

審査結果の要旨

氏名 金澤 三四朗

目的

私が所属する研究室では現在、形や硬さのあるインプラント型再生軟骨の臨床応用に向けた研究を行っている。この再生軟骨の作製方法は、患者からの軟骨採取、軟骨細胞の単離と培養、培養軟骨細胞の回収と足場素材への投与、患者への移植、の4つの過程からなる。このうち、軟骨細胞の単離と培養は、品質管理上重要で、もし、少数の軟骨細胞が過増殖し、基質産生の低下、いわゆる脱分化が進行したり、単離において、線維芽細胞などの異物細胞が混入すると、再生軟骨の不良や変形を来し、患者への健康被害につながる。しかし、培養軟骨細胞の特性を適切に評価する方法は未確立であるため培養軟骨細胞の過増殖に伴い著しく変化し、かつ、軟骨細胞に特異的に発現しているマーカーを確立する必要がある。そこで、われわれのグループでは培養軟骨細胞の品質管理指標の選定を行った。耳介軟骨細胞において、再生医療の最適増殖数である1000倍増相当の第3継代、P3および過増殖した1億倍増相当の第8継代、P8の網羅的な遺伝子解析を行い、P3で高発現する遺伝子としてグリア線維性酸性蛋白質（GFAP）に着眼した。各種培養細胞でGFAPの発現を検索したところ、GFAPは耳介軟骨細胞とアストロサイトで発現していたのに対し、それ以外の、線維芽細胞などを含めほとんどの細胞で発現が見られなかった。そのため、GFAPは培養耳介軟骨細胞の品質管理指標となると思われた。

従来GFAPは、アストロサイトやシュワン細胞など、グリア系細胞の細胞骨格である中間径線維として知られており、機能としては、脳や神経の損傷で発現が増加し、神経修復に役割を果たすと考えられている。しかし、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おらず、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。従って、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及び役割を明らかにし、GFAPが培養耳介軟骨細胞における品質管理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

研究項目の1番目として、培養耳介軟骨細胞におけるGFAPの発現・局在を評価するとともに、2番目に主な細胞学的評価法として、GFAP発現変化に伴う細胞増殖・接着・遊走の検討を行った。3番目として生体内の耳介軟骨にかかる力学ストレスとして、伸展刺激への反応を検討した。4番目として、代表的な細胞内形態変化である核形態の検討を、5番目として、多核細胞数の検討を行った。最後に核の質的变化としてエピジェネティックスの検

討を行った。

実験方法は、ヒト由来耳介軟骨、あるいは野生型または GFAP 遺伝子欠損型のマウス由来耳介軟骨より、軟骨細胞を単離し培養・継代を行った。解析では主に、再生医療における最適増殖数である 1000 倍増に相当する第 3 継代、P3、および過増殖により基質産生能が著減する 1 億倍相当の第 8 継代、P8 を比較検討した。また、mRNA の評価に関しては、realtime RT-PCR を用いて定量した。蛋白質発現に関しては、western-blotting、ELISA および免疫蛍光染色を行った。また、細胞の核型解析に関しては Flow cytometry (PI 染色) で核の倍数体の検出を行った。遺伝子導入による遺伝子強制発現に関しては、アデノウイルスを用いて GFAP 遺伝子を培養耳介軟骨細胞に導入した。細胞学的解析に関して、細胞接着性の検討のためにコラーゲンコートした培養ディッシュ上に細胞を播種し、経時的に接着細胞数の評価を行った。遊走性の検討のために、wound healing assay を行った。具体的にはピペットチップを用いてディッシュ底面の接着細胞を線状に剥離し、剥離面への細胞遊走を経時的に観察した。伸展刺激に対する反応性を検討するために、シリコンチャンバー上に細胞を播種し、手動式にチャンバーを 30% 伸展し、刺激後の接着細胞数を計測した。

結果

研究項目の 1 番目として、耳介軟骨細胞における GFAP の発現・局在を検討した。ヒトおよびマウス耳介軟骨細胞 P3、P8 における GFAP の蛋白質局在を免疫蛍光染色法で検索した。いずれも、P3 細胞において細胞質に GFAP の免疫局在が観察された一方、P8 細胞において GFAP の染色性は減弱傾向を示した。

次に、主な細胞学的評価法として、GFAP 発現変化に伴う細胞増殖・接着・遊走を検討した。まず、野生型と GFAP 遺伝子欠損型マウス耳介軟骨細胞における細胞増殖能を検索した。野生型、GFAP 遺伝子欠損型、いずれにおいても P8 までは増殖能が維持され、差は認められなかった。次いで、細胞接着を比較したところ、野生型細胞と GFAP 遺伝子欠損型細胞で接着能に有意な差は認められなかった。また、細胞の遊走への影響を評価するために、ヒト耳介軟骨細胞 (P3、P8) において wound-healing assay を行ったが、継代培養が進み細胞が過増殖しても遊走性への影響は見られなかった。

一方、生体の耳介軟骨には頻回の曲げ応力がかかるため、細胞には伸展刺激がかかると予想される。研究項目の 3 番目として、GFAP 発現と伸展刺激に対する反応との関連性を検討した。ヒト耳介軟骨細胞 P3 および P8 を用いて、細胞に 30% の伸展刺激を加え、刺激前と刺激後の細胞接着の変化を評価した。その結果、P3 細胞は 4 割程度の細胞が剥離し、6 割が接着したままであったのに対し、P8 細胞の接着は 5 割にとどまった。両群に有意な差は見られなかったものの、P8 細胞では若干の減少傾向が認められた。

