

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 小林 亮太
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第529号
学位授与の日付 令和5年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Investigation of signaling pathways regulating both cell motility and proliferation of cultured oral keratinocytes for therapeutic use
(培養口腔粘膜角化細胞の運動能と増殖能を制御するシグナル伝達経路の解明)

論文審査委員 主査 教授 泉 健次
副査 教授 富原 圭
副査 教授 多部田 康一

博士論文の要旨

【背景】

自家口腔粘膜上皮細胞シートは、両側性角膜上皮幹細胞疲弊症の治療目的に再生医療製品としてわが国で商品化されている他、食道や泌尿器疾患への適用もあり、培養口腔角化細胞は現在再生医療に最も利用されている細胞ソースの一つとして脚光を浴びている。これまでの自家口腔粘膜上皮細胞シートの角膜移植の臨床報告から、上皮細胞シート移植後の治療効果は、移植されるシート内の幹細胞の割合に依存するとされ、培養中に幹細胞集団を維持することが極めて重要である。移植用細胞が安定的、高品質かつ大量に培養されるための品質管理は不可欠で、その技術として培養細胞を非侵襲的に定量評価する画像解析技術が注目されている。我々はこれまでに、口腔角化細胞の品質を非侵襲的かつ定量的に評価する新しい画像解析技術を開発した。オプティカルフローアルゴリズム (OF) を用いたこの解析技術で、細胞/コロニー運動能が細胞増殖能と相関することを明らかにし、運動能評価が口腔角化細胞の細胞品質評価法として有用であることが分かった。しかし、口腔角化細胞の運動、増殖に関連する分子機構は明らかではなかった。本研究は、まず細胞/コロニー運動および増殖能に影響を与える成長因子成分を検討し、続いて細胞内シグナル伝達とその下流経路を探索、同定することを目的とした。

【材料および方法】

口腔角化細胞はインフォームドコンセントを得た患者口腔粘膜から単離し、基礎培地 EpiLife® に成長因子カクテルを加えた EpiLife®完全培地で培養、継代した。細胞運動能の指標として、タイムラプス動画に OF を用いた解析法から MMS (mean motion speed: 細胞平均運動速度) (μ m/hour)を算出、増殖能の指標として細胞数をカウントして PDT (population doubling time)を算出した。シグナル伝達経路を絞り込むためにまず、培地成分解析を実施した。EpiLife®基礎培地に成長因子カクテル成分 (トランスフェリン、ヒドロコチゾン、IGF-1、PGE2、EGF) のうち1因子を添加した培地、および EpiLife®完全培地から1因子を除いた12種類の培地で培養した細胞の細胞/コロニー運動能と増殖能を解析 (n=7)。さらに、EpiLife®完全培地で培養した細胞に対し EGF と他2因子のレセプター遺伝子に対する siRNA による細胞運動能を評価した (n=3)。

さらに、シグナル経路探索、同定のため、基礎培地 EpiLife®に EGF を加えた培地中に、特異的阻害剤 (PD168393 (EGFR 阻害剤)、LY294002 (PI3K/Akt 阻害剤)、PP2 (Src family kinase 阻害剤)、LLL12 (STAT3 リン酸化阻害剤) および U0126 (MEK1/2 阻害剤)) を加えて細胞培養し、細胞運動能と増殖能の評価 (n=10) と、ウェスタンブロット解析 (n=5) を行った。統計処

理は一元配置分散分析（ANOVA）に続いて、Tukey-Kramerの多重比較を用いて分析した。

【結果】

基礎培地 EpiLife®に1因子添加、完全培地から1因子を除いた両方の培地成分解析で、MMSはEGFの添加、除去した培地で有意に上昇し、PDTはEGFを添加した培地で有意に減少させることから、培養口腔角化細胞の細胞運動能と増殖能はEGFに起因することを見出した。

