

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Purification and Characterization of Human Laminin-8  |
| Author(s)    | 藤原, 裕展  |
| Citation     | 大阪大学, 2003, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/45146">https://hdl.handle.net/11094/45146</a>   |
| 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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。 |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

|            |  |
|------------|--|
| 氏名         | 藤原裕展   |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(理学)   |
| 学位記番号      | 第 18093 号  |
| 学位授与年月日    | 平成 15 年 9 月 30 日   |
| 学位授与の要件    | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>理学研究科生物科学専攻  |
| 学位論文名      | Purification and Characterization of Human Laminin-8<br>(ラミニン-8の精製と機能解析) |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 関口 清俊<br><br>(副査)<br>教授 荻原 哲 教授 岡田 雅人                         |

#### 論文内容の要旨

血管新生は、血管内皮細胞と液性因子、そして細胞外マトリックスとの相互作用を必要とする複雑な現象である。ラミニン-8 ( $\alpha 4 \beta 1 \gamma 1$ ) は胎児から成体までの全ての血管基底膜、その中でも特に新生血管や毛細血管に多く存在するラミニンアイソフォームであることから、血管新生の際の血管内皮細胞の接着や遊走に重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、ラミニン-8は未だに精製されておらず、その生理活性はほとんど知られていない。本研究では、ラミニン-8を精製し、血管内皮細胞の接着・遊走におけるその役割を解析した。まず、40種類の培養細胞株のラミニンの発現をPT-PCRによって調べ、グリオーマ細胞 T98G がラミニン-8を選択的に発現することを見いだした。T98G細胞の培養上清から、硫酸分画、ゲルろ過、ラミニン $\alpha 4$ 鎖に対する抗体を用いたイムノアフィニティークロマトグラフィーにより、ラミニン-8を精製することに成功した。次に、血管内皮細胞の接着、遊走におけるラミニン-8の役割を、成熟血管基底膜に多く存在するラミニン-10/11、間質の代表的な細胞外マトリックス蛋白質であるフィブロネクチンと比較することによって解析した。ラミニン-8は、ラミニン-10/11、フィブロネクチンと比べ、細胞接着を誘導する活性が非常に低かった。インテグリン抗体を用いた細胞接着阻害実験により、血管内皮細胞のラミニン-8への接着は、インテグリン $\alpha 6 \beta 1$ を介して起こることが明らかとなった。ラミニン-8の細胞遊走活性を調べたところ、ラミニン-8はラミニン-10/11と同等の、しかし、フィブロネクチンよりも強い細胞遊走活性を示した。細胞の遊走には細胞骨格が大きく関わることが知られている。そこで私は、ラミニン-8、ラミニン-10/11、フィブロネクチンに接着した細胞のアクチン骨格と接着斑の染色を行った。フィブロネクチンに接着した細胞では、ラップリングはほとんど形成されず、細胞全体に太いアクチン繊維の束(ストレスファイバー)と大きな接着斑が形成された。しかし、ラミニン-8とラミニン-10/11に接着した細胞では、ラップリングの周辺に細かいアクチン繊維の縞と小さな接着斑が形成された。アクチン骨格や接着斑の形成を制御する Rhoファミリー低分子量 G蛋白質 (Rho, Rac, Cdc42)の活性を調べたところ、ラミニン-8とラミニン-10/11に接着した細胞ではフィブロネクチンに接着した細胞に比べて Rac が強く活性化されていることがわかった。また、Rac のドミナントネガティブ体を細胞に導入したところ、ラミニン-8上での強い細胞の遊走が阻害された。これらの結果から、ラミニン-8は、血管内皮細胞の Rac を強く活性化することにより、 $\alpha 6 \beta 1$ インテグリン依存的な血管内皮細胞の遊走を引き起こしていることが明らかとなった。

## 論文審査の結果の要旨

ラミニン-8は、血管の基底膜を構成する主要なラミニンアイソフォームであるが、その生理機能はこれまでほとんど調べられていない。藤原裕展君は、ヒトグリオーマ細胞 T98G がラミニン-8 を選択的に分泌することを見だし、大量培養した T98G 細胞の培養上清よりラミニン-8 を均一に精製することにはじめて成功した。さらにラミニン-8 が血管内皮細胞の遊走を強く促進すること、この遊走促進活性は低分子量 G 蛋白質 Rac の選択的活性化に依存していることを様々な分子細胞生物学的解析により明らかにした。これらの成果は、血管新生におけるラミニン-8 の生理機能の解明に大きく貢献するもので、博士（理学）の学位に値するものと認める。