

要旨

肺動脈外膜を構成する線維芽細胞の分化能に基づいた階層性についての検討

47126337 がん先端生命科学分野

須田 義上

[背景と目的]

線維芽細胞の一種である間葉系幹細胞(MSCs)は、成体にも存在する体性幹細胞であり、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、などへの分化能を示し、骨髄間質をはじめとした様々な組織の線維芽細胞集団に含有されている。MSCsの分化が進行した間葉系前駆細胞(MPCs)は、一つの細胞系列にのみ分化可能である。組織中には、MSCs、MPCs、分化能を持たない線維芽細胞が混在し、分化能に基づいた階層性が形成している(図1)。本研究室では、ヒト肺動脈血管外膜由来線維芽細胞(hVAFs)が骨芽細胞と脂肪細胞への分化能を示し、MSCsあるいは骨芽細胞、脂肪細胞のMPCsが含まれている可能性があることを報告してきた。このhVAFをモデルとして、hVAFs集団のMSCs、MPCsの存在と頻度を単細胞クローンレベルの解析により、分化能に基づいた階層性の機構を解明することを目的とした。

[方法]

- 線維芽細胞の短寿命性を解決するため、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)の遺伝子導入を行い、hVAFsの細胞寿命を図り、単細胞クローンの作製を実施した。
- 作製したクローンの分化能を検討することで、hVAFsに存在するMSCsとMPCsの種類と頻度を同定した。

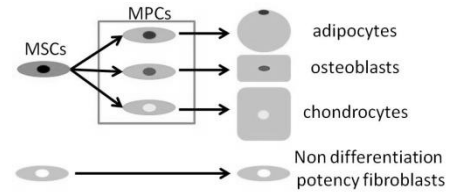


図1 分化能を有する線維芽細胞集団に存在する細胞の種類

[結果]

- 採取した検体のhVAFs、および同一検体の肺線維芽細胞(hLFS)に対し、骨芽細胞、脂肪細胞への分化誘導を実施し、骨芽分化能ではALP染色による酵素活性と von Kossa染色によるカルシウム沈着を、脂肪分化能ではOil red O染色による脂肪滴の形成を可視化することで検討した。ALP染色は、非誘導群ではhVAF、誘導群ではhVAFs、hLFSの両方でALP陽性細胞が観察された。von Kossa染色では、hVAF、hLFSの誘導群にカルシウム沈着が見られた。Oil red O染色では、hVAFsの誘導群のみに脂肪滴の形成が見られた。
 - 染色された細胞の画像解析によって分化能を、細胞全体の面積に対する陽性細胞の面積の割合として定量化を実施した。(図2、3、4) hVAFsの誘導群は、hLFSの誘導群に比べ、全ての染色法において、有意($p < 0.05$)に定量値が高かったため、hVAFsがより骨芽分化能と脂肪分化能が高い細胞集団であることが確認された。

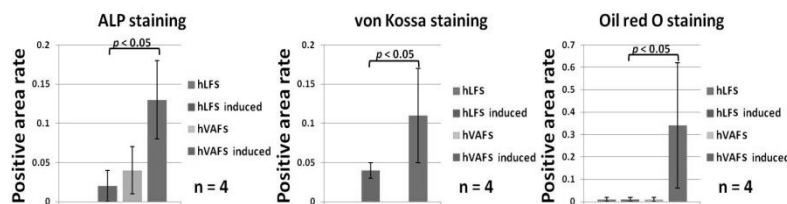


図2,3,4 hVAFsは、hLFSよりも骨芽細胞と脂肪細胞への高い分化能を示した。

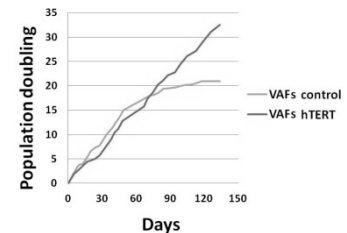


図5 hTERTの遺伝子導入によりhVAFsの分裂回数が増加した。

- レンチウイルスベクターを用いてhTERT-venusの遺伝子導入を、hVAFに実施した。感染に成功した検体に対し、フローサイトメトリーによる、Venus蛍光を指標とした分離を実施した。その後、継代培養を継続し、細胞の分裂回数を計測した。(図5) コントロールベクターを遺伝子導入したコントロール群の増殖が停止した後も、導入群は増殖し続け、分裂回数が増加し、細胞寿命が延長されたことを確認した。さらに、RT-PCRによってhTERTの発現をGAPDHによる補正定量値で測定した。非導入群と比較して、導入群は、hTERTの発現が高いことが確認された。また、hLFSにおいても、同様の検討を行い、細胞寿命が延長したことを確認した
 - hTERTの遺伝子導入後もhVAFs、hLFSに骨芽分化能と脂肪分化能が維持されているかを検討するため、分化誘導と染色を実施した。分化能の定量化によって、hVAFs、hLFSの骨芽分化能が維持されていることが確認された。一方で、hVAFsの脂肪分化能は低下していたため、以後は骨芽分化のみを検討することとした。(図6、7、8)

