

学位論文内容の要旨

論文提出者	井葉野 夏実
論文審査委員	(主 査) 朝日大学歯学部 教授 齊藤 一誠 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 菌村 貴弘 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 川木 晴美
論文題目	The Role of Genetically Modified Human Feeder Cells in Maintaining the Integrity of Primary Cultured Human Deciduous Dental Pulp Cells 初代培養ヒト乳歯歯髄細胞の多能性維持における遺伝子組み換えヒト feeder cell の樹立
【目的】	<p>組織特異的幹細胞(Tissue specific stem cells:TSCs)は多能性については限定的だが、免疫不全マウスに移植しても奇形腫を形成しないという利点があり、再生医療での活用が期待されている。また脱落乳歯からはヒト乳歯歯髄細胞(Human Deciduous Dental Pulp Cells:HDDPCs)が単離でき、HDDPCs 中には TSCs が豊富に含まれている。そのため HDDPCs は再生研究の材料として有用な資源であると考えられているが、これまでの研究で HDDPCs は feeder cell のない培養皿では多能性を維持できないことが分かっている。そこで本研究では、HDDPCs の幹細胞性維持に適した遺伝子組み換えヒト feeder cell を製作することを目的とした。</p>
【材料および方法】	<p>HDDPCs は、小児の脱落乳歯から単離し、酵素処理後、MEM-α/20%FBS(Equitech Bio), 1%Penicillin/Streptomycin(Invitrogen)で 5% CO₂, 37 °C 条件下にて培養した。LIF, BMP4, bFGF, E7 をコードする遺伝子を Neon®(Invitrogen)による電気穿孔法にて遺伝子導入し、遺伝子改変 HDDPCs を作製した。遺伝子導入後、neomycin(TaKaRa Bio)と blasticidin (Merck) により細胞を選別し、残存コロニーを選別した。遺伝子導入を確認するために RT-PCR により、LIF, BMP4, bFGF の遺伝子発現を確認した。さらに免疫細胞化学染色により、LIF, BMP4, bFGF の発現を確認した。その後、mitomycin C (Sigma-Aldrich)で処理し、細胞増殖を停止して、feeder cell を樹立した。</p> <p>feeder cell 存在下と非存在下で HDDPCs を継代培養し、細胞増殖への影響を確認した。同時に、HDDPCs の形態変化について位相差顕微鏡で比較を行った。さらに HDDPCs の分化多能性への影響を確認するため、同様に feeder cell 存在下と非存在下で HDDPCs を骨分化培地(DS Pharma) もしくは神経分化培地(PromoCell)で培養し、Alizarine Red S 染色により石灰化能を、Nissl 染色により神経分化能を比較した。さらに同様の条件で 20 継代後に ALP 活性を確認するため ALP 染色を行った。</p>
【結果】	<p>遺伝子導入した細胞から TR-1, TR-2, TR-3 の 3 つの細胞株を得た。RT-PCR の結果 TR-2 は全ての導入遺伝子を含んでおり、また in vitro での増殖率も高かったため、以後の実験</p>

には TR-2 を使用した。免疫化学染色では、TR-2 において、BMP4, LIF, bFGF の発現が確認された。

初代 HDDPCs は TR-2 feeder cell の有無にかかわらず、10 継代後も線維芽細胞の状態が維持されていたが、その増殖率は TR-2 feeder cell と共培養した方が TR-2 feeder cell 不在の場合より高かった。

骨分化誘導においては、TR-2 feeder cell との共培養において高い石灰化能を認めた。また神経分化誘導では、TR-2 feeder cell との共培養により高い神経分化能を示した。ALP 染色では、TR-2 feeder cell と共培養した HDDPCs は 20 継代後でも ALP 活性が認められたが、feeder cell 不在で培養した HDDPCs では ALP 活性は認められなかった。

【考 察】

feeder cell と共培養した場合に HDDPCs の増殖率が高かったことから、feeder cell が分泌する成長因子などが細胞増殖率に影響を与えていると考えられた。また TR-2 feeder cell と共培養した HDDPC では、高い骨分化能と神経分化能を示したことから、feeder cell により多分化能が維持されたと考えられた。さらに feeder cell 不在で連続培養した HDDPCs は ALP 活性が低下したのに対して、feeder cell と共培養した HDDPCs は ALP 活性を維持したことから、feeder cell は幹細胞特性の維持に有益であると考えられた。

【結 論】

feeder cell と初代培養 HDDPCs を共培養することにより、HDDPCs の増殖率が向上し、多分化能が維持されることが分かった。そのため feeder cell は、プラスチック製培養皿での維持が困難な iPS 細胞や幹細胞の維持に有用であると考えられた。また遺伝子組み換えヒト feeder cell は、幹細胞を利用した再生医療に活用できることが期待される。