

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	MONIR MAH ZABIN BINTA
学位	博士(歯学)
学位記番号	新大院博(歯)第282号
学位授与の日付	平成25年9月20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	Characterization of an oral fibroblast phenotype cultured in oral keratinocyte-conditioned medium (口腔粘膜上皮細胞培養上清で培養した口腔粘膜繊維芽細胞の形質に関する検討)
論文審査委員	主査 小林 正治 教授 副査 織田 公光 教授 副査 泉 健次 教授

博士論文の要旨

【緒言】

上皮組織に比べ上皮結合組織に存在する線維芽細胞は、通常ほとんど細胞分裂を起こさず、“休止”状態で、タンパク合成という観点からも“不活化”である。しかし、線維芽細胞は組織創傷という刺激によって“活性化”し、増殖、遊走、収縮、タンパク合成を盛んに行う。ところで、血清含有培地による平面培養環境下の線維芽細胞は、非常に盛んに細胞分裂を行うので、生体の創傷治癒過程で見られる“活性化”線維芽細胞に近いと考えられる。薬品や化学物質に対する線維芽細胞の反応を検証する研究では通常“活性化型”線維芽細胞が用いられてきたが、この結果をそのまま“不活性”状態にある生体の線維芽細胞の反応として外挿することに対し私は疑問をもってきた。こうしたギャップを改善する手段として、コラーゲングル中で3次的に培養した線維芽細胞を用いる手法が近年用いられているが、3次元培養を開始する直前まで平面培養細胞は“活性化”型のままであるが、私は3次元培養を始める以前から線維芽細胞は“不活性”型であるべきと考えている。今まで、放射線照射と皮膚上皮細胞の培養上清を使う方法が平面培養下でも皮膚線維芽細胞を不活性型にできると報告されているが、口腔粘膜の培養細胞に関する報告はない。本研究では、ラボで廃棄される口腔粘膜上皮細胞の培養上清が単層培養口腔粘膜線維芽細胞を不活性型に変化させるのに有効かどうかを検証することを目的とした。

【材料および方法】

ヒト初代口腔粘膜上皮細胞と線維芽細胞はそれぞれ無血清培地であるEpiLife® (0.06mM Ca⁺⁺)と10%ウシ胎児血清含有DMEM培地で連続平面培養した。培養上清はコンフルエントに近い若い継代数の口腔粘膜上皮細胞を24時間培養後に回収、保存した。10%ウシ胎児血清含有DMEM培地で培養を行ってきた口腔粘膜線維芽細胞は、各種マイクロプレートに播種した後、10%ウシ胎児血清含有DMEM培地(DMEM-CS)、DMEM培地単独(SF-DMEM)、口腔粘膜上皮細胞培養上清(OK-CM)の3種類の培地を使用し、最長96時間培養した細胞の表現型の変化を、MTT assayによる細胞増殖能、細胞周期解析、βガラクトシダーゼ活性発現による細胞老化、ELISA法による各種タンパク質合成能を測定して検討した。

【結果】

培地交換後48時間の細胞増殖能は、有意にDMEM-CSで培養した細胞で高く、この差は96時間

後には一層顕著となった。OK-CM で培養した細胞は 96 時間以内で増殖傾向を保ったのに対し、SF-DMEM で培養した細胞では 96 時間後には増殖能が低下（細胞数の減少）が認められた。細胞増殖能の結果は、細胞周期解析での同様に現れた。すなわち、DMEM-CS で培養した細胞では OK-CM や SF-DMEM で培養した細胞に比して、有意に G0/G1 期の細胞が少なく、S 期の細胞が多かった。しかし、G2/M 期の細胞に有意差は認めなかったことから、OK-CM や SF-DMEM で培養した細胞は G0/G1 期停止の可能性が示唆された。線維芽細胞の表現型鑑別に有効と言われている β ガラクトシダーゼ活性は、SF-DMEM の培養では多くの細胞が β ガラクトシダーゼ活性を示したのに対して、OK-CM や DMEM-CS 培養では β ガラクトシダーゼ活性を示した細胞は少数であった。このことは、OK-CM で培養した口腔粘膜線維芽細胞は休止期にいるものの、細胞増殖能が失われたわけではないことを示した。同時に細胞の形態的变化として、DMEM-CS 培養細胞では紡錘形であったのに対し OK-CM 培養では非常に細長い形態を示した。さらに、OK-CM で培養した口腔粘膜線維芽細胞のタンパク合成能を角化細胞増殖因子 (KGF)、I 型コラーゲン、MMP-1 の培地中への放出量を測定したところ、KGF の 48 時間分泌量は培養 96 時間以内で絶えず認められた。さらに OK-CM での培養では、DMEM-CS での培養に比べ細胞は I 型コラーゲンの産生量が有意に低いものの、MMP-1 の産生量は同程度であった。

【考察】

本研究から、無血清培地 EpiLife ベースの OK-CM で、口腔粘膜線維芽細胞の培養が可能であった。この線維芽細胞の表現型は、皮膚上皮細胞の培養上清を使った過去の報告と同様に、線維芽細胞の増殖能を抑制した。また、細胞周期分布は、通常の DMEM-CS による増殖傾向の高い“分裂”型の線維芽細胞と違い、細胞周期は“静止”しており、“不活化”状態の線維芽細胞に変化していることを突き止めた。一方で β ガラクトシダーゼ活性は低く、“静止”しているものの、細胞の増殖能は保持されていることも示唆された。意外にも分裂能を失っていないにも関わらず KGF の十分な産生能を有しており、これは OK-CM を介しての上皮細胞と線維芽細胞の相互作用が関与していることが考えられた。さらに、DMEM-CS 培養に比べ I 型コラーゲンの産生能は有意に低く、MMP-1 の産生は十分あることから、OK-CM 培養の口腔粘膜線維芽細胞はどちらかという細胞外基質分解性の性質であることが示唆された。以上から OK-CM によって口腔粘膜線維芽細胞は特異的な表現型となり、平面培養に利用可能であることから、3 次元培養に利用することでより生体に近いビトロモデルに貢献すると考えられた。

