

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 原 夕子  
学位 博士 (歯学)  
学位記番号 新大院博 (歯) 第372号  
学位授与の日付 平成29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 Hypoxic response of human oral mucosa fibroblasts in a 3D collagen lattice  
(コラーゲンゲル内で3次元培養したヒト口腔粘膜線維芽細胞の低酸素応答)

論文審査委員 主査 教授 高木 律男  
副査 教授 吉江 弘正  
副査 教授 泉 健次

### 博士論文の要旨

#### 【目的】

創傷部は局所血管の破壊や組織の酸素需要量の増加により、一時的な低酸素状態となる。こうした創傷初期の低酸素環境は、組織修復に必要なさまざまな因子を亢進させ、治癒を速やかに進行させる。創傷治癒のメイン細胞は線維芽細胞であり、線維芽細胞の低酸素応答の解析は創傷治癒のメカニズムを理解する上で非常に重要である。臨床的に口腔粘膜組織は皮膚組織に比べ治癒が速く、瘢痕を伴わない傾向にある。口腔粘膜と皮膚の創傷治癒過程の違いを解析することは、皮膚瘢痕形成の新たな治療法の手がかりとなる。そこで我々は、創傷部組織が治癒の初期で極度の低酸素状態となることに着目し、線維芽細胞の低酸素応答の違いが口腔粘膜と皮膚の創傷治癒の違いの発端になるのではないかと考えた。本研究では、コラーゲンゲルモデルを用いて3次元的に培養したヒト成人口腔粘膜線維芽細胞の創収縮と組織リモデリングに関しての低酸素応答を解析することを第一義的な目的とし、ヒト成人皮膚線維芽細胞と比較した。

#### 【材料と方法】

ヒト初代口腔粘膜 (P3-5) 及び皮膚線維芽細胞 (P3-6) は、10%ウシ血清含有 DMEM 培地で、5%CO<sub>2</sub>、21%O<sub>2</sub>、37℃にて連続培養した後、線維芽細胞をコラーゲン溶液に混合し、ゲルに包埋した。細胞の低酸素応答の観察には浮遊モデルを使用した。すなわちゲルを低接着 24-well マイクロプレートウェルに播種し、正常酸素 (21%O<sub>2</sub>) または低酸素 (5%O<sub>2</sub>, 1%O<sub>2</sub>) で最長7日間培養した。低酸素暴露2日目と7日目の細胞増殖活性を MTT アッセイで、ゲル収縮率をゲルサイズで測定した。さらに、筋線維芽細胞への分化の指標である  $\alpha$ -SMA、組織リモデリングの指標ある MMP-3、細胞移動に関与する CEMIP の発現をウェスタンブロットで解析し、低酸素環境での発現の違いを観察した。

#### 【結果】

(1) 口腔および皮膚線維芽細胞の細胞増殖活性は、低酸素状態で培養したほうが低かった。特に、口腔線維芽細胞の2日目と皮膚線維芽細胞の7日目で有意に減少した。2日間培養では、すべての酸素条件において、細胞増殖活性は口腔線維芽細胞の方が高く、21%O<sub>2</sub>および1%O<sub>2</sub>において統計学的に有意であった。7日間培養では、口腔および皮膚線維芽細胞において非常に類似した傾向を示し、各酸素条件下で細胞増殖活性に有意差はなかった。

(2) コラーゲンゲルは酸素濃度にかかわらず、サンプルすべてが7日間収縮し続け、ゲル収縮率は皮膚より口腔の方が低かった。口腔線維芽細胞のゲル収縮率は、5%O<sub>2</sub>で最も高く、1%O<sub>2</sub>で最も低かった。対照的に、皮膚線維芽細胞のゲル収縮率は21%O<sub>2</sub>に比べ、低酸素では収縮率が低かった。しかし、コラーゲンゲル収縮率の異なる酸素濃度間における統計学的有意

