

## 論文の内容の要旨

論文題目 軟骨再生医療の細胞源となる弾性（耳介）軟骨細胞に  
おける GFAP の発現と生物学的機能に関する研究

指導教員 高戸 毅 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 19 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 金澤 三四朗

### 目的

顎顔面における先天性形態形成異常や悪性腫瘍切除後の顎顔面欠損に対しては、これまで、自家組織移植による組織修復・再建が行われてきた。近年、自家組織移植の代替として、自家細胞を用いた再生組織移植が脚光を浴び、臨床への導入とその早期普及が期待されている。その中でも軟骨再生医療は比較的臨床応用が進んでいる。自家軟骨細胞を用いた軟骨再生医療はおもに、①患者からの軟骨採取、②軟骨細胞の単離と培養、③培養軟骨細胞の回収あるいは再生軟骨の作製、④患者への移植、の 4 つのプロセスからなる。特に 2 番目の軟骨細胞の単離と培養は、再生医療に特徴的な作業で、再生医療製品の製造の本質的な部分であり、最も厳密な品質管理を求められる工程でもある。

著者が所属する研究室ではこれまでの再生軟骨の品質管理の研究から、グリア線維性酸性タンパク Glial Fibrillar Acid Protein (GFAP) が、軟骨再生医

療の有用な細胞源となる耳介軟骨由来の培養軟骨細胞にも特異的に発現し、継代培養に伴い徐々に遺伝子発現量、タンパク含有量が減少してゆくことを明らかにし、耳介軟骨細胞を用いる軟骨再生医療製品の品質管理に有用であることを示した。

GFAP は、元来、アストロサイトやシュワン細胞などのグリア細胞に特異的に局在するものと認識されている。このような GFAP が耳介軟骨細胞においても発現している生物学的意義は全く検討されていない。また、培養耳介軟骨細胞における GFAP が培養時における細胞の基質産生を示す指標として使用できることの合理性も明らかにされていない。本研究の目的は、GFAP の耳介軟骨細胞における分子生物学的機能を明らかにし、GFAP が培養耳介軟骨細胞における基質産生の指標となることの合理性を検証することにより、軟骨再生医療における再生軟骨の品質管理に有用な情報を提供することである。

## 方法

ヒト耳介由来軟骨細胞の第 3 継代および第 8 継代（以降 P3、P8）、あるいは野生型および GFAP 遺伝子欠損マウス由来耳介軟骨細胞 P3、P8 を用いて、GFAP の細胞内局在の観察、軟骨細胞の増殖・接着・遊走能の評価、メカニカルストレスに対する作用の評価、核形態計測および評価、細胞の多核化の評価、核のエピジェネティック制御に関する評価、を行った。

## 結果

軟骨細胞の増殖能、接着能、遊走能に関しては、ヒトまたはマウスの細胞において、GFAP 発現の増減による明らかな差異はなかった。一方、野生型および GFAP 遺伝子欠損型マウス P3 細胞を用いて機械刺激として伸展刺激を加えた際の反応を評価したところ、刺激後の細胞接着率は野生型に対して GFAP 遺伝子欠損型で著しい低下を認めた。GFAP は細胞の伸展刺激に対する反応に何らかの役割を果たすことが示唆された。

核形態の解析では、ヒト耳介軟骨細胞において P3 細胞に対し、P8 細胞では形状はより扁平化し、野生型および GFAP 遺伝子欠損マウスの細胞でも、GFAP 遺伝子欠損型細胞は核が顕著に扁平化することが明らかとなった。また、これらの現象が GFAP の機能によるものであることを検証するために、P8 の GFAP 遺伝子欠損型細胞に GFAP 遺伝子を発現するアデノウイルスベクターを導入し、核形態の変化を組織学的および形態計測的に確認した。導入された細胞は、P8 の GFAP 遺伝子欠損型細胞と比較して核は小さく、球状を呈していた。形態計測的に核の直径と高さを評価したところ、明らかな形態の変化が認められた。この結果から、GFAP が核形態の維持に重要な役割を果たすことが確認された。

さらに、細胞の多核化を評価したところ、P3において、GFAP 遺伝子欠損型細胞は多核化した細胞数が増加している傾向があったが、P8 ではさらに顕著で、GFAP 遺伝子欠損型細胞は明らかな多核細胞の増加が認められた。この結果から、GFAP が継代培養における正確な細胞分裂に重要な役割を果たすことが示唆された。