審査結果の要旨

論文の内容に関して試問を行い以下のような返答が得られた。

本研究の背景と意義として、上皮結合組織に存在する線維芽細胞は *in vivo* では細胞の増殖という観点から不活化の状態にあるが、培養環境下では活性化された状態となる。生体と同じように不活化の状態にある線維芽細胞の反応を検証する研究には、活性化している線維芽細胞ではなく不活化型線維芽細胞の培養系を確立することが有用と考え、本研究を行った。さらに、究極の目標は現在本学医歯学総合病院で患者様を対象に実施されているヒト培養口腔粘膜移植による口腔粘膜欠損部再建の臨床応用プロトコールへ採用することである。現在は、患者の上皮細胞のみをもちいて口腔粘膜を作成しているが、組織再生の観点から線維芽細胞を組み込んだほうがより生体に近い培養粘膜が作成できることが強く示唆される。上記 2 つの観点から、われわれは口腔粘膜上皮細胞培養に無血清培地を用いており、これは EGF、IGF-1、トランスフェリン、PGE2、ヒドロコチゾンを含むが動物由来物質不含であり、再生医療を実践するという点でこの培地を使う限り本学の培養口腔粘膜臨床応用プロトコールへの導入が現実的かつ容易である。同時に、皮膚上皮細胞の培養上清を用いると皮膚線維芽細胞の培養で不活化型にできるとの報告があることから、本研究では口腔粘膜上皮培養細胞上清を用いて口腔粘膜線維芽細胞を不活化型に変化させられるのではないかと考え研究を進めた。これが証明されれば、コストの面からも上清の使用は経済的である、と力説していた。

細胞増殖に関連して、MTT アッセイを本研究では用いた。なぜなら MTT アッセイの吸光度と細

胞数との関連は正の強い相関を示すからである。そして、上清による細胞増殖能の抑制メカニズムについて考えていることは、上皮細胞から放出された何らかのサイトカインや上皮細胞培養によって低下したグルコース濃度、低 Ca 濃度など培地の組成変化が線維芽細胞の増殖能の抑制に関与していると考えられる。今後さらに上清中の各種サイトカインの含有量について調べ、上清を介しての上皮細胞と線維芽細胞の相互作用や線維芽細胞増殖能抑制メカニズムについて検討したいと考えている。また、セルソーターを用いて細胞周期分析を行ったところ、上清による細胞増殖抑制とよく合致するセルサイクルプロファイルが得られたと同時に、アポトーシスは確認されなかったため、アポトーシスによる細胞減少は否定してよいと考えた。

続いて、口腔粘膜上皮の培養上清で培養した線維芽細胞の形質変化についてであるが、Senescence associated β -galactosidase 活性を用いた。これは酸性条件下でベータガラクトシダーゼ活性の増強は、老化現象と特徴付けられているからである。無血清 DMEM 培地では細胞の老化が顕著であったが、血清入り DMEM 培地と培養上清で育てた線維芽細胞では、陽性を示す細胞数は少なく、老化の進行はないことがわかった。すなわちこれらの所見から、上清で培養した線維芽細胞の増殖能は低い、老化のためではないこと、そして増殖能は MTT アッセイからも維持されていることから、細胞形質的には *in vivo* の線維芽細胞と似た特徴を有すると考えられた。また、今回 72 時間の暴露で細胞の反応を見ているが、もっと長期に培養すると今回示したのとは別の所見が得られるかもしれないと、今後の研究に対する意欲が見られた。たさらに定量的な測定法を用いてさらに解析をすすめればもっと質の高いデータが得られたと反省しており、今後の努力が期待された。これに関連して、もっと長期に培養した場合の可能性を問うたところ、血清中に線維芽細胞のフラスコへの接着を誘導する因子が存在するという報告を引用し、無血清 DMEM 培地ではいずれ細胞がフラスコ表面から剥がれていくのではないかとこの考察をしていた。つまり接着性増殖を示す細胞なので、死滅することが予想される。一方、上清で細胞培養した場合は、こちらは無血清であるが、上清中に含まれる上皮細胞由来の成長因子によって、線維芽細胞は細胞外基質を産生する能力が高まっていることが予想されるので、もしかすると増殖しないまでも、静的に長期培養が可能であるかもしれないと答えた。

最後に、本研究の将来性について培養上清を用いて平面培養した線維芽細胞は細胞周期が静止して不活化の状態にあったことから、これを三次元培養に応用することで生体に近いモデルを確立することに貢献できると考えられる。生体に近い三次元培養モデルができれば、様々な薬品や化学物質に対する線維芽細胞の反応を検証する研究にも有用であると今後の抱負を述べていた。加えて、申請者は一部の未発表データも示し、3次元ゲル中の培養モデルでは一般に線維芽細胞の I 型コラーゲンの産生能は平面培養に比べ低下するが、これがゲル培養中の線維芽細胞の形質変化によるものではなく、細胞増殖能の高低による結果がゲルの収縮を左右することを付け加えていた。

以上より、本研究を学位論文として価値のあるものと認めた。