

湘南藤沢学会「研究助成基金」成果報告書
再生医療における各臓器に特異的な線維芽細胞の機能解析のための実験

環境情報学部 3年 曲田 捷人

1. 活動目的

現在、心筋細胞やがん細胞には、それぞれに特異的な線維芽細胞が存在することが明らかになっている。心臓線維芽細胞は、心筋細胞の増殖・遊走能の促進に関与していることがわかっている。そこで、本研究では、各種の線維芽細胞の H2O2 分解機能を解析し、新薬の開発や、治療法の発明につながる知見を得る事を目的とする。

2. 心臓線維芽細胞の酸化ストレスへの応答の調査

心臓においては、虚血性心疾患などにより心筋細胞が壊死し、その部位を補填しようとする線維芽細胞がリクルートされ、その部位でコラーゲン等の細胞外マトリックスを大量に産生、その結果、心臓の環境が大きく変化し、心筋細胞の病的肥大やアポトーシスを引き起こす心筋リモデリングと言う現象が起こる。自然治癒力のように聞こえるが、まったく逆の現象で結果的に血流量を確保しようと左心室の肥大化（心肥大）を招くことになり、結局は心臓自体の寿命を縮めることになる。その発症メカニズムは心臓の再生を行う過程での線維芽細胞と心筋細胞の細胞間コミュニケーションによる修復プログラムの異常によって起こることがわかっている。しかしながら、心臓内で線維芽細胞がどのようなシグナルパスウェイを介して心臓リモデリングを引き起こしているかは未だ明らかにされていない。近年の先行研究により、酸化ストレスが大きく関わっていることがわかっている。酸化ストレスとは、心筋梗塞などの虚血性心疾患が起きた際にその壊死した領域にある心筋細胞内で発生した ROS などから生成される活性酸素種により、酸化ダメージを受け、心不全や心筋リモデリングが誘発されるという現象である。そして、この酸化ストレスにより、心筋リモデリングや心不全の促進に繋がることもわかっているため、各種の線維芽細胞における酸化ストレスへの応答を見た。

3. 実験手法

今回用意した細胞はヒト心臓線維芽細胞 (Human Cardiac Fibroblasts : HCFs)、ヒト皮膚線維芽細胞 (Neonatal Human Dermal Fibroblasts : NHDFs) の 2 種類を用いた。各細胞を H2O2 を添加した培地で 24 時間で培養し、免疫蛍光染色を用いて、それぞれの細胞内のペルオキシソームに存在する Catalase を染色し、INCell Analyzer2200 を用いてペルオキシソームの輝度値を解析する事により、HCFs に特異的に見られる H2O2 分解の働きを見る。ペルオキシソームは細胞

内で H2O2 などの分解機構を持っており、その働き方は細胞種によって大きく異なる。

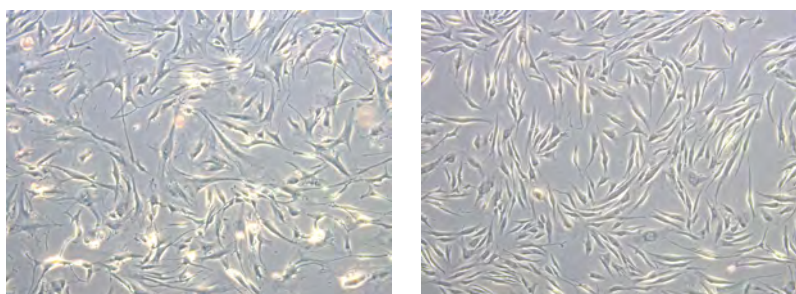


図 1 HCF(左)と NHDF(右)の写真の図

4. 成果

今回は、細胞の境界線をもとにペルオキシソームの評価を行うため細胞質全体を染める Cell Mask という抗体を用いて細胞領域を評価した。そして、Catalase の抗体量の条件検討を行ったのち本実験を実行し、それぞれの細胞内に存在するペルオキシソームの免疫蛍光染色を行った。HCF と NHDF において細胞領域内に Catalase の蛍光を確認する事が出来た(図 1)。今回の免疫蛍光染色の画像データからペルオキシソームの輝度値を計測する為に、今後 In Cell Analyzer 2200 の使用方法及びプロトコルを GE Health care より学び、解析を行っていく。

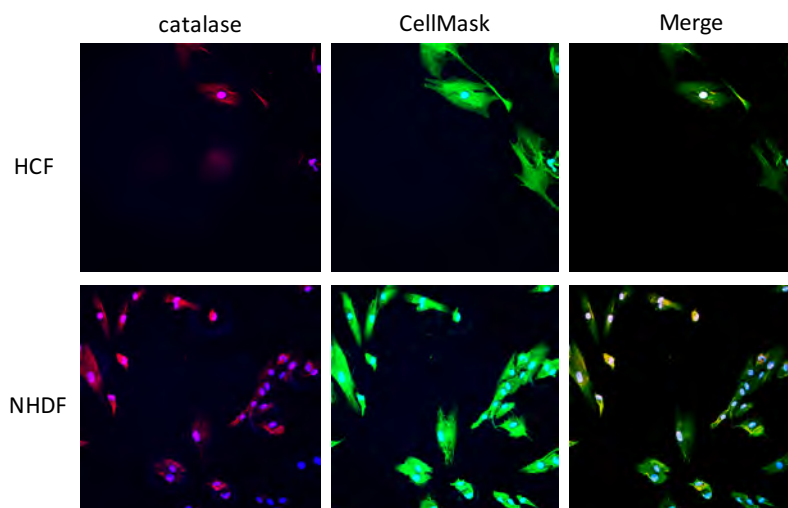


図 2 HCF&NHDF における Catalase と Cell Mask の染色の図

5. まとめ

今回は、酸化ストレスに欠かすことのできない H2O2 分解機能を持つペルオキシソームに注目しアッセイを行った。今後は、H2O2 発生時に大きく働きを変えるミトコンドリアの機能解析、そして、心臓線維芽細胞特異的な H2O2 分解機能を解明していきたい。