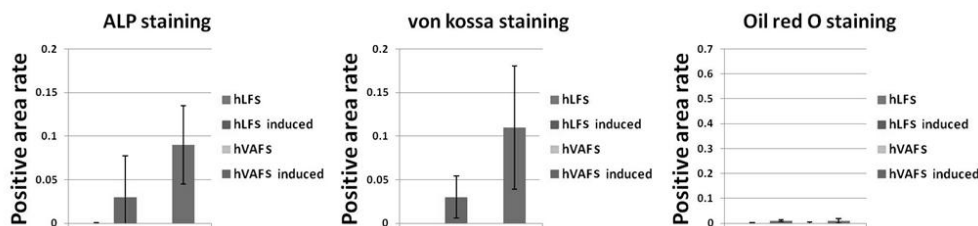


図6,7,8 hTERTを遺伝子導入した後も、hVAFsとhLFSは、骨芽分化能を示した。一方でhVAFs、hLFS共に脂肪分化能を示さなかった。

- hTERTを遺伝子導入したhVAFs、hLFSに対して、フローサイトメトリーによる単細胞分離を実施し、6cm dishにコンフルエントになるまで継代培養を行った。hVAFsでは、6度のsortingの実施により1011個の播種を行い、コンフルエントとなったのは66個であった。また、hLFSでは9度のsortingの実施により1925個の播種を行い、コンフルエントとなったのは78個であった。

(4) 作製された hVAFs と hLFs の単細胞クローンに対し、骨芽分化誘導を実施した。分化能の定量化が不可能なもの除外し、hVAFs では、48 種のクローン、hLFs では 53 種のクローンの定量値を算出した。hTERT を遺伝子導入した hVAFs の定量値に基づいて 0.1 をカットオフ値として、それ以上を染色陽性群とした。hVAFs においては、ALP 染色のみ陽性を示したのは 17 種、両染色法の陰性群は 23 種、von Kossa 染色のみ陽性を示したクローンは 7 種、両染色法の陽性群が 1 種であった。hLFs では、ALP 染色のみは 34 種、両染色法陰性は 19 種が確認され、von Kossa 陽性を示したクローンは確認されなかった(図 9、10)。

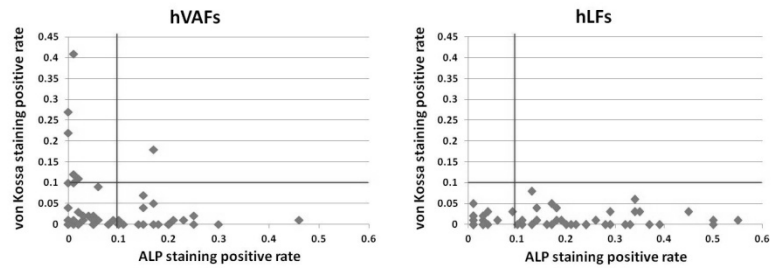


図9.10 hVAFとhLFの単細胞クローンは、どの染色法に陽性であるかでグループに分類できた。

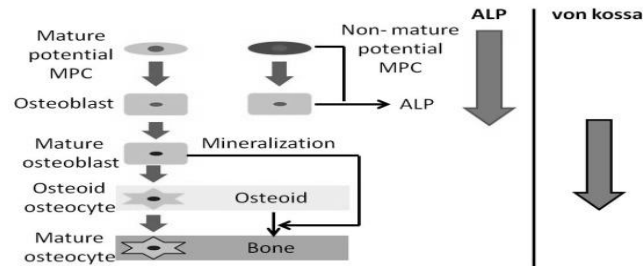


図11 骨芽細胞の分化において、ALP染色と von Kossa染色は異なる分化段階を示すため、一方の染色法のみが陽性のクローンは、進行可能な分化段階が異なるMPCsと考えられる。

