

博士論文審査報告書

論文題目

Elucidation and Application of Effective Factors
of Epithelial Cell Culture
for Regenerative Medicine

再生医療本格化のための上皮細胞培養系における
有効因子の解明とその応用

申請者

Makoto	KONDO
近藤	誠

生命理工学専攻 生体制御研究

2013年7月

上皮細胞を用いた再生医療は30年以上前に臨床応用が始まり、従来の薬物治療や外科的治療の問題点を克服するアプローチとして注目を集めている。また、温度応答性培養基材上でコンフルエントまで培養された細胞は、細胞シートとして非侵襲的に回収し、治療や解析に用いることが可能である。重層扁平上皮である角膜上皮や食道上皮の再生のため、同じ重層扁平上皮細胞に分類される口腔粘膜上皮の細胞シートが用いられてきた。従来、重層扁平上皮細胞の培養には異種移植となる3T3細胞がフィーダー細胞として用いられてきたが、イヌ口腔粘膜上皮細胞については3T3フィーダーを排除した条件下でも高い細胞増殖能を示すことが報告されている。しかし、ヒトの口腔粘膜上皮細胞は、3T3フィーダー非存在下では増殖能が低いという動物種間の培養系での挙動の差異が、臨床応用を目指す上での問題となっている。また、培地添加因子としての血清の使用は、動物由来であれば未知の感染の可能性やロット間差、患者自己血清の場合は採取時の侵襲性や、調製工程の人的コスト、成分の個人差が問題となる。以上から、口腔粘膜上皮細胞の適切な無フィーダー・無血清培養系の開発が求められているが、この条件下では培養系における増殖が非常に悪く、安定した再生医療製品の供給のために克服される必要がある。このため本研究では、重層扁平上皮細胞の培養系での有効因子の解明と応用が目指された。

本論文第1章では、再生医学および重層扁平上皮細胞の概説と、上皮再生医療の応用例を挙げ、上皮細胞シート培養系における現状の課題点を述べている。

第2章には、これらを背景とした本論文の目的を示している。

第3章では、6動物種間の口腔粘膜上皮細胞の培養系での比較検討をおこない、細胞増殖能および薬剤感受性の差異を明らかにした。ヒト、ラット、マウス、イヌ、ウサギ、ブタの口腔粘膜上皮細胞のコロニー形成能について比較検討した結果、形成能の高いものからラット、イヌ、ヒト、ウサギ、ブタの順であり、マウスについてはコロニーが非常に小さく計数困難であるという結果を得た。また、3T3フィーダー存在下ではどの動物種の細胞でも細胞シートの作製が可能であったが、フィーダーを除去すると、ウサギやブタではシートの作製は困難であった。3T3フィーダーや培地添加因子コレラ毒素が存在しない、増殖に不利な条件においては、高密度で播種されたイヌ口腔粘膜上皮細胞が非常に高い増殖能を示した。さらに、ヒト表皮角化細胞で報告があるように、培養系においてコレラ毒素はヒト、ラット、マウス、ウサギ、マウスの口腔粘膜上皮細胞のcAMP濃度上昇を惹起するのに対し、イヌ口腔粘膜上皮細胞は影響を受けないことが示された。

第4章では、口腔粘膜上皮細胞の増殖に関する動物種間比較をもとに得た細胞特性に着目し、新たな成長因子としてIL-1レセプターアンタゴニスト(IL-1RA)が見出された。高播種密度時に増殖能の非常に高いイヌ口腔粘膜上皮細胞の培養上清を培養5日目から13日目まで48時間おきに採取し、ラット口腔粘膜上皮細胞

胞の培養系に添加すると、細胞増殖が促進され、促進作用は培養 5~9 日目に回収した上清で高いことが確認された。48 時間毎にサンプリングした培養イヌ口腔粘膜上皮細胞の各種成長因子の遺伝子発現の経時変化を解析することで、培養上清の細胞増殖促進効果が高い培養 5~9 日目に遺伝子発現量の高い 14 種の成長因子をスクリーニングした。それぞれの成長因子の遺伝子組み換えタンパクをラット口腔粘膜上皮細胞培養系に添加したところ、このうち IL-1RA が顕著な細胞増殖効果を示し、IL-1 α は増殖抑制を示すことが見出された。さらに、IL-1RA と IL-1 α 中和抗体はヒト表皮角化細胞の増殖を促すことも見出された。これらの因子を添加培養したヒト表皮角化細胞の定量 RT-PCR により、幹/前駆細胞のマーカーや正常分化マーカーの遺伝子発現が高いことが示された。また、作製したヒト表皮角化細胞シートが幹/前駆細胞マーカーを発現し、細胞増殖マーカーの異常発現をせず、分化マーカーの発現を正常に示すことが免疫組織化学的に確認され、臨床的な有用性が明らかとなった。本章では、これまで一般的であった 3T3 細胞との共培養ではなく重層扁平上皮細胞単独で初代培養をおこなったことにより、IL-1RA と IL-1 α の重層扁平上皮細胞への直接的な作用を見出すことが可能となった。

