

主 論 文 要 旨

報告番号

① 乙 第

号

氏 名

吉 田

剛

主 論 文 題 名

Three-dimensional culture of sebaceous gland cells revealing the role of prostaglandin E₂-induced activation of canonical Wnt signaling

(皮脂腺細胞の3D培養システムによる炎症性サイトカインプロスタグランジンE₂の古典的Wntシグナルおよび代謝への影響に関する検証)

(内 容 の 要 旨)

今回私は皮脂腺不死化細胞であるSZ95細胞株の3D培養システムを構築することで、皮脂腺に対する炎症性サイトカインであるプロスタグランジンE₂ (PGE₂) の影響について検証を行ったのでその研究成果を報告した。3D培養システムは、細胞外マトリックス (extracellular matrix; ECM) を添加したり、空間的な自由度を高めることで培養細胞に内在する組織形成能を顕在化させることで、従来の2次元での培養実験よりも生体内での形質を誘導、検証することを可能とするメリットがある。また、近年、動物実験倫理において注目されている3Rの原則 (replacement, reduction, refinement) の観点からも3D培養は注目視されている。

皮脂腺は毛包上部に開口しており手掌、足底以外のほぼ全身に分布している。皮脂腺における脂質代謝は、男性ホルモンであるアンドロゲンによって促進される。PGE₂をはじめとする脂質メディエーターを介する慢性炎症によって皮脂腺の過形成、増生が病理組織学的に報告されている。1999年にドイツの皮膚科学者であるZouboulis教授がSV40 large T antigenを用いてヒト皮脂腺細胞を不死化させSZ95細胞株を樹立した。本研究ではMTA文書による同意のもと、Zouboulis教授から御分譲頂いたSZ95細胞を用いて研究を行った。また、本研究で着目したCD44という1回膜貫通型分子は選択的スプライシングにおける可逆性エクソンの挿入の有無によってCD44スタンダード (CD44s) とCD44バリエーション (CD44v) に大別されるが、とりわけ可逆性エクソン8-10を含むCD44v8-10と呼ばれるアイソフォームは上皮細胞特異的に発現しており、本研究でSZ95細胞におけるCD44v8-10の発現度は“上皮細胞らしさ”を規定する分子として重要であることが示された。

マウス肉腫由来のECM成分であるマトリゲルを足場として、SZ95細胞を上皮細胞増殖因子 (Epithelial growth factor; EGF) 5ng/mlとマトリゲル2%を含むDMEMの中で2週間培養したところ、外縁部において基底膜の成分であるラミニンVを豊富に発現する皮脂腺オルガノイドの誘導に成功した。初期の段階ではオルガノイド内部にアポトーシスに陥った活性型カスパーゼ3陽性細胞が認められ、オルガノイドの成長に伴い内腔の発達に寄与すると考えられた。興味深いことに30-40個のオルガノイドを免疫不全マウスに皮下移植しても腫瘤は形成されず、持続的なEGF刺激やECMの存在がオルガノイドの維持に重要であることが強く示唆された。こうして誘導されたオルガノイドのタンパクを回収し2D培養における遺伝子発現プロファイルの差異を検証したところ、βカテニンを介する古典的Wntシグナル、ミトコンドリア代謝、そして脂質代謝に関わる分子の発現増加が顕著に認められた。2週間にわたる3D培養のうち後半の7日間をPGE₂ (100ng/ml) 存在下にて培養するとオルガノイドの成長は顕著に促進され表面積はコントロール群と比較しておよそ10倍にまで拡大した。形態学的にも基底膜を突出したCD44vを強く発現するbleb-likeな細胞やcribriform-patternによる内腔の消失を認めた。