差は認められなかった。

(3) ウェスタンブロット解析では、2日間培養した場合、 $\alpha$ -SMAの発現は口腔および皮膚線維芽細胞ともに5% $O_2$ で高かった。1% $O_2$ 下では、口腔線維芽細胞は21% $O_2$ と同等の発現量であったが、皮膚線維芽細胞では下方制御された。MMP-3の発現は低酸素環境で、皮膚線維芽細胞において減少したものの、口腔線維芽細胞では著明に増加した。CEMIP発現は、口腔および皮膚ともに低酸素環境で減少した。7日間培養した場合、口腔線維芽細胞は低酸素条件下で $\alpha$ -SMAおよびMMP-3の発現が増加した。皮膚線維芽細胞は $\alpha$ -SMAの発現は低酸素状態で減衰し、MMP-3発現は5% $O_2$ でのみ減少したが、1% $O_2$ でわずかに増加した。CEMIPの発現は、口腔および皮膚ともに低酸素環境で減少した。酸素条件にかかわらず、CEMIPの発現量そのものの低下は2日目と比較して7日目のほうが顕著であった。

#### 【考察】

本実験モデルを用いた研究は世界的にも前例がないため実験系の設定がまず重要であった。3次元培養ではゲル収縮の測定が容易な浮遊モデルを、低酸素環境としては口腔粘膜と皮膚の生体内酸素濃度を測定した他者のデータから5%と1%の酸素濃度を用いた。低酸素環境における増殖活性の変化から、口腔粘膜線維芽細胞は皮膚線維芽細胞に比べ低酸素応答への順応は速いが、持続しないことが示唆された。ゲル収縮は、低酸素暴露前にほとんど起きたため、低酸素の影響について解釈が難しかった。ウェスタンブロット解析では両細胞の $\alpha$ -SMA発現とゲル収縮度との相関は見られなかった。MMP-3とCEMIPの発現は、本研究で最も口腔粘膜と皮膚線維芽細胞の差が顕著であったが、口腔粘膜線維芽細胞の低酸素環境における組織リモデリング能が高いことが示唆された。

#### 【結論】

口腔粘膜線維芽細胞は、低酸素に陥っている創傷治癒の初期段階において、治癒を促進する組織リモデリングと細胞移動能が高いことが皮膚創傷治癒の違いの一因であると考えられた。

#### 審査結果の要旨

ゲルを浮遊培養して実施した本研究手法と実際の創傷治癒の関連について（接触型による創傷治癒への影響も含め）は、創傷部の肉芽組織の機械的刺激が存在する環境あり、治癒が進行し正常に近い状態に回復した時の外的ストレスを受けやすい状態となるという考え方もあり、それによれば、創傷部の外的ストレスの存在する”拘束モデル”、のちにストレスから解放された”浮遊モデル”が相当する。従って、さらに詳細にインビトロで創傷治癒の実験をするには、”浮遊モデル”に加え”拘束モデル”で同様の実験を行い、2つのモデルを比較することで、口腔粘膜・皮膚線維芽細胞の低酸素応答や組織の収縮メカニズムの違いが解明できるとのことで、今後の実験が期待された。本実験に用いた酸素濃度21%、5%、1%の意義について問うたところ、これまでの報告で非創傷部の歯肉や皮膚（結合）組織の酸素状態は5%前後で、さらに両組織の創傷部の酸素濃度（分圧）は1%と示されている。従って、本実験では、通常の細胞培養環境である酸素濃度21%を対照とした上で、正常な口腔粘膜や皮膚の線維芽細胞層の酸素濃度として5%を選択し、組織が受傷したときの酸素濃度として1%を選択した。この条件で得られた結果を比較することで、*in vitro*で創傷時、非創傷時の口腔粘膜や皮膚組織における酸素濃度における両細胞の応答の違いを比較できるという根拠が示された。

