

2019年度長期海外研修終了報告書

歯学部口腔生物再生医工学講座生化学分野
坂東健二郎

研修先：米国タフツ大学
研修期間：2020年2月7日～2021年2月6日



タフツ大学ボストンキャンパスにある歯学部のビル

【研究開始当初の背景】

タフツ大学の Garlick 教授の研究室では、ヒト皮膚様組織の 3D 培養により、創傷治癒や強皮症の病態メカニズムの解明やヒト皮膚様組織の再生医療への応用について研究を行っており、私は研修期間の 3 ヶ月で iPS 細胞の培養や 3D 培養の技術を身に付けて帰国する予定であった。当時、Garlick 教授の研究室では筋線維芽細胞とマクロファージの相互作用に注目しており、ラボミーティングに参加した際に、マクロファージが分泌するケモカインの筋線維芽細胞への影響について研究する事を提案したところ、Garlick 教授から「君のアイデアは君自身が実践すべきだ」と言われ、タフツ大学で研究を続ける事になった。

皮膚の創傷治癒過程で、線維芽細胞は α -平滑筋アクチンを発現する強い収縮能をもつ筋線維芽細胞へと分化する事が知られている。分化した筋線維芽細胞は多量のコラーゲンを合成し、肉芽組織を収縮させ、傷口を小さくする働きをする。一方で、反応が過剰におこることで、癬痕やケロイドなど皮膚創傷治癒異常などの発症につながる。特に顎顔面領域の癬痕は患者の QOL を実現する上での障害になりえるので、発症メカニズムの解明は急務である。私はまず、マクロファージ由来のケモカインによる線維芽細胞への影響について研究を開始した。マクロファージとヒト皮膚様組織の共培養系の確立を試みたが、あまりうまくいかなかった。そこで、これまでに研究がほとんど行われていない、線維芽細胞が発現するケモカインの筋線維芽細胞への影響を研究するに至った。

ケモカインは G タンパク質共役受容体を介して作用を発揮する一連のサイトカインで、ゲノム解析により 50 種類以上が同定されている。もともと、炎症時に分泌され、白血球の遊走を引き起こす作用が報告されていたが、血漿中に恒常的に存在するケモカインも多い。近年では炎症作用以外の作用が研究されてきており、私自身も骨芽細胞、マクロファージ、脂肪細胞、ケラチノサイトへのケモカインの作用について研究してきている。これらの研究のノウハウを今回の研究に活用できると考えた。

【研究の目的】

創傷治癒の過程において、抗炎症性サイトカインである Transforming growth factor (TGF)- β 1 が線維芽細胞に作用すると筋線維芽細胞に分化する事が知られている。筋線維芽細胞は、しばしば過剰に働いて、皮膚創傷治癒異常や強皮症などを引き起こす。また、筋線維芽細胞は Tumor Necrosis Factor (TNF)- α や Interleukine (IL)-6 などの炎症性サイトカインを分泌するなど、細胞周囲で複雑なサイトカインネットワークを形成しており、筋線維芽細胞の分化がどのようにコントロールされているか定かではない。本研究により、筋線維芽細胞に作用するケモカインを同定し、その作用を解析する事で、創傷治癒異常の病態メカニズムを明らかにし、再生医療をはじめとする治療法の開発につなげる事を目的としている。

【研究の方法】

1. 細胞培養

ヒト線維芽細胞株 NFF12 細胞およびヒトケラチノサイト株 NHK 細胞はタフツ大学の Garlick 教授の研究室でヒトの足底の皮膚より樹立された。NFF12 細胞はアスコルビン酸含有培地で 37°C、7.5% CO₂ の環境で維持された。さらに、培地に 2.5 ng/mL TGF- β 1 を添加し、8 日間培養することにより筋線維芽細胞に分化させた。