また、EpiLife®完全培地においてsiRNAによるEGFRのノックダウンにより細胞運動能が著しく低下した。さらに、基礎培地 EpiLife®にEGFを添加した培地にEGFRに対する特異的阻害剤のPD168393で薬理的阻害試験を行ったところ、細胞運動能と増殖能を著しく低下し、かつp-EGFRの発現が抑制されていた。以上から、EGF/EGFRシグナル伝達経路が培養口腔角化細胞の細胞/コロニー運動および増殖能に大きく関与していることが示唆された。

続いて、EGF/EGFRによって媒介される下流シグナル伝達経路を同様の方法で探索、同定した。LY294002は関連するシグナルタンパクのリン酸化を抑制し、PD168393同様に培養口腔角化細胞の運動能と増殖能を有意に減少させた。PP2は、p-Srcとp-EGFRの発現をブロックし、運動能を著しく低下させたが、増殖能は低下させなかった。一方、LLL12とU0126は、基質のリン酸化を抑制するものの、運動能と増殖能を低下させることはなかった。最後に、p-Srcとp-EGFRを阻害するとE-cadherinの発現が促進され、細胞増殖傾向と一致することから、活性化したEGFRとSrcが細胞-細胞間の接着を負に制御していることが示唆された。

【考察および結論】

本研究は、EpiLife®完全培地に含まれるEGFがEGFRを活性化することで、数多く報告されているEGF/EGFR下流伝達経路のうち、Src/PI3K/Akt/mTORシグナル経路が培養口腔粘膜角化細胞の運動能と増殖能に大きな役割を果たしていることを、初めて明らかにした。また、培養口腔粘膜角化細胞の“細胞品質”の観点から、増殖期細胞の増殖能は効率的な細胞シート作製につながるため、品質評価ツールとして本実験で用いた運動能を指標とすることは妥当と考えられる。従って、EGFR/Src/PI3K/Akt/mTORシグナル伝達経路が主に培養口腔角化細胞の運動能と増殖能を制御する知見は、細胞シート作製に至るまでの増殖期細胞の効率的な細胞増殖や幹細胞性能維持を担保するために有効と考えられている薬理学的操作を実施する上で重要なデータとなることが示唆された。

審査結果の要旨

本研究は、再生医療における代表的な細胞資源として高い関心を集め、上皮細胞シートとしてのモダリティーで需要が高まっている培養口腔角化細胞について、その運動能と増殖能に着目した上で、運動能と増殖能をコントロールしているシグナル経路を探索する研究内容である。口腔粘膜角化細胞の運動と増殖を調節するシグナル伝達機序に関して、分子機序に至る詳細な解析を行った本研究の成果は、わが国で開発、臨床応用が進められてきた、口腔角化細胞の眼科領域、つまり角膜移植という臨床応用の質をさらに向上させる上で、極めて重要と考えられる。細胞シート技術の応用によってわが国での自家培養口腔粘膜上皮細胞シートの製品化が実現している現状において、3つの主要なステップで構成される細胞シート作製技術のうち、2番目の培養細胞を大量、かつ効率的に増殖させるための薬理的アプローチ法の創製という面に対する貢献が期待できる研究といえ、それに加えて、他の組織由来の細胞を用いた上皮細胞シート技術への波及効果も期待できる研究である。また本研究は、小林氏が所属する研究室でこれまでに確立してきた細胞運動能（増殖能）を、非侵襲的に測定することを可能とした画像解析技術をベースに行われた。このことは、移植に用いる培養口腔粘膜角化細胞を破壊せずに、つまり、マーカー発現解析などの破壊検査に頼らずに、細胞の増殖能を予測する技術を元に行っているために、実際に移植用細胞培養時にも利用可能な技術でもある。上記の2点において、臨床歯学ならびに再生医工学における学術的重要性が高く、臨床的発展性が期待される優れた研究内容である。

本研究は3つの主要な解析によって構成されている。まず、培地に添加されている増殖因子のうち、どの成分が培養口腔粘膜角化細胞の運動能、増殖能に寄与しているかを検討した。12種類の培地を作製し、所属する教室で独自に確立した動画に対する画像解析によって細胞の運動能を定量化、増殖能算出をリンクさせ