さらに、ゲルの内部は同等の酸素状態になっているのかの問いには、技術的に現段階では、測定できるプローブが存在しないため不可能でありながら、チャンバー内に酸素モニターを入れ、酸素濃度をモニタリングし、ゲル内の酸素濃度については低酸素プローブを用いることで、蛍光顕微鏡にて視覚的に確認することは可能であるという、方法論的考察を正確に行っていた。また、実験とは直接関係ないものの、気圧を高めることで血中酸素濃度は上がるか？についての問いには、通常酸素濃度では97%程度が“結合型酸素”であり、血漿中の溶解型は数%しか存在しないため、酸素吸入をしても結合型酸素が100%になればそれ以上体内に酸素は取り込めないが、高圧酸素療法では2気圧程度に気圧を高め、100%酸素を吸入させると、 $PV=nRT$ の法則から $nRT$ （ $R$ は定数、 $T$ は温度）は一定のため、 $P$ （圧）を高めると酸素の $V$ （体積）が減少し、より多く酸素を血管内に送ることができ、ヘモグロビンに結合する“結合型酸素”は飽和状態でも、加圧により血漿中の“溶解型酸素”を増加させることができ、血中の酸素濃度は上昇する、という生理学的に的確な回答が得られた。これに関連して、血管がない組織の酸素濃度と周囲の酸素濃度や気圧の影響については、創傷部の底部から細胞増殖が進行していくため、血管形成により溶解型酸素を運搬する必要があるが、血管が形成されていない状態では、酸素の運搬までできないので、気圧の影響で酸素の体積が減少する程度の変化しか起きないと説明があった。

また、気圧を高め酸素分圧が上がることで、血管新生が生じるかについては、HIF-1は低酸素環境で発現するタンパクで、創傷部の血管新生、細胞増殖、炎症細胞浸潤等に関わる因子を上方制御することが明らかになっている。しかし、高気圧酸素療法下の低酸素と正反対の環境でも、HIF-1やVEGF（血管内皮細胞増殖因子）が上昇するといった報告が認められる。これは低酸素によってHIF-1が直接発現のではなく、高気圧酸素状態で発生する活性酸素（ROS：スーパーオキシドイオンO<sub>2</sub>-・や過酸化水素H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>など）によりHIF-1の発現が高められ、VEGFの発現も亢進し、血管新生が行われるのではないかと、詳細な論議があった。

続いて本実験において、主に方法論について掘り下げた問いを投げかけた。まず、本実験で用いたヒト線維芽細胞についての情報とサンプル数については、すべてヒト初代培養細胞であり、口腔粘膜ではICを得てから歯肉から採取したもので、皮膚については購入した細胞を用いていた。年齢は20-30代に統一され、皮膚の採取部位は様々であったが、口腔との遺伝子発現の差は歴然であり、実験に影響はほとんどないと判断していた。またサンプル数は初代培養細胞ということで、今後増やす予定とのことであった。ウェスタンのサンプル数は3であり、代表的なサンプルが提示されているということだった。MTTアッセイで低酸素培養2日目と7日目を選択した理由については、局所毛細血管の破壊によって生じた低酸素期間での細胞増殖ピークが2から3日間と考えられるため、2日間を選択し、正常な治癒が進行しない場合、低酸素期間が継続するため、7日間の低酸素暴露期間も設定し、治癒不全環境（低酸素環境の持続）での細胞増殖活性をあわせて比較検討することにした、という回答であった。また、ゲルの収縮について、学位論文では検討されていない口腔粘膜と皮膚の2日目、7日目で統計学的有意差については、2日目では口腔と皮膚の21%培養において、7日目では口腔と皮膚の21%、1%培養で有意差が認められたとのことであった。また、 $\alpha$ -SMAの発現とゲルの収縮が相関がみられなかった理由についての回答は、 $\alpha$ -SMAの発現とゲルの収縮が相関が認められると仮説を立てていたが、ゲル収縮が筋線維芽細胞の割合だけによらず、他の要因も関わっていることが推測されるとのことであった。 $\alpha$ -SMA発現レベルを筋線維芽細胞の数的マーカーとして用いたが、単に線維芽細胞の数的な視点以上に、個々の細胞が細胞収縮を引き起こす質的な面、アクトミオシン発現量など、からアプローチすることで相関性が見られるようになるのではないかと考察していた。 $\alpha$ -Tublinのローディングコントロールとしての妥当性に関しては、 $\beta$ -actinの場合には、低酸素環境による発現変化がおきるという懸念から、低酸素の影響をうけづらいとされる $\alpha$ -Tublinをローディングコントロールとして用いた本実験手法は納得できる。加えて、ウェスタンブロット法の結果で記載されている数値については、便宜的なもので、統計学的、生物学的な意味合いはないので、投稿時を用いないという正直な回答だった。さらに、MMP-3のみを選択した理由、およびCEMPを細胞増殖の指標としてみるることができるのかについての問いに対し、MMP-3活性の阻害がコラーゲンゲル収縮を有意に阻害するため、多く存在するMMPのうちMMP-3を選択したこと。そして、培養上清においてType I、IIIコラーゲンの分解に関わるMMP3,10,13の定量を行う予定ということであった。CEMPはヒアルロン酸結合タンパクでヒアルロン酸分解と細胞増殖を刺激するタンパクであることが分かっている、口腔粘膜線維芽細胞の細胞増殖に対して用いたのは本実験が最初であるが、がん細胞浸潤の指標にも用いられているので、妥当と考えているようであった。かつ、ヒアルロン酸分解を司っているので、MMP同様、組織リモデリングにも関わる指標としても扱えるかもしれないということであった。