2. 3D ヒト皮膚様組織培養

24-well 細胞培養プレートに Millicell Hanging Cell Culture Insert PET 0.4 μ m (Sigma Aldrich 社) をセットし、Polyethylene Terephthalate (PET) 膜上に NFF12 細胞を 7 万個播種し、アスコルビン酸含有培地で 3 週間培養した。PET 膜状に形成された線維芽細胞層の上に NHK 細胞を 17.5 万個播種し、角化培地で 8 日間培養した (図 1)。

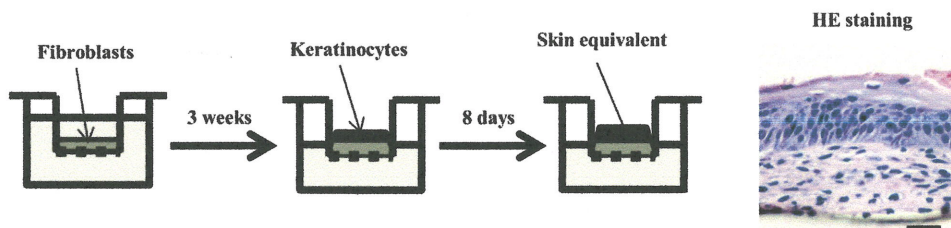


図 1・3D ヒト皮膚様組織培養の手順と HE 染色像

(スケールバーは 50 μ m)

3. RNA 干渉法

IDT 社で設計と合成をした siRNA (small interfering RNA) を Oligofectamine 試薬 (Thermo Fisher Scientific 社) で細胞に導入し、24 時間後に培養実験に用いた。

4. 定量的リアルタイム PCR (qPCR) 法

様々な処理を行った細胞から TRI 試薬 (Molecular Research Center 社) を用いて total RNA を抽出し、oligo dT プライマーを用いて cDNA に逆転写した。20000 倍希釈した SYBR Green I (Thermo Fisher Scientific 社) を加えて PCR 反応を行い、反応中の蛍光を CFX-96 (Bio-Rad 社) で読み取り、発現していた mRNA の量を解析した。

5. ウェスタンブロット法

実験に用いた細胞や組織を Lysis Buffer で溶解し、6%または 10%ポリアクリルアミドゲルで Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)を行った。泳動後、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜にトランスファーし、5%スキムミルク Tris Buffered Saline with Tween 20 (TBST) でブロッキングを行った。1次抗体と反応させた後、ペルオキシダーゼ (POD) 標識 2次抗体と反応させた。その後、ルミノール試薬で化学発光させ、Chemi Doc XRS Plus (Bio-Rad 社) でデジタル撮影した。

【研究の結果】

1. 筋線維芽細胞分化に影響を与えるケモカインの解析

線維芽細胞から筋線維芽細胞に分化する過程で発現が促進されるケモカインを検索するため、ヒト足底皮膚線維芽細胞株 NFF12 細胞を 2.5 ng/mL の TGF- β 1 を添加した培地で 8 日間培養し、筋線維芽細胞に分化させ、ケモカインの遺伝子発現を qPCR 法で網羅的に解析した。すると、*CC Chemokine Ligand (CCL)20*、*CXC Chemokine Ligand (CXCL)5*、*CXCL8* の mRNA の発現が未分化線維細胞 (0d) に比べ筋線維芽細胞 (8d) で 4 倍以上高くなっていった。筋線維芽細胞分化に伴って発現が上昇する 3 つのケモカインのうち、*CXCL5* と *CXCL8* についてはすでに筋線維芽細胞分化に促進的に働く事が報告されているので、今回は *CCL20* に注目し、解析を進めた。

次に培養上清中の *CCL20* タンパク質の濃度を Enzyme linked immune sorbent assay (ELISA) 法で測定したところ、未分化線維芽細胞 (0d) に比べ筋線維芽細胞 (8d) の *CCL20* 濃度は 2 倍以上高かった (図 3)。線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化が進むにしたがって、*CCL20* の mRNA とタンパク質の発現は高くなっていくことから、筋線維芽細胞分化に何らかの影響を与えていると考えられる。