第 5 章では、血清代替因子としての全トランス型レチノイン酸(ATRA) の有用性を示した。無血清培地で作製されたラット口腔粘膜上皮細胞シートは重層化せず、脆く、全く収縮が起こらないことが巨視的に観察されたため、血清添加による細胞シートの収縮と細胞骨格の挙動に着目して解析がおこなわれた。血清添加条件で培養されたラット口腔粘膜上皮細胞にアクチン重合阻害剤サイトカラシン D を加えた条件と ATP 合成阻害剤アジ化ナトリウムを添加した条件では細胞シートが収縮しないことが観察された。特異的な細胞骨格を阻害するために、低分子量 G タンパク Rho の下流の Rho キナーゼ、ミオシン ATPase, ミオシン軽鎖キナーゼの阻害剤を添加した際や、EGTA により Ca²⁺ を除去した際に、それぞれ収縮が抑制された。以上より、細胞シートの収縮には ATP 依存的なアクトミオシンの組織化が重要であり、さらに Ca²⁺ も必要であることが強く示唆された。作製した細胞シートの網羅的遺伝子発現解析により、血清有無で 10 倍以上発現差のあった遺伝子群に着目した結果、レチノール代謝経路に最も有意な差があった。レチノールは、重層扁平上皮細胞の増殖誘導作用や分化誘導作用について既に報告がある。無血清培地にレチノール誘導体である ATRA を添加したところ、細胞増殖が顕著に促され、さらに、細胞シートの収縮と重層化、組織構造の脆さを回復することが確認された。表皮細胞シートの細胞-細胞間接着分子の免疫染色により、無血清で培養された細胞シートでは、E-カドヘリン、 α 1-カテニン、 β -カテニン、デスモグレイン 1, デスモコリン 3 の組織化が血清添加条件に比べ顕著に低く、ATRA が添加された条件で作製された細胞シートでは、これらの分子は血清添加条件と同様の発現を示した。以上から、血清中の ATRA は何らかの分子機構によ

り細胞間接着分子の組織化を促すことで、細胞シートのしなやかな収縮や構造の堅牢さを促していることが強く示唆されるとともに、血清代替因子として ATRA が有用であることが明らかとなった。

第 6 章では、カルパイン阻害剤による重層扁平上皮細胞の増殖促進作用について明らかにした。第 4 章で IL-1 α による細胞増殖抑制が観察されたことから、IL-1 α の未成熟型から分泌型への成熟に関わるカルパインの阻害による上皮細胞の増殖への影響を調べ、添加有効因子としての可能性を探った。カルパイン阻害剤添加条件では接着細胞数が有意に多く、細胞形態が均一に維持されていることが観察され、細胞増殖が著しく促進されることを見出された。また、この作用はカルパスタチンなどの巨大分子量の阻害因子の添加時には観察されなかった。また、IL-1 α の発現は、培養上清中での存在量だけでなく、細胞内の未成熟型 IL-1 α 、成熟型 IL-1 α 、mRNA 発現量においても抑制されていることが明らかとなった。以上から、カルパイン阻害剤は上皮細胞内において IL-1 α の発現抑制機構を介して細胞増殖を誘発していることが示唆されるとともに、重層扁平上皮細胞の増殖を促す添加因子としての効果が明らかとなった。

第 7 章では、IL-1RA、ATRA を添加した無血清完全合成培地を調製し重層扁平上皮細胞の培養をおこなっている。正常な上皮細胞形態および、血清添加培地と同等の細胞増殖促進効果が確認されたことで、従来に比べ侵襲性が低く常に一定の規格で培養がおこなえる技術が確立された。

第 8 章では、明らかにした知見を総括し、今後の展望について述べている。特に今後の課題として、見出された各新規添加因子のヒト細胞での応答の解析をおこない、より詳細な作用機序の解明をおこなってゆくこと、臨床応用に際しての安全性の確認が重要であることを述べている。

本研究の結果から、複数の上皮細胞培養系有効因子が見出された。基礎生物学的には、重層扁平上皮の増殖・分化制御機構、組織レベルでの細胞骨格の制御機構に関与する成長因子、低分子化合物、血清中因子の作用について新しい知見を得られたと評価できる。研究成果の臨床応用に向けても、細胞シート作製に必要な採取組織量の減少と、組織採取から移植までの時間短縮が期待できる。また、4 章でおこなった比較細胞生物学的アプローチによる細胞成長因子の同定は、今後種々の細胞成長因子の機能検索への新たな研究手法として特筆すべきである。よって本論文は博士（理学）としてふさわしいものであると認める。

2013 年 7 月

(審査員)	主査	早稲田大学教授	理学博士（早稲田大学）	並木秀男
	副査	早稲田大学教授	理学博士（早稲田大学）	中村正久
		早稲田大学教授	理学博士（東京大学）	園池公毅
		東京女子医科大学教授	博士（理学）（東京大学）	大和雅之