

学位論文の要約 (研究成果のまとめ)

氏 名 平 岡 千 寛

学位論文名 ヒト皮膚線維芽細胞は、増殖型とリモデリング型の2つの
クローン・タイプに分類できる

学位論文の要約

各臓器は実質組織と間質組織で構成される。組織幹細胞や多能性幹細胞の研究により、実質組織の再生が実現可能になりつつある一方で、間質組織の再生は大きく遅れている。間質組織は、組織に構造的な強度を与えるだけでなく、実質細胞の増殖や分化も制御していることが明らかとなっている。したがって、今後の臓器再生医療の完成には、線維化の制御を含めて、間質組織の再生が必須である。

間質において、コラーゲンなどの細胞外マトリクスを主に産生しているのは線維芽細胞であるといわれている。また線維芽細胞の機能はそれだけではなく、多分化能を報告する論文もみられる。しかし、線維芽細胞は heterogeneous な細胞集団であり、単一のクローンレベルにおいて、線維芽細胞の特性は解析されておらず、十分には理解されていない機能もあると考えられる。その原因に、通常の培養条件下では線維芽細胞のクローニング効率が低い点が挙げられる。今回我々は、線維芽細胞を顕微鏡下にマイクロピペットを用いて、ひとつひとつ異なるウェルに移して、12日間培養した。その結果、通常酸素培養に比べて、2%酸素培養（以下、低酸素培養）により、ヒト真皮線維芽細胞のクローニング効率が飛躍的に向上することがわかった。また、クローニング後の細胞に、染色体異常が生じていないかを検討するために、通常酸素下、低酸素下でそれぞれ得られたクローンの染色体検査を行ったが、通常酸素培養では染色体異常が多く見られたが、低酸素培養ではそのような異常は見られなかった。本研究では、この手法を用いて線維芽細胞をクローン化し、各クローンにおける増殖能、コロニー形成能、分化能、細胞外マトリクス制御関連遺伝子の発現量、コラーゲン分解活性、コラーゲンゲルの収縮力について、多角的な特性解析を行った。コロニー形成能は、10cm dish に 100 細胞を播種し、12日間培養し、形成されたコロニー数を数えた。また、形成されたコロニーを細胞密度に応じて、高密度(Type A)、中密度(Type B)、低密度(Type C)と分類し、それぞれのタイプのコロニー数を数えた。分化能については、骨、脂肪、軟骨分化について、それぞれ分化誘導培地で2週間培養し、それぞれの分化マーカーの発現量を定量 PCR で評価した。コラーゲン分解活性は、Gelatin Zymography assay を行った。コラーゲンゲル収縮力は、低吸着プレート上で、コラーゲンタイプ I を含むゲルに線維芽細胞ク

クローンを投与し、2日後のゲルの面積を計測し、収縮力を評価した。

まず、クローンにおける特性解析では、各クローンが異なる特性を有しており、ヒト真皮線維芽細胞が heterogeneous な細胞集団であるということが示せた。さらに、それぞれの特性の相関関係を検討するために、スペアマンの順位相関解析を行った。形成されるコロニーを細胞密度に応じて分類したが、Type A colony を多く形成するクローンは、増殖能に優れており、コラーゲンの収縮力が高いことが分かった。一方で、Type C colony を多く形成するクローンは、抗線維化作用を有する MMP2 や Decorin との相関関係が示されており、特徴としては、増殖能は低い、組織をリモデリングする能力が高いということが示された。つまり、線維芽細胞クローンごとの特性解析の結果、形成されるコロニーのタイプによって、機能的に2つのクローンに大別できることを見出した。また、加齢による変化を検討するために、小児株と高齢者株で、形成されるコロニータイプを比較検討してみると、小児株では Type A colony を多く産生するため、増殖能が高いことが示唆され、加齢に伴い増殖能に優れたクローンが減少していることがわかった。この実験結果は、加齢に伴う創傷治癒の遅延など、組織の臨床的な特性と関連しているものと考えられる。

線維芽細胞クローンの特性を解析することで、異なる2つのタイプのクローンに大別した。実際にヒトの体内では、線維芽細胞は、増殖したり、細胞外マトリクスを産生しリモデリングを促進したり、周囲環境からの刺激に応じて、様々な効果を発揮していると考えられる。今後の研究課題としては、それらがどのような刺激によって制御されているのか。今回大別された、2種類のクローンを詳細に解析することで、線維化の制御につながる研究に発展すると考えられる。

なお、この学位論文の内容は、以下の原著論文に既に公表済である。

Hiraoka C, Toki F, Shiraishi K, Sayama K, Nishimura E K, Miura H, Higashiyama S, Nanba D: Two clonal types of human skin fibroblasts with different potentials for proliferation and tissue remodeling ability. *Journal of Dermatological Science*. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2016.01.009