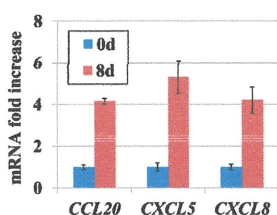


図 2・筋線維芽細胞分化によるケモカインの発現変化

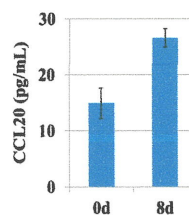


図 3・筋線維芽細胞分化による CCL20 タンパク質の発現変化

2. CCL20 の筋線維芽細胞分化への影響

筋線維芽細胞分化の過程で発現が促進されるケモカインのうち、*CXCL5* と *CXCL8* については前立腺線維芽細胞で筋線維芽細胞の分化を促進する事が報告されている。そこで、今回、*CCL20* に同様な効果があるか検討した。NFF12 細胞を 10 ng/mL の *CCL20* で刺激し、3 時間後の RNA を回収して、遺伝子発現の解析を行った。すると、*Collagen type 1 A2 (COL1A2)* の発現が *CCL20* 刺激 3 時間後に一過性に上昇したが、*Actin α 2 (ACTA2)* の発現に変化は認められなかった。また、筋線維芽細胞分化に従って促進される *CCL20*、*CXCL5*、*CXCL8* の発現は *CCL20* により有意に増加した (図 4)。

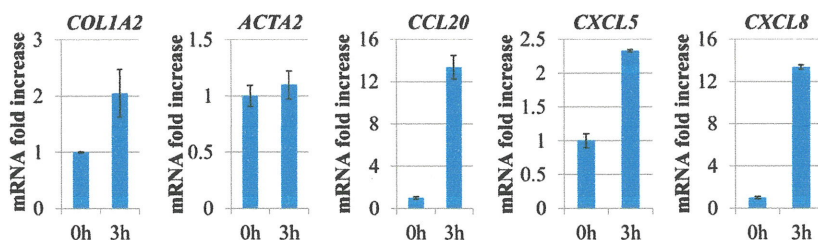


図 4・線維芽細胞における CCL20 による遺伝子発現への影響

これらの結果から、*CCL20* は直接、I 型コラーゲンの発現を促進するものの、筋線維芽細胞に特異的に見られる α -平滑筋アクチンの発現にはほとんど影響を与えない事が明らかになった。

3. CCL20 遺伝子ノックダウンによる筋線維芽細胞分化への影響

筋線維芽細胞分化における *CCL20* の影響を検討するため、NFF12 細胞に *CCL20* siRNA をトランスフェクションしたのち、8 日間 TGF- β 1 で刺激した細胞としていない細胞の遺伝子発現を解析した。*CCL20* の mRNA とタンパク質の発現は *CCL20* をノックダウンした細胞で有意に抑制された事から、*CCL20* siRNA はトランスフェクションから 8 日後も作用することが確認できた。筋線維芽細胞分化により *COL1A2* の発現は促進されるが、*CCL20* をノックダウンした細胞では有意に抑制された。しかし、*ACTA2* の発現は *CCL20* siRNA をトランスフェクションした細胞と

