

(第7号様式)

学位論文審査結果の要旨

氏名	平岡千寛
審査委員	主査 北澤 荘平 副査 杉山 隆 副査 中城 公一 副査 加藤 英政 副査 平井 洋生

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

審査結果の要旨

体を構成する諸臓器は、主として上皮細胞からなる実質組織、および主として間葉系細胞と基質からなる間質組織により構成されている。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の基盤として機能していることが明らかとなっている。しかしながら、近年の再生医療を目指した研究の多くは、実質組織の再生を目的とするものであり、間質組織の再生研究は大きく遅れているのが現状である。

申請者等は、間質組織、とくに線維芽細胞の特性を検討する目的で、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、至適培養条件を検討し、2%低酸素培養（以下、低酸素培養）により、ヒト真皮線維芽細胞の増殖効率が飛躍的に向上することを明らかにした。さらに、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を認めないことを示した。申請者等は、この培養手法を用いて、ヒト初代培養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、細胞外マトリッ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（TypeA）、中密度（TypeB）、低密度（TypeC）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。

各クローンにおける特性解析では、TypeA 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く認められる一方で、TypeC 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、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。線維芽細胞クローンごとの特性解析により、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申請者等は見出した。さらに、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、小児株ではTypeA colonyを多く産生する一方で、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。今後、コロニーのタイプが、どのような刺激によって制御されているのかを詳細に解析することで、線維化の制御、再生医療につながる研究に発展することが期待できる研究である。

本研究に関する公開審査会は平成28年1月27日に行われた。本研究は、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出来ることを示し、それぞれがヒトの体内で、増殖型の線維芽細胞、リモデリング型の線維芽細胞に相当することを明らかにしたもので、今後の線維芽細胞分別マーカーの開発や創薬にもつながる重要な研究である。審査会では、本研究にかかわる研究手法に関する問題や、線維芽細胞の多様性とクローニングという概念の整合性、培養レベルの検討をヒトの疾患モデルとする際の妥当性、臨床的な有用性など広範囲に質疑がなされ、申請者はいずれにも的確に回答した。

審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。