を

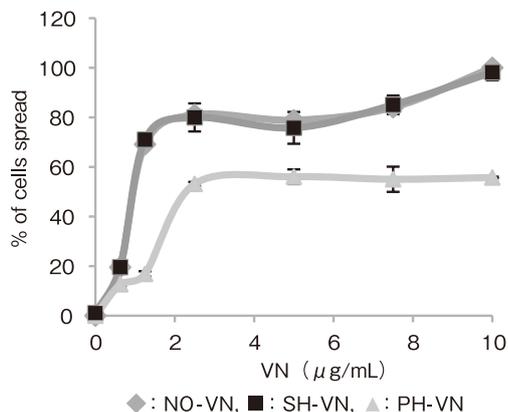


図2 肝切除 VN 基質上での MDF 接着伸展活性

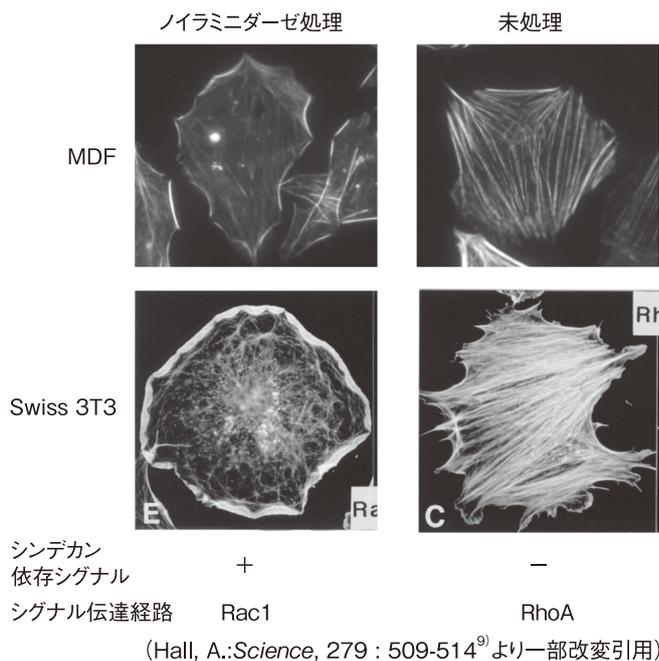


図3 VNのアシアロ化によるMDFのアクチンフィラメント形成への影響

阻害すると、pVN上でのMDFの伸展形態に逆の変化が認められ、シンデカン依存性シグナルの影響が弱まった（データ示さず）。組織修復時、VN糖鎖のシアリル化が低下すると、MDFの接着伸展に対するインテグリンとの相互作用を減弱する一方、シンデカンとの相互作用の寄与が相対的に高まる、すなわち細胞活性化をVNの糖鎖が調節する可能性が示唆された。Swiss3T3細胞についても同様の傾向が認められた（データ示さず）。

4. 考 察

本研究成果から肝再生におけるVNがその糖鎖変化によって、マウス皮膚組織の修復においても線維芽細胞の細胞外マトリックスへの接着など、組織修復の多段階を制御しうる可能性が示唆された。特に我々はMDFの生存シグナルとVNの糖鎖修飾の関連に着目し、次のことを明らかにした。

1. 肝再生初期過程においてVNではシアリル化の減少が起こる。この変化が肝星細胞（RSC）と同様に、MDFとSwiss3T3細胞の接着伸展活性を減少させた。組織再生時におけるVN糖鎖のシアリル化の程度が、RSCとMDFの生存につながる接着伸展、すなわちインテグリン活性化の調節に共通して重要であることが示された。
2. ノイラミダーゼ処理VNを基質としたMDF接着伸展時のストレスファイバーの形成状態は、コントロールVN上と比較してアクチン線維が短小化し、細胞伸展面積が小さく、ラメリポディアを形成することが示唆された。このことから、VNのシアリル化の低下により、VNで誘導される細胞内シグナルの下流で起こるアクチン系の細胞骨格の再構築や接着斑の形成を介したシグナル伝達経路に変化が生じていることが示された。VN糖鎖修飾、特にシアリル化が、細胞表面インテグリンとシンデカンとの相互作用による細胞活性化を調節する可能性が示唆された。

今後、本研究から得られた知見をもとに、皮膚組織修復に与える糖鎖によるVN機能の調節機構を、細胞移動性、増殖、線維増生の各段階についても研究する。細胞接着と細胞骨格形成のVN糖鎖による制御機構を明らかにすることで、ECM分子の糖鎖修飾という観点からの、皮膚再生の分子メカニズム解明と細胞接着異常による癌浸潤やケロイドなどの線維化疾患制圧への手がかりにつながることを期待される。

謝 辞

以上の研究は、お茶の水女子大学大学院自然応用科学系の宮本泰則准教授、大学院生でライフサイエンス専攻糖鎖情報研究室に所属する田邊美音らとの共同研究によるものです。また、コスメトロジー研究振興財団からは多大な

ご支援をいただき、心よりお礼申し上げます。

(引用文献)

- 1) Sano, K., Miyamoto, Y., Kawasaki, N., Hashii, N., Itoh, S., Murase, M., Date, K., Yokoyama, M., Sato, C., Kitajima, K., and Ogawa, H, Survival of Hepatic Stellate Cell during Liver Regeneration is Regulated by the Changes in Glycosylation of Rat Vitronectin especially the Decreased Hypersialylation. *J Biol Chem* **285**, 17301-09, 2010.
- 2) Kitagaki-Ogawa, H., Yatohgo, T., Izumi, M., Hayashi, M., Kashiwagi, H., Matsumoto, I., and Seno, N. Diversities in animal vitronectins. Differences in molecular weight, immunoreactivity and carbohydrate chains *Biochim. Biophys. Acta*, **1033**, 41-56, 1990.
- 3) Sano, K., Asanuma-Date, K., Arisaka, F., Hattori, S., and Ogawa, H, Changes in Glycosylation of Vitronectin Modulate Multimerization and Collagen Binding During Liver Regeneration. *Glycobiology*, **17**, 784-794, 2007.
- 4) Uchibori-Iwaki, H., Yoneda, A., Oda-Tamai, S., Kato, S., Akamatsu, N., Otsuka, M., Murase, Kojima, K., Suzuki, R., Maeya, Y., and Ogawa, H, The changes in glycosylation after partial hepatectomy enhance collagen binding of vitronectin in plasma. *Glycobiology* **10**, 865-74, 2000.
- 5) Sano, K., Yanagibashi, M., Hashii, N., Itoh, S., Kawasaki, N., Ogawa, H, Glycosylation and ligand-binding activities of rat plasma fibronectin during liver regeneration after partial hepatectomy. *Carbohydr. Res.*, **343**, 2329-2335, 2008.
- 6) Higgins, G.M. and Anderson, R.M, Experimental pathology of liver. I. Restoration of the white rat following partial surgical removal *Arch. Pathol.* **12**, 6-202, 1931.
- 7) Yatohgo, T., M. Izumi, H. Kashiwagi, and M. Hayashi, Novel purification of vitronectin from human plasma by heparin affinity chromatography *Cell Struct Funct* **13**, 281-92, 1988.
- 8) Saoncella, S., Echtermeyer, F., Denhez, F., Nowlen, J.K., Mosher, D., Robinson, S.D., Hynes, R.O., Goetinck, P.F., Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in a Rho-dependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 2805-2810, 1999.
- 9) Hall, A, Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, **279**, 509-514, 1998.