スクランブル siRNA をトランスフェクションした細胞で有意な差は認められなかった (図 5)。

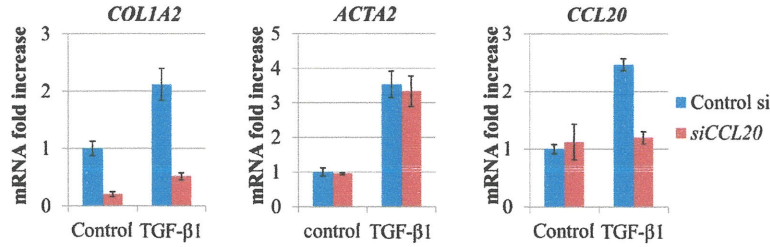


図 5・CCL20 のノックダウンによる筋線維芽細胞分化への影響

次にウエスタンブロット法で I 型コラーゲンと α -平滑筋アクチンの発現を確認したところ、8 日間の培養で I 型プロコラーゲンよりも I 型トロポコラーゲンが多く検出された。そして、未分化線維芽細胞において CCL20 siRNA により I 型トロポコラーゲンが抑制されていた。さらに、筋線維芽細胞においても I 型プロコラーゲンと I 型トロポコラーゲンの発現量が CCL20 siRNA により抑制されていた。しかし、 α -平滑筋アクチンの発現量は CCL20 siRNA をトランスフェクションした細胞とスクランブル siRNA をトランスフェクションした細胞で有意な差は認められなかった (図 6)。

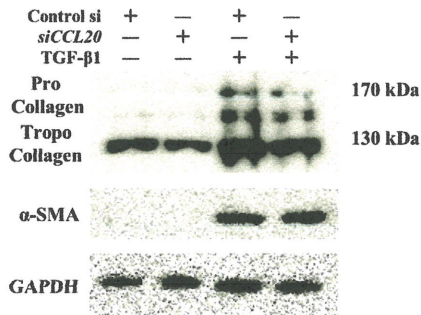


図 6・CCL20 のノックダウンによる I 型コラーゲンと α -平滑筋アクチン発現への影響

これらの結果は CCL20 が TGF-β1 依存性の I 型コラーゲン合成だけでなく、TGF-β1 非依存性の I 型コラーゲンのメンテナンスにも関わっている事を示唆している。

4. ヒト皮膚様組織 3D 培養における CCL20 遺伝子ノックダウンの影響

ここまで、線維芽細胞分化における CCL20 の機能について *in vitro* で検討してきたので、より *in vivo* に近いヒト皮膚様組織 3D 培養を用いて検討を行った。Transwell 上で NFF12 細胞を 3 週間培養した後、CCL20 siRNA をトランスフェクションし、24 時間後に線維芽細胞層の上にケラチノサイトを播種し、8 日間 TGF-β1 で刺激した。形成された 3D 組織を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、6 μ m の切片を作成し、HE 染色後に顕微鏡で観察を行ったところ、真皮層と上皮層の上に角質層のある皮膚様組織が確認された。TGF-β1 で刺激した 3D 組織では真皮層の肥厚が認められたが、線維芽細胞に CCL20 siRNA をトランスフェクションした組織では真皮層が薄くなっていた (図 7)。

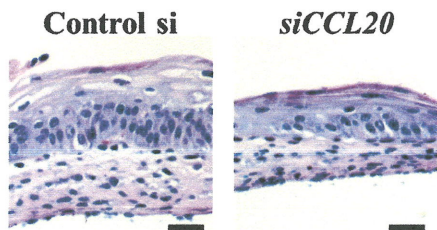


図 7・ヒト皮膚様 3D 培養組織切片の HE 染色 (スケールバーは 50 μ m)

次に形成された 3D 組織から RNA を抽出し、*COL1A2* と *ACTA2* の遺伝子発現を解析したところ、線維芽細胞の *CCL20* をノックダウンした組織では *COL1A2* mRNA の発現は有意に抑制されたが、*ACTA2* mRNA の発現は影響が見られなかった (図 8)。