最後に今後の研究の方向性を中心に質疑を行った。用いた細胞密度についてコメントを求めたら、本実験で用いた、MTT assayとゲル収縮観察用の220cell/ $\mu$ l (cell/gel)とウェスタン用の400cell/ $\mu$ l (cell/gel)の細胞密度は、組織切片観察した文献から想定される正常のin vivo組織の細胞密度に該当し、生体模倣した播種密度であったとみなすことができるという、非常に示唆的な回答が得られた。そして、皮膚の癒傷形成予防に結びつけるために、本実験データをベースにさらに実施しないといけない実験については、創傷治癒に関わる液性因子であるVEGF, PDGF, FGF, TGF- $\beta$ などの成長因子の組織内レベルも創傷治癒過程で口腔、皮膚、低酸素環境で影響を受けるために、違いが生じていることが大いに推測されるので、その定量が必要とのことであった。HIF1- $\alpha$ 発現を操作することによる創傷治癒治療につなげるためのアプローチ法については、申請者は、論文に掲載していないが本実験を継続して行い、低酸素環境における細胞でHIF1- $\alpha$ 発現を確認していた。この結果は、学位論文に掲載したデータから考察される創傷治癒不全の治療に対する戦略が、さらに広がったことを意味すると同時に、学位論文のデータはHIF1- $\alpha$ を介した反応である可能性が高くなったと述べた。すなわち、創傷治癒に応用する戦略として、HIF1- $\alpha$ の発現をON/OFFすることで、治癒をある程度コントロールできるのではないかと期待していた。さらなる実験が必要としながらも、阻害剤や活性化剤を用いた薬理的療法が純粋に考えら

れるということであった。

本研究は、現在の創傷治癒生物学の実験体系において、近年動物実験を行わない趨勢に世界が向かっている中で、有効なインビトロモデルとしての可能性を提案した画期的な研究といえる。もちろん、動物実験でしか証明されない、たとえば炎症性細胞の相互作用が複雑に関連するようなメカニズムなど、創傷治癒機構、創傷治癒不全メカニズムは存在するが、インビトロモデルとしては、これまで用いられてきた2次元培養に代わり、3次元培養と、低酸素環境下の培養の有用性を強く示唆するものである。さらに本研究では、手技的なハードルを克服して、2次元培養で実施されている通常の分子生物学的解析を、3次元培養法でも可能としたことも、大いに賞賛される。創傷治癒実験モデルとしてさらに成熟させるためには、さらなる研究を行う必要があるものの、現段階のレベルで本研究は学位論文として十分価値があると認められる。