

学 位 論 文 審 査 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	<p style="text-align: center;">The Role of Genetically Modified Human Feeder Cells in Maintaining the Integrity of Primary Cultured Human Deciduous Dental Pulp Cells</p> <p>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</p> <p>組織特異的幹細胞(TSCs)の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 HDDPCs が単離でき、HDDPCs 中には TSCs が豊富に含まれているため、HDDPCs は再生医療研究の材料として有用な資源であるが、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。これまではマウスの胎児から得た Mouse Embryonic Fibroblast (MEF) を feeder cell として使用していたため、異種細胞のコンタミネーションや移植時の拒絶反応のリスクがあった。本論文では、ヒト乳歯歯髄細胞(HDDPCs)の幹細胞性維持に寄与した遺伝子組み換えヒト feeder cell の樹立を目的としている。</p> <p>小児の脱落乳歯から HDDPCs を単離し、酵素処理後、MEM-α/20%FBS, 1% Penicillin/Streptomycin 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電気穿孔法にて遺伝子導入し、遺伝子改変 HDDPCs を作製した。我々の先行研究では、HDDPCs に対する電気穿孔法による導入効率は約 60%であったことから、今回の研究では 4 つのプラスミドを導入するため導入効率は約 13%となり、十分再現性はあると考えられる。遺伝子導入後、neomycin と blasticidin により細胞を選別し、残存コロニーを選別した。RT-PCR により、LIF, BMP4, bFGF の遺伝子発現を確認し、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(MMC)処理で細胞増殖を停止し、feeder cell を樹立した。また、MMC 処理する以前の細胞は増殖、長期継代が可能なので継続した実験は可能である。今回の研究で得られた TR-2 feeder cell はすべての導入遺伝子の発現を認め、増殖率も高いため今後の研究にも利用可能であると考えられる。</p> <p>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、また増殖率は 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。このことから、TR-2 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る。骨分化誘導や神経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と神経分化能を認めたことから、feeder cell により多分化能が維持されたと考えられる。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。</p>

以上のことから 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今後活用できることが期待される. よって審査委員は, 本論文を博士の学位を授与するに値すると判定した.