

田中 麻弥 論文内容の要旨

主 論 文

Roles of focal adhesions and fibronectin-mediated cohesion in proliferation of confluent fibroblasts.

(コンフルエントな線維芽細胞の増殖における接着斑とフィブロネクチンを介したコヒージョンの役割について)

田中麻弥、安部達也、原 宜興

Journal of Cellular Physiology (掲載時期：未定)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：原 宜興 教授)

【緒言】

多層性線維芽細胞シートは再生医療の移植材として注目されている。このような移植材の有効性を高める方法は、それに含まれる細胞数（細胞密度）を増すことである。しかし、線維芽細胞の多層化増殖に影響する因子については不明な点が多い。インテグリンを介したフィブロネクチン（FN）マトリクスとの接着および細胞骨格系によるメカニカルフォースの発生とそれに伴う付着構造物 focal adhesion（FA）の形成は、細胞の様々な活動に影響を及ぼすことが知られている。本研究では、コンフルエントな線維芽細胞の増殖における FA と FN を介した細胞間結合（cell-FN-cell cohesion）の役割について調べた。

【材料および方法】

正常ヒト歯肉線維芽細胞をコンフルエントまで培養して実験 0 日目とした。その後、多層化培地（MFМ ; 1 ng/ml TGF- β 1、0.15 mM アスコルビン酸2リン酸および10% FBS 添加培地）で培養した。対象群は FBS のみ添加した培地で培養した。DNA 合成は BrdU 標識実験で解析した。FA 構成分子の局在は蛍光免疫染色と共焦点レーザー顕微鏡で解析した。F-アクチンは蛍光標識 phalloidin で検出した。

【結果および考察】

細胞密度依存性に増殖停止した細胞を MFМ で培養すると DNA 合成が再開したが、FBS 単独培地では増殖しなかった。 α 5 β 1 インテグリンや FN の細胞結合ドメインに対する抗体を用いて cell-FN-cell 相互作用をブロックすると、MFМ による増殖は抑制された。しかし、MFМ と FBS 単独培養の両方で FN マトリクスの沈着、活性型 β 1インテグリンの発現およびストレスファイバーの発達が見られた。これらの結果は、 α 5 β 1 インテグリンを介する cell-FN-cell cohesion が増殖に必要ではあるが十分ではないことを示した。FBS 単独培地では FA は細胞辺縁部に限局していたが、MFМ で培養すると vinculin、paxillin および phosphotyrosine を含む FA が腹側の細胞膜全体に分布した。このような FA の誘導は ROCK を介したアクチン収縮性フォースの発生によることが知られている。ROCK 阻害剤 Y-27632 または myosin II 阻害剤 blebbistatin を MFМ に添加して FA の形成を抑制すると、DNA 合成は抑制された。これらの阻害剤は FN マトリクスの沈着、活性型 β 1 インテグリンの発現およびストレスファイバーの発達を阻害しなかった。

【結論】

今回我々は、FA の誘導がコンフルエントな線維芽細胞の増殖を促進することを証明した。この増殖は cell-FN-cell cohesion に依存することも示された。本研究で得られた知見は、細胞密度の高い線維芽細胞シート移植材の設計原理の確立に寄与する。