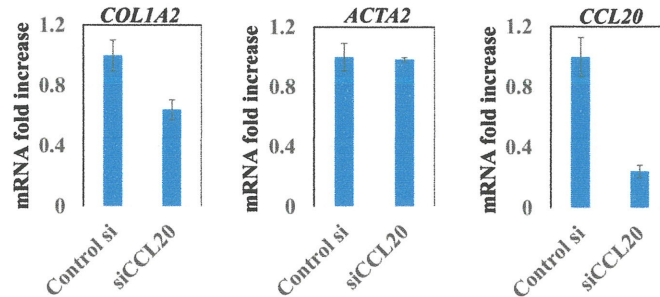


図 8・ヒト皮膚様 3D 培養組織の遺伝子発現

ヒト皮膚様 3D 培養組織は二種類の細胞を共培養しているため、図 8 の実験で抽出した RNA には線維芽細胞由来とケラチノサイト由来のものが混在している。従って、線維芽細胞に特有の遺伝子の発現量は少なく、特に *ACTA2* mRNA の発現量は検出可能な限界値であった。また、これらの遺伝子の発現に TGF- β 1 はほとんど影響を与えないという結果を得たが、これも 3D 組織に多量のケラチノサイト由来の RNA を含むためであると考えられる。

さらに、3D 組織をデオキシコール酸溶液で溶解し、SDS-PAGE を行った後、I 型コラーゲンと α -平滑筋アクチンの発現をウエスタンブロット法で確認したところ、*CCL20* siRNA により I 型プロコラーゲンが抑制されていた。しかし、 α -平滑筋アクチンの発現量は線維芽細胞に *CCL20* siRNA をトランスフェクションした組織とスクランブル siRNA をトランスフェクションした組織で差は認められなかった (図 9)。

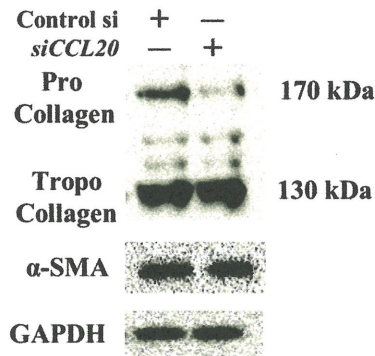


図 9 ヒト皮膚様 3D 培養組織の I 型コラーゲンと α -平滑筋アクチンの発現

これらの結果は *CCL20* が皮膚組織の真皮層で出現する筋線維芽細胞におけるコラーゲン合成を部分的に調節している可能性がある事を示唆している。

【まとめ】

線維芽細胞に TGF- β 1 を作用させ、筋線維芽細胞への分化を誘導すると、*CCL20*、*CXCL5*、*CXCL8* の発現が上昇した。ヒト前立腺の線維芽細胞において、すでに *CXCL5* と *CXCL8* が筋線維芽細胞への分化を促進する事が報告されていたので、*CCL20* の線維芽細胞への作用について解析を行った。リコンビナント *CCL20* を線維芽細胞に作用させると、筋線維芽細胞のマーカー分子である α -平滑筋アクチンの発現には影響を与えなかったが、I 型コラーゲンの発現を促進した。また、siRNA により線維芽細胞の *CCL20* 遺伝子をノックダウンすると、TGF- β 1 誘導性の I 型コラーゲン発現が抑制されたが、 α -平滑筋アクチンの発現には影響を与えなかった。これらの結果は *CCL20* が TGF- β 1 依存的あるいは非依存的な I 型コラーゲンの産生に関わっている事を示唆している。

次にヒト皮膚様 3D 組織培養で CCL20 の作用の検討を行った。siRNA により線維芽細胞の CCL20 遺伝子をノックダウンすると、I 型コラーゲンの合成が抑制され、TGF- β 1 による真皮層の肥厚が抑制された。この結果は CCL20 を抑制する事で、皮膚の癒痕化や線維化を抑制できる可能性がある事を示唆しており、CCL20 は皮膚創傷治癒異常や強皮症などの新たな治療のターゲットと成り得る。

また、ヒト皮膚様 3D 組織培養は培養期間が 30 日以上に及ぶため、siRNA の一過性の導入はこれまで難しく、レンチウイルスなどによる安定的な細胞株の構築が必要だったが、今回、初めて、取り扱いの簡単なリポフェクション法による siRNA の一過性の導入に成功した。この事により、ヒト皮膚様 3D 組織培養における遺伝子ノックアウト実験が手軽に行えるようになった。この技術を用いて、今後も Garlick 教授の研究室と共同研究を続けていく事になった。

