

論文の内容の要旨

氏名：本 澤 慶 子

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：低分子量および高分子量 basic fibroblast growth factor の生物活性の比較

電解酸性機能水 (acid-electrolyzed functional water : FW) は食塩水を電気分解することによって陽極側に回収される水であり、高い殺菌効果があり、臨床現場において消毒剤として広く使用されている。FW の生物学的機能について検討することを目的として、FW を子宮頸癌由来線維芽細胞 (HeLa 細胞) に作用させ産生されるサイトカインの変化について調べた先行研究では、basic fibroblast growth factor (bFGF) の分泌が促進されることが明らかにされている。bFGF は FGF ファミリーの 1 つで、多様な生物活性を有する 18 kDa のタンパク質である。bFGF 遺伝子の塩基配列の分析により、18 kDa bFGF の上流に非定型的な translation initiation codon である CTG が複数存在し、ここから翻訳される bFGF の存在が明らかとなっている。これらは分子量 34, 24, 22, 20 kDa を示し、成熟型である 18 kDa bFGF を low molecular weight (LMW) bFGF と呼ぶのに対して high molecular weight (HMW) bFGF と称する。HMW bFGF では N 末端側に nuclear localizing signal (NLS) が存在するという点が構造上異なる。このため LMW bFGF は主に細胞質に、HMW bFGF は主に核に存在するとされている。これまでの研究から、高分子量 bFGF を強制発現させると細胞の増殖速度が上昇するという報告はあるものの、両者の生物活性の本質的な違いについては不明な点が多い。そこで本研究では、HMW 及び LMW bFGF の生物活性の違いについて検討することを目的とした。

はじめに、HeLa 細胞を FW (pH 2.2-2.7, contains 20% Cl₂ and 80% hypochlorous acid) 刺激することによって分泌促進される bFGF の分子量を検討した。HeLa 細胞を用いて、FW 1.0 ml を添加し 30 秒間刺激した後、等量の培地を添加して FW 刺激を停止した。この溶液を吸引除去後、新たに培地 1.0 ml を添加し再び培養を行った。3 時間経過した後、培養上清を回収し Amicon[®] Ultra 遠心式限外ろ過フィルターにて約 6 倍に濃縮した。分子量の測定および決定は、濃縮した培養上清を用いて immunoprecipitation (IP) -Western blot (IP-W) 法により行った。

さらに、LMW bFGF と HMW bFGF の生物活性の違いを比較するため、LMW bFGF でこれまで報告のあった血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) 誘導能について比較検討した。LMW bFGF と HMW bFGF の recombinant bFGF の作製にあたり、FW 刺激によって分泌が確認された全ての bFGF isoform のうち、成熟型である LMW isoform 18 kDa と HMW isoform では 34 kDa isoform に着目した。34 kDa bFGF cDNA を HeLa 細胞由来の cDNA をもとに PCR 法にて増幅し pcDNA 3.1 の EcoR I と HindIII site にサブクローンしたものをテンプレートとして quick change site-directed mutagenesis kit を用いて 34 kDa bFGF の効率的な発現のために translation initiation codon である CTG を ATG に変換、さらに 18 kDa bFGF の発現を除去するために 34 kDa bFGF の中間に存在する 18 kDa bFGF の translation initiation codon である ATG を GCG に変換したものを pcDNA-34 kDa ベクターとした。この pcDNA-34 kDa ベクターをテンプレートとして C 末端から半分の成熟型 18 kDa bFGF を設計し pcDNA-18 kDa ベクターとした。構築した 18 kDa および 34 kDa 発現ベクターを用いて T_NT[®] Quick Coupled Transcription/Translation Systems により *in vitro* transcription/translation を行い pcDNA- 18 kDa, pcDNA-34 kDa の recombinant bFGF の作製を行った。*In vitro* transcription/translation で作製したそれぞれの bFGF isoform の定量は ELISA により行った。また、分子量の確認は IP-W により行った。さらに、これらの recombinant bFGF を HeLa 細胞に 12 時間作用させ刺激した。VEGF 濃度の定量は、12 時間後に回収された培養上清を用いて ELISA により行った。

培養上清を用いた IP-W の結果、FW 刺激後 3 時間では 18 kDa の bFGF に加え 34,24,22,20 kDa isoform も同時に分泌されることが明らかとなった。一方、FW 刺激を行っていないコントロールでは全く bFGF のバンドは確認されなかった。

In vitro transcription/translation で作製したそれぞれの bFGF isoform の ELISA による定量の結果、bFGF 濃度は pcDNA-18 kDa ベクター由来の isoform は 6.78 ng/ml, pcDNA-34 kDa ベクター由来の isoform は 6.92 ng/ml であった。また IP-W の結果、それぞれ 18 kDa および 34 kDa の位置に単一バンドとして

検出され、作製した recombinant bFGF はそれぞれ適正な分子量を有することが確認された。作製されたそれぞれの bFGF を HeLa 細胞に作用させたところ、コントロールと比較し、18 kDa bFGF では約 1.7 倍、34 kDa bFGF では約 2.0 倍の VEGF の有意な産生増加を認めた。

以上の結果より、HMW bFGF は LMW bFGF と同様に VEGF を誘導する作用があり、それによって創傷治癒に貢献している可能性が示唆された。

本実験で 18 kDa および 34 kDa の bFGF の作製にあたり、当初は培養細胞に transfection を行い発現させた bFGF を用いて検討することにしてしたが、この方法では 18 kDa bFGF のみが効率的に産生され、34 kDa bFGF の産生効率が極めて低かった。これらの現象は、transfection にあたり数種類の細胞を用いたが、細胞間において大きな違いは認められなかった。そこで *in vitro* transcription/translation を行ったが、34 kDa bFGF の translation initiation codon である CTG を ATG に変換しないと 18 kDa bFGF のみが産生されてしまい、また 18 kDa bFGF の translation initiation codon である ATG を CTG に変換しないと 34 kDa と 18 kDa の両分子がほぼ同等の効率で産生されることが解った。生体内で CTG codon からなぜ translation が開始されるのかという問題は今後さらに検討する必要があると考えている。

一般に細胞が壊死に陥る際には細胞核の中から様々な分子が放出されることが解っている。これらの分子は alarmin と総称され、interleukin-1 α や high mobility group box-1 などが知られている。Alarmin は免疫作用の増強といった生物学的な機能だけではなく、N 末端側に NLS を有しているといった構造上の類似点がある。またこれらの共通点以外に、最近ではこれまで核にしか存在しないとされていたヒストンが細胞外に放出され、核内とは全く異なった機能を有していることが報告されている。上記の alarmin は、いわゆる signal peptide を持たず、典型的なタンパク質分泌経路である ER-Golgi 経路を経由しないことが解っているが、bFGF も signal peptide を有していない。これらの共通点より HMW bFGF も alarmin の一種であると推測される。

本研究の結果、FW 刺激では HeLa 細胞より全ての bFGF isoform を分泌促進させること、また NLS が存在するにもかかわらず HMW bFGF である 34kDa は LMW bFGF と同様に VEGF 誘導能を有していることが明らかとなった。