

氏名	のぐち まこと 野口 誠
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	乙第11号
学位授与年月日	平成16年 8月 3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	Induction of hepatocyte growth factor and inhibition of proliferation by extracellular matrix component derived from fish skin of <i>Reinhardtius hippoglossoides</i> (カラスガレイ皮の細胞外マトリックス成分による肝細胞増殖因子の誘導と細胞生育阻害)
学位論文審査委員	(主査) 箸本英吉 (副査) 押村光雄 佐藤建三

学位論文の内容の要旨

水産加工工程から副生される皮や内臓などの残滓が、現在、大量に廃棄されている。残滓中には、細胞外マトリックス成分が豊富に含まれているため、健康機能食品や医学分野での利用への期待がある。一方、近年、中年層における肝機能障害患者の数が急速に多くなりつつあり、食生活改善などの予防の必要性が重要になってきている。

本研究では、魚皮の細胞外マトリックス成分が、肝機能障害の改善や肝機能の維持に重要な因子として注目される肝細胞増殖因子（HGF）の誘導に及ぼす影響を検討した。HGF を誘導する因子として、魚皮のアルカリ抽出成分に注目した。特に、アルカリ抽出成分中のグリコサミノグリカンが HGF 誘導に重要であり、構成されているグリコサミノグリカンの種類と HGF 誘導効果について検討した。また、アルカリ抽出成分について、数種の腫瘍細胞に対して生育阻害作用について検討を行った。魚皮中の成分について、肝機能に役立つ生理活性成分があることを明確にした。

方法

カラスガレイ皮からアセトン抽出により脂質を除去した後、残渣に水酸化ナトリウムを加え、アルカリ抽出画分を分離した。さらに、残渣に酢酸を加え、酸抽出画分を取り出した。これらの成分について MRC-5 細胞（ヒト胎児肺由来正常線維芽細胞）による HGF の誘導効果を観察した。さらに、アルカリ抽出画分は、プロナーゼによりタンパク質を分解後、分子量 8000 の透析膜で

透析を行った。この透析内液について DEAE-Sephadex A-25 によりグリコサミノグリカンの分離分析を行った。分画は、食塩濃度を段階的に増加させ、グリコサミノグリカンの分離に併せて、5つに分けた。この5つの分画について、HGF の誘導効果並びにグリコサミノグリカンの種類の同定を行った。同定は、セルロースアセテート膜電気泳動により行った。アルカリ抽出画分については、細胞生育阻害作用を HepG2(肝癌細胞株)、HL60、U937 細胞(骨髄性白血病細胞)を利用して MTT 試験により観察した。

結 果

カラスガレイ皮から脂質 14~16%、アルカリ抽出画分 1.5%、酸抽出画分 11.4%を取得した。MRC-5 細胞による HGF 誘導効果は、脂質並びに酸抽出画分が PBS を加えた対照区に比較して同程度であったのに対して、アルカリ抽出画分 (5mg/ml) は、 2.6 ± 0.1 倍 HGF を多く誘導した。この HGF 誘導効果は、濃度依存的であり、0.05 mg/ml の濃度で 1.7 ± 0.2 倍 HGF を誘導した。

アルカリ抽出画分については DEAE-Sephadex A-25 によりグリコサミノグリカンの分画を行った結果、3つのグリコサミノグリカンのピークが確認された。このグリコサミノグリカンは、イオン交換カラムでヒアルロン酸(HA)を、セルロースアセテート膜電気泳動で2つのデルマトン硫酸(DS)であることを確認した。この分画について HGF の誘導効果を検討したところ、2つの DS の画分で、HGF を誘導した。HA の画分には、HGF 誘導効果は見られなかった。市販の9種類のグリコサミノグリカンを比較したが、DS が最も高い HGF 誘導効果を示した。その他にも、コンドロイチン硫酸、ヘパリン、ヘパラン硫酸にも HGF 誘導活性があった。また、アルカリ抽出画分については、HepG2、HL60、U937 の成長を抑制させる効果があることが確認された。

考 察

カラスガレイ皮の抽出画分において、アルカリ抽出画分のみが HGF 誘導作用を示した。アルカリ抽出画分中のグリコサミノグリカンは、主成分である DS と少量の HA で構成されているが、調査した9種類のグリコサミノグリカンで DS が最も HGF 誘導能が高く、カラスガレイ皮は DS を分離するのに価値ある素材であると考えられる。アルカリ抽出画分の DS は、DEAE-Sephadex A-25 での溶出が食塩濃度により2つに別れることから、DS に含まれる硫酸基に濃度差があることが推察される。DS は、増殖因子の補足や細胞の運動性を阻害することが報告されている。アルカリ抽出画分の DS が、腫瘍細胞の成長抑制作用を示す成分であると推測される。

結 論

魚皮のアルカリ抽出画分には、HGF 誘導効果が見られた。さらに、このアルカリ抽出画分をグリコサミノグリカンの種類ごとに分画したところ、DS に HGF 誘導効果が見られた。また、アルカリ抽出画分には、数種の腫瘍細胞の増殖を抑制する効果が示された。これらの結果から、カラスガレイ皮には、薬品のみならず機能性食品として役立つ生理活性成分を含むことが確認された。

論文審査の結果の要旨

本研究はカラスガレイ皮を用いて、細胞外マトリックス成分の各種成分の分離を行い、肝細胞の重要因子である肝細胞増殖因子（HGF）の誘導効果を検討したものである。その結果、水酸化ナトリウムで抽出したアルカリ抽出画分に HGF 誘導効果が認められ、その成分が、グリコサミノグリカンの中のデルマトン硫酸に起因していることを確定したものである。また、アルカリ抽出画分に腫瘍細胞の増殖抑制作用を見だし、グリコサミノグリカンの多面的な機能を示唆した。本論文の内容は、数種のグリコサミノグリカンが HGF を誘導することを明確にし、糖鎖工学分野での増殖因子との関連に対する新しい知見を示唆したものであり、明らかに学術水準を高めたものと認める。