最後に、GFAP の発現減少に伴う核形態変化が、核にどのような質的影響をもたらすかということを検索するため、H3K9me3 および H3K4me3 を用いてヒストン修飾、特にメチル化状態を蛍光免疫染色により検索した。メチル化 H3K4 は、P3 細胞の野生型細胞では瀰漫性に局在するに対し、GFAP 遺伝子欠損型では局在が減少し、局所に集簇する傾向を示した。特に、メチル化 H3K9 は野生型細胞とは異なり GFAP 遺伝子欠損型では核内に斑状に集積することが明らかとなり、GFAP 欠損型細胞の扁平化した核では概して転写が低調であることが示唆された。これらの結果から、GFAP の遺伝子欠損による核形態変化が核のエピジェネティックな変化を惹起することが示唆された。

## 考察

中間径線維は、細胞の基本形状、すなわち動的な変化の少ない基本構造の構築を担っている。曲げ応力の負荷の大きい耳介軟骨由来の軟骨細胞においても中間径線維が細胞の基本構造の維持に重要な役割を果たしているものと予想された。本研究においては、細胞の移動、接着など、動的な細胞形態の変化が大きく関わってくる細胞接着、細胞遊走などでは、GFAP 発現の増減による表現型変化は観察しにくく、むしろ、細胞の動的変化よりも、細胞の基本構造に関する表現型である核の形態、核数、あるいは、細胞基本構造に対する力学刺激への反応性などに、表現型の変化が観察された。

GFAP が減弱した軟骨細胞あるいは欠失した細胞における核扁平化は、細胞内における GFAP 量の減少が核周囲の細胞骨格の構造に影響を及ぼすことによって生じる変化と推察される。GFAP が耳介軟骨細胞の細胞内において、核周囲に密に局在する所見からも、核の形態や構造に深く関与していることが示唆される。継代培養に伴う GFAP 量の減少は、細胞が平面培養ではきわめて人工的な環境におかれ、さらに継代培養では長期にわたりそのような非生理的環境に暴露されることに起因すると考えられる。非生理的環境への暴露によるストレス、たとえば平面培養における過剰増殖刺激は、p16 (INK4a) などの老化シグナルを増強させる可能性があると思われる。p16 (INK4a) は c-jun の活性化を抑制し、AP-1 における転写活性を阻害することが知られている。AP-1 は主要な GFAP の転写制御装置であるため、継代培養に伴う細胞老化シグナルを介して GFAP の転写が抑制され、最終的には核形態や構造に変化が生じるのかもしれない。GFAP の欠失

により生じた表現型のひとつに細胞の多核化があった。GFAP 遺伝子欠損細胞における多核化細胞の増加も、GFAP の核形態の維持の障害の一所見と捉えることができるのかもしれない。

耳介軟骨細胞の GFAP 量と基質産生能とが関連機序については確証的な所見は得られていないが、本研究における核形態変化とエピジェネティック制御に関する所見は相関のメカニズムを示唆するものと思われる。本研究の所見では、**GFAP** の欠失に伴い、ヒストンタンパク **H3K4** ならびに **H3K9** のメチル化状態が変化し、ヘテロクロマチンが増加し転写活性が概して低調になり、核の扁平化に加えて、核機能の質的な変化も生じていることが示唆された。それによりヒストンによる遺伝子転写調節機構が変化し、基質産生に関わる遺伝子の転写活性が制御され、細胞の基質産生能が低下すると推察された。

以上のことから、培養耳介軟骨細胞において GFAP は、細胞の生存や機能発現に必須な核の形態や機能の保持に重要な役割を担っていることが明らかとなった。現在、著者が所属する研究室では、GFAP を培養耳介軟骨細胞の品質管理の指標として使用している。すなわち、培養上清に含まれる GFAP タンパク含有量を計測し、移植する細胞の基質産生能を移植前に評価する指標として使用している。この指標の増減は、軟骨細胞単離時の細胞純度や継代培養の継代数などに依存することが知られている。上述のごとく、GFAP は耳介軟骨細胞に特異的に発現し、機械的な応力への抵抗性を確保する機能を担うため、周囲の軟骨膜由来の線維芽細胞などの混入によって GFAP 量に変化が生じることは容易に納得できる。また、継代数の増加によって GFAP 量減少や核形態の変化が起こり、相関して継代数の増加により軟骨細胞の基質産生能も減少するため、細胞の基質産生能の評価指標として使用可能であることは十分に理解できる。したがって、GFAP を培養耳介軟骨細胞における基質産生能の指標として用いることは合理的であり、このような科学的な根拠を有する評価指標を用いて、品質管理を行うことは、安全で確実な再生軟骨を患者に提供する上で有意義なことと考えられた。