



Title	Versican interacts with chemokines and modulates cellular responses
Author(s)	廣瀬, 潤
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42671
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	ひろ 瀬 じゅん 潤
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 0 5 8 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 13 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科病理系専攻
学 位 論 文 名	Versican interacts with chemokines and modulates cellular responses (バーシカンはケモカインと相互作用し、細胞応答を調節する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 宮坂 昌之 (副査) 教 授 谷口 直之 教 授 平野 俊夫

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

我々は、白血球接着分子L-セレクチンの新規結合物質として、腎尿管由来培養細胞株 ACHN 細胞の培養上清からコンドロイチン硫酸プロテオグリカン・バーシカンを同定した。バーシカンは、多数の硫酸化されたグリコサミノグリカン鎖をもつことからヘパラン硫酸プロテオグリカン同様、白血球遊走因子ケモカインを保持し白血球に提示する可能性が考えられた。そこで、本研究において私は、in vitro の実験系においてバーシカンはケモカインと直接結合するか否かを検討するとともに、バーシカンとケモカインの相互作用がケモカインの機能にどのような影響を及ぼすかを検討した。

【方法ならびに成績】

はじめに、ドットプロット法を用い、バーシカンのケモカインへの結合を検討した。その結果、バーシカンはいくつかのケモカインと結合した。それらの結合はグリコサミノグリカン (GAG) 分解酵素処理、およびコンドロイチン硫酸 (CS) B、CS E またはヘパラン硫酸 (HS) により特異的に阻害された。このことから、バーシカンとケモカインの結合はバーシカン上のコンドロイチン硫酸鎖を介するものであると考えられた。次に、バーシカンとケモカインの相互作用が、インテグリンの活性化および Ca^{2+} 流入にどのような影響を与えるかについて検討した。最初に、バーシカン結合性ケモカイン SLC によるマウス T 細胞株 TK-1 細胞の $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンの活性化に対する影響を検討した。その結果、固相化 SLC によって TK-1 細胞を刺激した場合は $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンのリガンドである MAdCAM-1 に対する細胞接着が亢進したのに対し、固相化したバーシカン上に結合させた SLC によって TK-1 細胞を刺激した場合は、MAdCAM-1 に対する細胞接着が誘導されなかった。このことから、バーシカンはケモカインの作用に対して抑制的に働くことが示唆された。さらに、この抑制効果がコア蛋白質を介するものではなく、GAG 単独でも見られるものかどうかを調べた。ケモカイン非結合性 GAG である CS A、ケモカイン結合性 GAG である CS B または、ケモカインに結合性をもちその作用を亢進させることの知られている GAG である HS をそれぞれ MAdCAM-1 と共固相化し、SLC をそれぞれの GAG 上に結合させた後に細胞を加えた。その結果、HS 上に結合した SLC の刺激により細胞接着が亢進したのに対し、CS B 上に結合した SLC の刺激ではバーシカンと同様に細胞接着が誘導されなかった。また、CS A には SLC が結合しないため細胞接着は誘導されなかった。以上のことから、CS B もバーシカンと同様にケモカインの作用に対して抑制的に働くことが示唆された。次に、ケモカインにより誘導さ

れる Ca^{2+} 流入におけるバーシカンの効果を検討した。SLC レセプター CCR 7 を導入したマウス preB 細胞株 L1.2 細胞および SDF-1 β レセプター CXCR 4 を発現する Jurkat 細胞を Fura-2 で標識し、バーシカンと SLC または SDF-1 β を予め 10 分間インキュベートした混合物を加え Ca^{2+} 流入を測定した。その結果、バーシカンは濃度依存的に SLC および SDF-1 β による Ca^{2+} 流入を抑制した。また、バーシカンは leukotriene D 4 により誘導される Ca^{2+} 流入を抑制しなかったことから、バーシカンはケモカインにより誘導される Ca^{2+} 流入を特異的に抑制することが示唆された。さらに、バーシカンの代わりに、CS A、CS B および HS を用い、同様な実験を行った結果、CS B はバーシカンと同様に SLC により誘導される Ca^{2+} 流入を抑制した。以上のことから、バーシカンおよび CS B はケモカインと結合し、ケモカインの作用を抑制することが示唆された。また、バーシカンおよび CS B は、 ^{125}I -SLC のレセプター結合を阻害しなかったことから、バーシカンおよび CS B によるケモカイン作用の抑制には少なくともケモカインとそのレセプターの結合の阻害は関与しない可能性が示唆された。

【総括】

我々は、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン・バーシカンがケモカインと結合し、その結合はバーシカン上の GAG 側鎖を介するものであることを明らかにした。さらに、バーシカンはケモカインにより誘導されるインテグリンの活性化および Ca^{2+} 流入を抑制するという結果を得た。これまで、ヘパラン硫酸はケモカインに結合し、その作用を亢進させると考えられてきた。本研究によりコンドロイチン硫酸もケモカインに結合すること、およびその結合によりケモカインの作用が抑制されるという可能性が示唆された。しかしながら、その抑制機構は未だ明らかではない。今後、さらに GAG によるケモカインシグナリングの調節機構を明らかにしたいと考える。

論文審査の結果の要旨

ヘパラン硫酸プロテオグリカンは白血球遊走因子ケモカインと結合し、白血球に対し効率良くケモカインを提示すると考えられている。一方、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンが同様な働きをするか否かについては明らかではない。本研究により、L-セレクチンの新規結合物質として同定されたコンドロイチン硫酸プロテオグリカン・バーシカンが、いくつかのケモカインと結合し、その結合がバーシカン上の GAG 側鎖を介するものであることがはじめて明らかにされた。さらに、バーシカンとケモカインの相互作用がケモカイン特異的に誘導されるインテグリンの活性化および Ca^{2+} 流入を抑制することも明らかとなった。以上の結果から、ヘパラン硫酸だけではなく、ある特定のコンドロイチン硫酸もまたケモカインを結合する能力をもつこと、およびその結合によりケモカインの作用が抑制されるという可能性が示された。本研究は、ヘパラン硫酸以外のある特定の GAG によりケモカインの作用が調節されることを示した最初の報告であり、学位に値するものと認める。