

主論文の要旨

**Proteoglycan from salmon nasal cartilage
promotes *in vitro* wound healing of
fibroblast monolayers via the CD44 receptor**

〔 サケ軟骨プロテオグリカンの単層線維芽細胞
創傷治癒モデルにおける CD44 を介しての効果 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻
細胞科学講座 細胞生物物理学分野

(指導：久場 博司 教授)

伊藤 元

【緒言】

細胞外マトリックスの主要成分であるプロテオグリカン (PG) は、コア蛋白にコンドロイチン硫酸 (CS) などのグリコサミノグリカン (GAG) が共有結合した巨大分子である。PG は、細胞遊走、細胞増殖、細胞分化等、様々な生理作用を持っており、医薬品成分としての臨床応用の可能性を秘めている。近年、サケ鼻軟骨から高純度の PG を大量に精製する技術が開発され、そのサケ鼻軟骨由来 PG (SNC-PG) の応用が期待されている。SNC-PG は、その成分のほとんどが軟骨型 PG であるアグリカンであり、GAG として CS、特に、コンドロイチン 6 硫酸 (C-6-S) が多く含まれている。これまでに、SNC-PG には、実験動物モデルにおいて抗炎症作用・大腸炎緩和作用・皮膚紫外線ダメージ回復作用・関節炎緩和作用が報告されているが、その生理作用の全容は解明されていない。本研究では、*in vitro* の単層培養細胞の創傷治癒モデルにおいて SNC-PG の創傷治癒促進効果を検証し、その作用機序の解析を行った。

【実験方法】

創傷治癒アッセイでは、マウス線維芽細胞 (NIH/3T3) 等の細胞を単層培養し、細胞培養面にあらかじめ設置していた帯状のシリコン製インサートを除去することにより 500 μm 幅の創傷部位を作成した。その後、血清を含む増殖培地中で培養し、細胞遊走・細胞増殖による創傷部位の閉鎖をタイムラプス観察し解析した。細胞増殖能は、5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) の細胞内取り込みを計測し解析した。細胞遊走速度は、分裂していない細胞のタイムラプス観察画像から道程を算出し解析した。蛍光標識した SNC-PG の細胞への結合・取込みは、フローサイトメトリーもしくは共焦点レーザー蛍光顕微鏡観察により解析した。

【結果及び考察】

NIH/3T3 細胞を用いた創傷治癒アッセイにおいて、コントロール群では創傷部位は 24 時間以上の培養時間を要して閉鎖した。一方、SNC-PG 添加群 (10 $\mu\text{g/ml}$) では約 1.3 倍の速度で閉鎖した (Fig. 1A, B)。SNC-PG による創傷部位の閉鎖速度の促進効果は、0.1~10 $\mu\text{g/ml}$ 濃度で見られたが、100~1000 $\mu\text{g/ml}$ 濃度においては認められなかった (Fig. 1C)。SNC-PG の同様な促進効果や濃度依存性は、初代培養のヒト線維芽細胞・ケラチノサイトを使用した場合にも見られた (Fig. 1D, E)。以上の結果から、SNC-PG は 0.1~100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度範囲で創傷部位閉鎖速度の促進作用、すなわち、創傷治癒促進効果を持つ可能性が示された。

創傷治癒アッセイにおける創傷部位閉鎖速度は細胞増殖・細胞遊走の両者に依存する。次に、SNC-PG はどちらに作用するのか検証した。その結果、SNC-PG は、細胞増殖・細胞遊走、両者に対して 0.1~10 $\mu\text{g/ml}$ 濃度で有意に亢進作用を示した (Fig. 2A, B)。100~1000 $\mu\text{g/ml}$ 濃度においては、創傷治癒アッセイ同様に作用は認められなかった。従って、SNC-PG は細胞増殖・細胞遊走、両方に作用し創傷部位閉鎖速度を促進すると考えられた。実際、細胞増殖を阻害した条件下においても SNC-PG の創傷部位閉鎖

