

学 位 論 文 題 名

生合成基底膜基質を用いた気道上皮基底細胞から
線毛細胞への分化と in vitro における気道上皮組織の構築

学位論文内容の要旨

【背景】気道上皮の役割や機能を解明する目的で, in vitro の気道上皮細胞培養系が開発されてきた。一般的には, 初代細胞を用いて, それに気相培養, レチノイン酸を含んだ合成培地, I 型コラーゲンゲル基質などの工夫をすることによって気道上皮組織を構築する。しかし, 初代細胞は線毛細胞や分泌細胞などの分化した細胞と基底細胞のように未分化な細胞の混合物であるために, 細胞の分化過程を追う実験系には適さない。しかも, 得られる細胞数が少ない。一方, 初代細胞を継代し, 比較的均一化された細胞集団 (継代後細胞) を用いると, 従来の I 型コラーゲンゲル上では, 細胞は未分化のまままで分化しないという欠点がある。in vivo で上皮細胞は基底膜に接している。基底膜はラミニン, IV 型コラーゲンなどの細胞外基質を含む特殊な平面状の薄膜様構造物であり, 足場として上皮細胞を支えているだけでなく, その分化, 形態保持, 接着, 生存に関与している。また, 様々な成長因子などの貯蔵庫としての機能も担っている。Mochitate らは, 不死化ラット II 型肺胞上皮細胞を, 基底膜構成成分を豊富に含むマトリゲル® (Becton Dickinson) 共存下で培養することにより, その直下に基底膜構造体を合成することに世界で初めて成功した。直下の基底膜を損なうことなく細胞だけを剥がすと, 基底膜構造体のみが得られる。Mochitate らは, これを生合成基底膜 synthesized Basement Membrane (以下 sBM と略す) 基質と名付けた。

【目的】生合成された基底膜構造体である sBM 基質を用いて新しい気道上皮細胞培養法を確立する。

【材料と方法】8~14 週齢の雄 SD ラットから, 1% プロナーゼ E 溶液を用いて気管上皮細胞を採取し, そのまま播種する初代細胞と, 2 回継代したのち播種する継代後細胞の 2 種類を用意した。培地は DMEM/ハム F12 に 10 µg/ml インスリン, 0.1 µg/ml ハイドロコチゾン, 0.1 µg/ml コレラ毒素, 5 µg/ml トランスフェリン, 50 µM ホスホエタノールアミン, 80 µM エタノールアミン, 25 ng/ml 上皮成長因子 (EGF), 30 µg/ml ウシ下垂体抽出物 (BPE), 0.5 mg/ml ウシ血清アルブミンを添加したものとし, 使用直前に 50 nM レチノイン酸を加えた。基質として, I 型コラーゲンゲル, sBM, I 型コラーゲンコーティング, ラミニン-1 コーティング, 線維性 I 型コラーゲンの 5 種類を用意した。初代細胞を, I 型コラーゲンゲルに, 継代後細胞を 5 種類全ての基質へ播種 (2.0×10^5 cells/cm²) し, 全面に生育・伸展したことを確認の後, 気相培養を 14 日間行った。気相培養開始 0, 7, 14 日目に培養組織を固定し, 免疫組織化学染色や電子顕微鏡を用いて形態学的検討を行った。同時に核染色写真から細胞密度を, 走査電子顕微鏡写真から線毛細胞の出現率を, 計測し比較検討を行った。

【結果】(1) 電顕所見から, 気相培養 14 日後の時点で, 初代細胞を I 型コラーゲンゲル上に播種した培養組織では線毛細胞が認められたが, 継代後細胞を同基質に播種したときは, 認められなかった。この継代後細胞を, sBM 基質上に播種したところ, 線毛細胞が認められた。同時点で, sBM 基質上では,

培養組織は偽重層構造を示したが、I型コラーゲンゲル上では扁平のままであった。(2)細胞密度と線毛細胞出現率について定量的解析を行った。同じ継代後細胞を播種しても、7、14日目の時点で、sBM基質上での細胞密度は、I型コラーゲンゲル上でのそれよりも有意に高値であった。同様に、線毛細胞出現率についても、14日目の時点で、sBM基質上で、I型コラーゲンゲル上よりも有意に高値であった。(3)sBM基質上では時間経過と共に、基底細胞のマーカであるCK14陽性細胞の数が減少し、培養組織の基底側に局在するようになった。それに対して、I型コラーゲンゲル上では、CK14陽性細胞が常に優勢に散在していた。継代後細胞をsBM基質上に播種した培養では、抗 β チューブリンIV抗体陽性線毛細胞を認めたが、I型コラーゲンゲル上では認められなかった。CCSP陽性クララ細胞やMUC5AC陽性粘液分泌細胞は、どちらの基質上でも同等に認められた。(4)その他の基質としてI型コラーゲンコーティング、ラミニン-1コーティング、線維性I型コラーゲン上での継代後細胞の分化を検討したが、いずれの基質上でも線毛細胞の出現は明らかではなかった。

