

氏名 清水久雄  
 学位(専攻分野) 博士 (医学)  
 学位記番号 論医博第 1711 号  
 学位授与の日付 平成 12 年 3 月 23 日  
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当  
 学位論文題目 Adhesion of Cultured Bovine Aortic Endothelial Cells to Laminin-1 Mediated by Dystroglycan  
 (培養ウシ大動脈血管内皮細胞のジストログリカンによるラミニン-1 への接着)

論文調査委員 (主査) 教授 月田承一郎 教授 開 祐司 教授 本田孔士

### 論文内容の要旨

培養ウシ大動脈血管内皮細胞(以下, BAE 細胞)におけるジストログリカン(以下, DG)の発現を BAE 細胞の cDNA ライブラリーからの cDNA クローニング, メッセンジャー RNA のノーザンブロッティング, 膜蛋白のウェスタンブロッティング, および  $\beta$  ジストログリカン, 血小板-内皮細胞接着因子 1 に対する抗体による二重免疫染色で確定した。免疫細胞化学的解析によりジストログリカンの局在は静止状態の細胞では基底膜側に多発して存在していることが明らかになった。このジストログリカンの分布は移動状態の細胞では不明瞭となり, 細胞を基質に繋ぎ止めている細胞尾部で顕著に認められた。ビオチンでラベルしたラミニン 1 によるオーバーレイアッセイにてラミニン 1 と  $\alpha$  ジストログリカンとの相互作用が示された。バクテリアに発現させビオチンでラベルしたラミニンの  $\alpha 5$  領域はメンブレンプロットにおいて  $\alpha$  ジストログリカンと結合し, ラベルしていないラミニンのフラグメントはビオチンラベルしたラミニン 1 と  $\alpha$  ジストログリカンとの結合を阻害した。ビオチンラベルしたラミニン 1 と  $\alpha$  ジストログリカンとの結合はジストログリカンの cDNA をトランスフェクトした BAE 細胞の培養上清中に含まれる可溶性の  $\alpha$  ジストログリカンによって阻害され, またヘパリン, デキストラン硫酸, フコイダンといった一連のグリコサミノグリカンによっても阻害された。培養上清中の可溶性の  $\alpha$  ジストログリカンはラミニン 1 をコートした培養皿への BAE 細胞の接着を阻害したが, ファイブロネクチンコートした培養皿への接着には影響を及ぼさなかった。ビオチンラベルしたラミニン 1 と  $\alpha$  ジストログリカンとの接着を阻害したヘパリン, デキストラン硫酸, フコイダンは BAE 細胞とラミニン 1 との接着を阻害したが, BAE 細胞とファイibroネクチンとの接着は阻害しなかった。以上の結果より血管内皮細胞と細胞外マトリックスとの接着には非インテグリンレセプターとしてのジストログリカンの役割が示された。

### 論文審査の結果の要旨

増殖性糖尿病網膜症, 加齢性黄斑変性症, 血管新生緑内障は現在失明の原因となることの多い疾患で, その治療には難渋することが多く, これらの疾患の病態には概して血管新生が関与している。一般に網膜血管新生には血管内皮細胞がその中心的役割を担っており, VEGF 等の血管新生促進因子による刺激を受け, 細胞外マトリックスと相互に関係しながら, 血管内皮細胞はその形態を変え新たに管腔を形成するが, その詳しい機構は不明である。

本研究では培養ウシ大動脈血管内皮細胞においてジストログリカンが mRNA レベルにおいて存在することを cDNA cloning 法, Northern blotting 法により明らかにし, 蛋白レベルにおいて存在することを Western blotting 法により明らかにし, また血管内皮細胞の静止状態, 移動状態におけるジストログリカンの局在を免疫染色法にて明らかにした。ジストログリカンと細胞外マトリックスであるラミニン 1 との相互作用をビオチンラベルしたラミニンを用いた overlay assay により明らかにした。以上より, 血管内皮細胞と細胞外マトリックスとの接着には非インテグリンレセプターとしてのジストログリカンが関与することが示された。

以上の研究は血管内皮細胞の細胞外マトリックスとの接着の解明に貢献し、今後の血管内皮細胞の動態の理解に寄与することが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成12年3月6日実施の論文内容とそれに関連した研究分野の試問を受け、合格と認められたものである。