

論文名：Hypoxic response of human oral mucosa fibroblasts in a 3D collagen lattice.

(コラーゲングル内で3次元培養したヒト口腔粘膜線維芽細胞の低酸素応答)

新潟大学大学院医歯学総合研究科

氏名 原 夕子

緒言：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アップレギュレートし、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うえ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。

目的：本研究では、コラーゲングルモデルを用いて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) および皮膚線維芽細胞 (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。細胞を混合したゲルを低接着 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。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である 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：3D コラーゲングル内で培養された口腔および皮膚線維芽細胞の細胞増殖活性は、低酸素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。コラーゲングルは、酸素条件にかかわらず、すべてのサンプルが7日間収縮し続け、ゲル収縮率は皮膚より口腔線維芽細胞の方が低かった。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。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。ウェスタンブロット解析では、2 日間培養では、 $\alpha$ -SMA の発現は口腔および皮膚線維芽細胞ともに 5%O<sub>2</sub> で高かった。1%O<sub>2</sub> 下では、口腔線維芽細胞は 21%O<sub>2</sub> 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、皮膚線維芽細胞で減少したが、口腔線維芽細胞では著明に増加した。CEMIP の発現は口腔および皮膚線維芽細胞ともに低酸素環境で減少した。7 日間培養では、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<sub>2</sub> でのみ減少したが、1%O<sub>2</sub> 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: 本研究では、コラーゲンゲル内で 3 次元的に培養した口腔粘膜線維芽細胞を用い、細胞の低酸素応答を観察するために低酸素環境下で培養した。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。本実験の 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口腔および皮膚線維芽細胞の増殖活性の変化からは、口腔粘膜線維芽細胞は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。ゲル収縮に関しては、低酸素暴露前にほとんど起きているため低酸素の影響について解釈が難しいと考えられる。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。以上から、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、創傷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における創傷治癒の違いの一因であると考えられた。