ることで、EGFが中心的役割を担っているという結論を導いた。初代培養細胞を用いた実験であることから、信用度の高いデータを得るにはサンプル数がある程度必要であり。得られた多くのデータに対して的確な統計学的処理を行うことで、培地組成に対する結論に至り、その後の分子生物学的解析の幅を絞り、道筋を引いたことは本研究の科学的価値の高さを意味している。

次に、上記検討で突き止めたEGFを含めた培地成分の直接的リガンドである特異的レセプターに対して、RNA干渉を用い特異的レセプター遺伝子をノックダウンすることによる細胞運動能の解析を実施した。EGFRというEGF特異的レセプターの結合によって運動能が制御されていることが明らかになったことで、EGF/EGFR軸に焦点を絞ることができたことは、本研究のユニークさを際立たせている。

最後に実施した3つめの実験がこの研究の肝となっているが、EGF/EGFRシグナルの下流経路の同定を、各種阻害剤を培地に添加して実施したところ、Src/PI3K/Akt/mTORシグナル経路が培養口腔粘膜角化細胞の運動能と増殖能に大きな役割を果たしていることを明らかにした。この発見は小林氏が渉猟する限り過去に報告がなく、本研究の最も特筆すべき点といえる。特に他の正常細胞種では増殖能を司る経路として、STAT3やErk1/2が下流経路とする報告があるにもかかわらず、Src/PI3K/Akt/mTORシグナル経路を同定したことは、再生医療における薬学的アプローチを実践する上で、その科学的価値を高めている。この結果から、このシグナル経路を活性化することで、移植用細胞の“質”を高める、あるいは、質が低下してしまった細胞を元の状態に戻す手段を得られることが期待され、大きな意義を持つ。

また、この実験で注目したSrc分子は、EGFRの下流にあるだけでなく、EGFRの上流からもシグナル経路を制御している可能性が示唆された。これに関しても正常細胞を対象とした研究では過去に報告を見ない所見であり、大きな意義があると認められ、画期的な薬学的アプローチ方法が開拓されていく端緒になり得る貴重なデータと考える。他の細胞と今後比較することで、この所見が口腔粘膜角化細胞独自の経路であるとすれば、口腔粘膜上皮特異的なシグナル制御の発見となることから、本研究が高いポテンシャルを有しているといえる。

一方で、本研究は専ら正常口腔粘膜角化細胞のみをターゲットとしているが、これまでの報告では、EGF/EGFR軸のカスケードの異常は癌細胞の特徴であると言われており、さらにSrc自体もオンコジーンと言われている。従って、このシグナル経路を活性化する薬学的アプローチ自体は、細胞の悪性化と表裏一体の関係性があることは否定できない。今後の研究の方向性として、正常細胞としてのさらに詳細なシグナル経路（巨大Src分子を構成する8つの分子の解析など）解析と同時に、悪性化についても検討を行う必要性もあげることができ、将来的な目標設定が明確となることで、癌研究にも貢献できる可能性を秘めており、今後の新たな成果に結びつくことも想定でき、非常に興味深い。

本研究では実施していないが、EGFRに代表される受容体型チロシンカイネースは、ROCK1/2分子への入力もあると報告されている。この分子は直接的に細胞運動に関わっている偽足内のアクチン線維の重合や再分布、アクトミオシン線維の収縮を支配している。本実験における細胞運動能は、細胞運動を画像解析によってピクセル化して定量したものであり、実際の細胞運動を解析したものではない。従って、細胞運動の直接的な解析にはアクチン線維分布などの、よりミクロな視点からの解析が求められ、今後そのような解析や課題も残されていることから、将来性をもった非常に有意義な研究であると言え、学位論文として十分な価値が認められる。小林氏の最終目標は、この研究成果と技術が口腔粘膜角化細胞の再生医療の現場で実践されることとしている。本研究を推進することで、分子生物学的基盤をベースにした、ヒト移植用細胞の質の担保、独自の細胞品質管理が可能となり、また、解析手法も非侵襲的に行われることから、臨床現場への応用もスムーズにできることが想定され、本論文が口腔粘膜上皮の再生医療の発展に大きく寄与することを期待する