現在、これらの結果をまとめ、国際学術誌への投稿準備中である。

【Boston での生活】

知り合いにタフツ大学は地下鉄 Red Line の Somerville Square 駅から徒歩圏内であると聞き、Somerville で部屋を借りた。確かに徒歩圏内にタフツ大学の Medford キャンパスはあったが、私の研修先の歯学部などの医療系は Boston のダウンタウンにキャンパスがある事がわかった。Somerville に土地勘はなかったが、Boston 中心部は家賃が驚くほど高いという事もあり、乗り換えなしで 6 駅ということで、Red Line で通う事にした。しかし、程なく、マサチューセッツ州がロックダウンしてしまい、地下鉄での感染の危険性が指摘されていたので、路面が凍結する冬まで Blue Bike というシェア自転車に通う事になった。Boston の道路には自転車レーンがあり、スムーズに通行できるが、普段、運動をしていない自分にとっては慣れるまでは過酷な 45 分間のサイクリングであった。そして、食事はキッチンを借りて自炊していた。Boston で外食すると高くつくというのもあったが、ロックダウンでレストランに行く習慣が無くなってしまったというのが大きい。スーパーで売っている食材は日本よりも安いものも高いものもあったが、何でも 1 ポンド (453 g) 単位で売られているので、1 日で食べきれず、何日か同じメニューが続いた。また、ロックダウン後はとても観光を楽しむような雰囲気ではなく、Boston 周辺を散策するくらいしかできなかった。このような環境だったので、研究室に入り浸り、研究に打ち込めたとも言えるが、いつか、Covid-19 のない Boston を Blue Bike で走りたい。

【Covid-19 パンデミック】

当初、3 ヶ月の予定で渡米したが、研修先の Garlick 教授の要望もあり、研修期間を 1 年間に延長させていただいた。Short term Visa での渡米だったため、5 月に一時帰国し、新たに J1 Visa を取りなおして再渡米するというプランをタフツ大学国際センターより提案され、新しい Visa 発給に必要な手続きが開始された。ところが、Covid-19 の世界的な流行により、マサチューセッツ州全体がロックダウンし、タフツの国際センターと連絡がとれなくなってしまった。1 週間ほどで、連絡が取れるようになると、新規 Visa の発給が停止されたということと、「一度、アメリカ国外に出たら、再入国ができない可能性が高い」ということを知らされた。一時は研修の継続が危ぶまれる事態に陥った。当時は、目まぐるしく情勢が変わっていたので、アメリカの行政機関やマサチューセッツ州からの情報収集に努めた。そして、タフツの国際センターからのサポートによりアメリカ国務省との交渉の末、Short term Visa から J1 Visa へのカテゴリー変更という特例措置を認めてもらうことができた。その一方で、突如、就労 Visa (J1 Visa も含む) 受給者の 2020 年内のアメリカ入国を禁止するという大統領令が公布され、2 日後には施行されてしまった。この大統領令のため、一時帰国はできなくなってしまったが、DS-2019 という滞在許可証の期限は 1 年間に延長された。Visa の期限が切れてしまう事に不安があったが、Visa が切れていても DS-2019 の期限内であればアメリカ国内の滞在に違法性はないという説明を受けて、ようやく安心できた。ボストンで知り合った日本人留学生はロックアウトと同時に次々と帰国してしまったため日本語で相談できる相手がいない中、様々な情報を収集し、何度もメールや電話でやりとりをし、書式もわからない嘆願書を提出したりと、英語が苦手な私にとっては大変な苦労であったが、今から思えばよい経験であった。

【謝辞】

本研修の機会を与えてくださり、研修期間の延長という私の我儘を聞き入れていただきました事に深く感謝いたします。宮田淳理事長、安井利一学長、申基喆歯学部長、草間薫前歯学部長、友村明人前生化学分野教授、タフツ大学の Jonathan Garlick 教授に重ねてお礼申し上げます。