[考察]

採取されたhVAFsは、当研修室の既存の報告通り、骨芽分化および脂肪分化誘導を実施することで、図2、3、4のようにALP染色、von Kossa染色、Oil red O染色によって陽性の細胞が確認された。加齢や喫煙などのバックグラウンドは線維芽細胞の細胞寿命に負に作用するため、今回使用した成人の肺由来のhVAFs、hLFsは、細胞老化が発生するまでの分裂回数が少ないことが予想された。図5の結果より、hVAFsでは、コントロール群が分裂停止した後も分裂が継続し、hTERTの発現もRT-PCRによる検討によって非導入群よりも高いことが判明したため、hTERT遺伝子導入により細胞寿命が延長されたことが確認された。分化能にhTERTの遺伝子導入が影響するかを検討するため、分化誘導を実施した。図6、7、8の結果よりhVAFs、hLFsの骨芽分化能が維持されている一方で、図4と比較してhVAFsの脂肪分化能が低下していた。骨髄間質および脂肪組織由来のMSCsの場合、hTERTによって分化能の損なわれない報告があるが、hVAFs、hLFsにおいては干渉する可能性が考えられた。よって、今回の検討ではMSCおよび脂肪前駆細胞の存在をみる事ができず、今後検討する場合は、脂肪分化能が高い検体を用いることが必要になると考えられる。

単細胞クローンを作製するために、hTERTを遺伝子導入した線維芽細胞の単細胞分離を行い、hVAFsでは、播種を行った細胞数に対して5%、hLFsでは4.1%が作製に成功した。hTERT導入の胎児肺由来の線維芽細胞では、寿命延長されたクローンは21.6%であったことが報告されており、hVAFs、hLFsにおいても同様に、hTERTによる細胞寿命の延長効果が細胞によって不均一であることが判明した。細胞老化の原因遺伝子であるp53などのプロモーター活性の違いによって、寿命の延長期間に差が生じた可能性が考えられた。hVAFs、hLFsの単細胞クローンに対し骨芽分化誘導を行ったところ、von Kossa染色陽性のクローンの頻度は、hVAFsは17%、hLFsは0%。一方、ALP染色陽性のクローンの頻度は、hVAFsは35%、hLFsは64%であった。hTERT遺伝子導入後における細胞集団全体の分化能の定量値より、hVAFs細胞集団の全体には、9%のALP染色陽性細胞と11%のvon Kossa染色陽性細胞が、hLFsには3%のALP陽性細胞とvon Kossa染色陽性細胞がそれぞれ存在すると予想されたが、単細胞クローン中のALP染色陽性細胞の割合はそれを上回った。この原因として、hTERT遺伝子導入によって骨芽分化能を有する細胞の存在頻度が高まった可能性と、細胞集団中に骨芽分化能に対して抑制的に作用する細胞が存在した可能性が考えられる。一方で、図10のようにhLFsには、von Kossa染色陽性のクローンが見られず、図9のようにhVAFsでは、von Kossa染色とALP染色のどちらか一方が陽性であるかによってクローンを、ドットプロット上でグループを分類できることが判明した。ALP産生は骨芽細胞への分化早期より成熟するまで、カルシウムの沈着は成熟段階に起きるため、どちらの染色法によって陽性であるかは分化段階の違いを示す。hTERT遺伝子導入後の段階で、骨芽前駆細胞と分化能を有さない線維芽細胞のみで階層性が形成されていたと考えられるため、hVAFs内の骨芽前駆細胞には、図11に示すような分化後に成熟の段階へ進行する細胞としない細胞が存在し、図12に示す骨芽前駆細胞内における更なる階層性が存在することが考えられた。

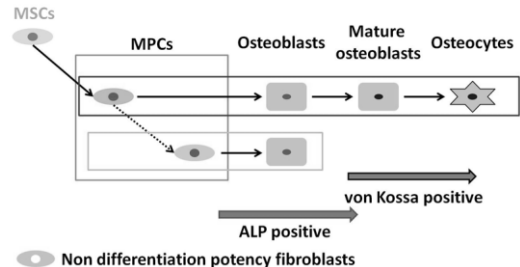


図12 骨分化において、成熟段階まで進行可能なMPCsと不可能なMPCsによる新たな階層性が存在すると考えられる。

[結論]

hTERTの遺伝子導入によりhVAFsとhLFsの単細胞クローンが作製可能であり、MPCsの中にさらなる階層性が存在する可能性を見出した。