【考察】初代細胞を用いた気道上皮の分化経過を追跡する手法には限界があり、それを克服するために継代後細胞を用いた。しかし、この細胞は従来用いられてきた基質であるI型コラーゲンゲル上では、分化能を示さなかった。また、I型コラーゲンコーティング、ラミニン-1コーティング、線維性I型コラーゲン上での培養でも細胞分化は起こらなかったが、sBM基質を用いた場合にのみ、線毛細胞への分化を認めた。sBM基質が分化を誘導する分子生物学的機序については不明である。おそらく、ラミニンを始めとする基底膜を構成する蛋白同士の相互作用や、基底膜に含有される成長因子などの影響が推測される。CK14陽性基底細胞が時間経過とともに基底側に局在していくという今回の実験結果は、Hongらによって報告されたナフタレンによる*in vivo*気道上皮障害モデルでみられた修復過程と類似している。従って、sBM基質上における基底細胞の分化は、基底膜が温存されている*in vivo*の気道上皮傷害修復過程を再現しているものと考えられた。基底膜の重要性を考慮した培養系に関して、Gotoらは、ヒト羊膜を基底膜の代用品として使用する方法を報告している。しかし、ヒト羊膜はいつでも入手可能なものではなく、輸送の問題、医学的安全性、倫理的問題などから、容易に使用できるものではない。一方、今回使用したsBM基質は比較的容易に作製可能であり、1年程度の凍結保存と凍結輸送もできる。このような取り扱いの容易さから、今後の気道上皮細胞*in vitro*培養への発展的応用が期待できる。

【結論】生合成された基底膜構造体であるsBM基質を用いた新しい気道上皮培養系を確立した。この系を用いることにより細胞外基質、特に基底膜が気道上皮の機能に与える影響をさらに解明することができる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 渡 邊 雅 彦

副 査 教 授 清 水 宏

副 査 教 授 西 村 正 治

学位論文題名

生合成基底膜基質を用いた気道上皮基底細胞から 線毛細胞への分化と in vitro における気道上皮組織の構築

気道上皮の機能を解明する目的で、様々な in vitro の気道上皮細胞培養系が、これまでも開発されてきた。それらの多くは、初代細胞を用い、気相培養、レチノイン酸を含んだ合成培地、I型コラーゲンゲル基質などを利用して気道上皮組織を構築させている。しかし、この従来法には問題点があった。第一に、初代細胞は線毛細胞や分泌細胞などの分化した細胞と基底細胞のように未分化な細胞の混合物であるために、細胞の分化過程を追う実験系には適さない点および得られる細胞数が少ない点である。第二に、in vivo では上皮細胞はI型コラーゲンではなく基底膜に接している点である。基底膜はラミニン、IV型コラーゲンなどの細胞外基質を含む薄膜様構造物であり、足場として上皮細胞を支えているだけでなく、その分化、接着、生存に関与し、成長因子などの貯蔵庫としての機能も担っている。Mochitateらは、不死化ラットII型肺胞上皮細胞を、基底膜構成成分を豊富に含むマトリゲル共存下で培養することにより、その直下に基底膜構造体を合成することに世界で初めて成功した。細胞だけを剥がすと、基底膜構造体のみが得られる。Mochitateらは、これを生合成基底膜 synthesized Basement Membrane (以下 sBM) 基質と名付けた。そこで今回の研究では、初代細胞の代わりにそれらを継代し比較的均一化させた細胞集団(継代後細胞)とI型コラーゲンの代わりに sBM 基質を用いた気道上皮細胞培養法を確立し従来法との比較検討を行うことを目的とした。SD ラットから気管上皮細胞を採取し初代細胞と継代後細胞の2種類を用意した。基質として、I型コラーゲンゲル、ラミニン-1、sBM 基質などを用意した。細胞を各基質へ播種し、全面に生育・伸展したことを確認の後、気相培養を行った。気相培養開始0, 7, 14日目に培養組織を固定し、免疫染色や電子顕微鏡を用いて検討を行った。結果は、(1)初代細胞はI型コラーゲンゲル上で線毛細胞への分化を示したが、継代後細胞は同基質上では分化しなかった。しかし同じ細胞を sBM 基質上で培養したところ線毛細胞への分化を認めた。(2)I型コラーゲンゲル上では、基底細胞からの分化は認められなかったが、sBM 基質上では分化が認められ、上皮組織としての極性も認

められた。(3) sBM 基質以外の基質としてラミニン-1 や I 型コラーゲン上での継代後細胞の分化を検討したが、いずれの基質上でも線毛細胞への分化は認められなかった。以上の結果より、sBM 基質上では基底細胞の線毛細胞への分化が誘導され、従来法である I 型コラーゲン上での培養よりも優れていることが明らかとなった。

sBM 基質が分化を誘導する分子生物学的機序については今回の検討の範囲内では不明であったが、これまでの文献報告を参考にすると、ラミニン 1 以外の基底膜構成分子の関与 (sBM 基質作製過程において取り込まれると考えられるラミニン 10/11 など) や、基底膜に含有される成長因子、サイトカインの関与 (マトリゲルから取り込まれる FGF など) が推測された。また、基底膜を利用した気道上皮培養系としては、ヒト羊膜を基質とした系の報告があるが、それと比較して今回使用した sBM 基質は、比較的容易に作製、保存、入手可能であることや、医学的安全性や倫理的な問題がないなどの特長をもつ。このような取り扱いの容易さからも sBM 基質は、今後の *in vitro* での気道上皮細胞培養への発展的応用が期待できるものと考えられた。本研究において、従来用いられてきた I 型コラーゲンなどよりも優れた分化誘導能を示した sBM 基質を用いることにより、新しい気道上皮培養系を確立することができた。

審査にあたり、副査清水教授から 1) 基底細胞の免疫染色について、2) sBM 基質で分化する理由として 17 型コラーゲンや 7 型コラーゲンの関与について、3) ヒト由来の sBM 基質作製の可能性についての質問があった。次いで主査渡邊教授から 1) sBM 基質の今後の利用および発展性について、2) 細胞分化の評価法についての質問があった。次いで副査西村教授から 1) sBM 基質が分化を誘導するメカニズムについて、2) それを解明するための研究手法についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自験データや文献を引用して概ね適切に解答した。

この論文は、初めて生合成基底膜を用いて従来法との差を証明し、基底膜の重要性を証明した点で高く評価され、今後の *in vitro* での気道上皮細胞培養への発展的応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。