速度の促進作用は認められた (Fig. 2C)。

SNC-PG は、EGFR 様ドメインを持つコア蛋白と C-6-S を主要成分とする GAG で構成されている。次に、SNC-PG のどの部分が創傷治癒促進作用を持つのか検証した。EGFR を含む pan-ErbB に対するキナーゼ阻害剤 CI-1033 の存在下においても SNC-PG の創傷部位閉鎖促進効果は変わらず認められた (Fig. 3A)。しかし、chondroitinase ABC 処理により SNC-PG のその効果は消失した (Fig. 3B)。従って、SNC-PG の構成成分のうち、創傷部位閉鎖促進効果を有するのは側鎖 GAG の CS であることが示唆された。また、フローサイトメトリー解析により、蛍光標識 SNC-PG の細胞への結合は、C-6-S やコンドロイチン 4 硫酸 (C-4-S) 存在下で抑えられた (Fig. 3C)。よって、SNC-PG 分子の中の CS が SNC-PG と細胞の相互作用に寄与していることが示唆された。しかし、創傷治癒アッセイにおいて C-6-S が SNC-PG 同様に創傷部位閉鎖速度促進効果を示したのに対し、C-4-S には効果が認められなかった (Fig. 3D)。従って、SNC-PG の中で側鎖 GAG の主成分 C-6-S に創傷治癒促進効果があると考えられた。

次に、SNC-PG の細胞側の作用部位に関して解析した。CD44 は CS 結合能を有することが報告されている。CD44 に対するブロッキング抗体を細胞に作用させると SNC-PG と細胞の結合が減少し (Fig. 4B)、蛍光標識 SNC-PG の細胞内小胞への移行が抑えられた (Fig. 4C)。さらに、創傷治癒アッセイにおいて、CD44 に対するブロッキング抗体処理により SNC-PG の創傷部位閉鎖速度促進効果が抑えられた (Fig. 4D)。以上の結果より、SNC-PG は細胞膜上の CD44 と相互作用することにより創傷治癒促進作用を示すことが示された。これは、CD44 を発現抑制した細胞を用いたアッセイの結果からも裏付けられた (Fig. 4E, F)。しかし、CD44 抗体処理によっても SNC-PG の細胞への相互作用は完全に抑制されなかったことから、CD44 以外の SNC-PG に対する結合サイトが細胞膜上に存在することが示唆された (Fig. 4B, C)。その下流のシグナルにより高濃度の SNC-PG における各種促進効果を消失している可能性も考えられた。

【結語】

本研究では、SNC-PG はこれまでに報告されている生理作用の他に *in vitro* で創傷治癒促進効果を有することが示された。その効果は、比較的低濃度 (0.1~10 $\mu\text{g/ml}$) で細胞増殖、細胞遊走を亢進することに依った。さらに、その促進効果は、SNC-PG の GAG の主成分である C-6-S と細胞膜上の CD44 との相互作用によることが明らかにされた。SNC-PG は CD44 と結合した後に 30 分以内に細胞内小胞に移行した。従って、本研究で見出された SNC-PG の創傷治癒促進作用は、軟骨型 PG である SNC-PG の細胞接着・増殖を調節する足場的な働きよりも、むしろ、CD44 結合の下流で誘起される細胞内シグナルに依っている可能性が高い。他のほ乳類由来の軟骨型 PG では、SNC-PG と異なり、C-6-S に比べ C-4-S が多く含まれている。従って、SNC-PG に見出された創傷治癒促進効果は、他のほ乳類由来の軟骨型 PG では、比較的小さいか、ほとんど認められないと予想される。今後、*in vivo* での効果検証等が待たれるが、SNC-PG は、サケ頭部を材料として資源有効活用し安価に精製することができることから考えて、創傷治

癒促進剤としての有力な開発候補になりうると考えられる。