さらに、野生型および GFAP 遺伝子欠損型細胞を用いて、同様に検討した。野生型における GFAP 発現が著しい P3 細胞においては、刺激後の細胞接着率はほぼ 100% であったのに対し、GFAP 遺伝子欠損型では 40% 程度に低下し、野生型に対して接着能の著しい低下を認めた。

しかし、野生型においても GFAP 発現が低下する P8 細胞においては、その差は減弱していた。これらの結果から、GFAP は伸展刺激に対する抵抗性の獲得に役割を果たすことが示唆された。

研究項目の 4 番目として、代表的な細胞内形態変化である核形態の検討を行った。P3 細胞に比べ P8 細胞で、核の直径が増大し、高さが減少したことから、細胞の過増殖に伴って、核が扁平化することが示唆された。さらに、野生型および GFAP 遺伝子欠損型の P3 および P8 細胞を用いて核形態を解析した。野生型にくらべ GFAP 遺伝子欠損で核の扁平化が著明に観察された。この所見を定量化すると、P3 細胞では GFAP の欠損により核が有意に扁平化し、P8 でも GFAP 欠損により有意なサイズの増加が見られた。

GFAP が核形態の維持に重要な働きをしていることを検証するため、P8 の遺伝子欠損型細胞に GFAP 遺伝子を導入し、核形態の変化を確認した。遺伝子導入細胞では野生型細胞と同様に GFAP の細胞内局在がみられ、ウェスタンブロッティングでもタンパクの発現が確認された。このような導入細胞では、P8 の GFAP 遺伝子欠損型細胞と比較して核の直径は小さく、高さが増大し球状を呈していた。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。

GFAP は細胞内、特に核周囲に局在しており、また、分裂期においてリン酸化されるといふ知見を考慮すると、GFAP が核形態のみならず、核や細胞の分裂にも関与している可能性がある。研究項目の 5 番目としては、野生型および GFAP 遺伝子欠損型細胞の多核化細胞数を検索した。P3 において、GFAP 遺伝子欠損細胞は野生型に対して、多核化した細胞数が増加している傾向を認めたが、有意な差は認められなかった。一方、P8 において 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。この結果についても、アデノウイルスを遺伝子欠損型細胞に導入したところ、多核化は顕著に抑制された。

また、PI 染色した細胞をフローサイトメーターで評価し、核の倍数体を定量したところ、P8 の GFAP 遺伝子欠損型細胞では、P2 分画で示される 2 倍体の割合が増加し、形態学的評価と同様な所見となった。これらの結果から、GFAP 欠損により多核化が増加することが示唆された。

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、ヒストンのエピジェネティクス制御すなわち、メチル化状態を免疫蛍光染色法により検索した。メチル化 H3K4 はおもに転写活性が維持されているユークロマチンに、メチル化 H3K9 は反対に転写活性が低いヘテロクロマチンに局在することが知られている。メチル化 H3K4 は、野生型、GFAP 遺伝子欠損型では瀰漫性に局在するのに対し、メチル化 H3K9 は野生型とは異なり 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になった。またウェスタンブロッティングによる解析でも、H3K9 では GFAP 欠損型でメチル化蛋白質の増加を認めた。

考察

これまでの結果をまとめると、GFAP の減少や欠失により、伸展刺激に対する抵抗性が減弱することが示唆された。また、核形態の異常、すなわち核の扁平化や多核化を引き起こすことが示唆された。さらに、核の質的变化に関しては、H3K9 のメチル化が増強し、転写活性の低下が推察された。

以上の結果から、耳介軟骨細胞における GFAP の生物学的意義を考察すると、培養耳介軟骨細胞における GFAP は核形態などの細胞基本構造を保持するとともに、伸展ストレスから細胞を保護する役割を担うことが示唆された。一方、生体内の耳介軟骨には断続的に曲げ応力が加わるため、耳介軟骨細胞には伸展ストレスに対して抵抗性が必要である。従って、耳介軟骨細胞の GFAP は、生体内において細胞生存の維持に不可欠な細胞骨格となっていることが推察される。

GFAP 発現減少の機序に関しては、細胞老化に関連があると推測する。細胞が平面培養という非生理的環境に長期にわたり暴露されると、細胞老化シグナル p16 (INK4a) などが活性化される可能性がある。p16 (INK4a) は c-jun の活性を抑制し、AP-1 における転写活性を阻害することが知られているが、GFAP 転写も AP-1 により制御されているため、p16 が GFAP の発現抑制に関連している可能性があり、現在、検討を進めている。

品質管理指標としての必要要件と GFAP の生物学的機能を整理すると、必要要件である単離における異種細胞の混入を検出できることに対しては、GFAP が耳介軟骨細胞において特異的な機能を果たしていることが本研究で明らかとなり、線維芽細胞などの他の細胞には発現が見られないことともあいまって、生物学的な裏付けがなされた。また、少量の軟骨細胞の過増殖を検出できることに関しては、継代培養に伴う GFAP 発現の減少が、核形態の変化や生存性の低下、エピジェネティックな変化を惹起し、軟骨基質産生を特徴とするような、いわゆる脱分化に関連しているという本研究の所見と合致しており、生物学的に合理的であることが明らかとなった。

結論

耳介軟骨細胞に発現する GFAP は、核形態の維持や伸展ストレスに対する抵抗性を担い、耳介軟骨細胞の生理的機能に重要な役割を果たしていると思われるため、GFAP を培養耳介軟骨細胞の品質管理指標として用いることは合理的であると考えられ、本論文は学位授与に値するものと考えられる。