

Title	Development of Genetically Modified Eliminate Human Dermal Fibroblast Feeder Cells for Ocular Surface Regeneration Medicine
Author(s)	黎, 穎莉
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34284
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	黎 穎莉
論文題名 Title	Development of Genetically Modified Elimnable Human Dermal Fibroblast Feeder Cells for Ocular Surface Regeneration Medicine (眼表面再生医療における遺伝子改変除去型ヒト皮膚線維芽細胞フィーダー細胞の開発)
<p>論文内容の要旨</p> <p>〔目的(Purpose)〕</p> <p>Cultured human corneal limbal stem/progenitor cells are usually established and maintained on feeder layers. However, animal feeder cells are associated with viral infection, pathogen transmission, and xenogenic contamination. All feeder cells also can be mixed easily into cell-sheet production, causing self-contamination. We developed a line of labeled immortalized eliminable human dermal fibroblast cells to solve these problems.</p> <p>〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕</p> <p>Methods: The enhanced green fluorescent protein gene, human-derived telomerase reverse transcriptase gene, and herpes simplex virus thymidine kinase gene were transfected into human dermal fibroblast cells to establish labeled immortalized eliminable feeder cells. Established genetically modified dermal fibroblasts (TERT+TK-D) were treated with mitomycin, co-cultured with human limbal stem/progenitor cells to regenerate epithelium sheets, and compared with 3T3 feeder cells.</p> <p>Results: Established TERT+TK-D feeder cells maintained immortalization, visualization, and eliminable characteristics during 6 months of continuous passages. The colony-forming efficiency of limbal stem/progenitor cells was similar in the TERT+TK-D group ($11.77 \pm 0.21\%$) and the 3T3 group ($12.8 \pm 1.61\%$) ($P = 0.332$). All cell sheets were well stratified into four to five layers. The TERT+TK-D group colonies and epithelial cell sheets showed weaker staining of corneal epithelium differentiation marker K3 than the 3T3 group and quantitative analysis of mRNA transcripts. Moreover, PCR analysis against the long terminal repeat sequence of the lentiviral vector integrated into the genetically modified feeder cells showed no contamination of GCV-treated regeneration epithelial sheets.</p> <p>〔総括(Conclusion)〕</p> <p>Genetically modified labeled immortalized eliminable human dermal feeder cells are promising substitutes for 3T3 feeder cells for xenogeny-free ocular surface regeneration.</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 黎 穎莉			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	西岡 亨二
	副 査	大阪大学教授	宮崎 純一
	副 査	大阪大学教授	田嶋 信二

論文審査の結果の要旨

従来の培養ヒト角膜上皮細胞移植では、マウス由来の細胞をフィーダー細胞としてヒト角膜上皮細胞シートを作製していたために、異生物種細胞からの感染ならびに異生物種細胞の混入の危険性があった。これまでに異生物種細胞からの感染を回避するためにヒト由来の皮膚細胞を用いた報告があるが、細胞の寿命が限られているために臨床応用するには手間とコストが必要であった。そこで、ヒト皮膚細胞に不死化遺伝子を導入することにより凍結保存が可能で移植が必要な際に利用可能な、また自殺遺伝子およびマーカー遺伝子導入することにより異生物種細胞の混入の危険性を回避することが可能なヒト皮膚細胞由来の遺伝子導入フィーダー細胞を開発した。本研究で得られたヒト皮膚細胞由来遺伝子導入フィーダー細胞は独自性が高く、ヒト由来フィーダー細胞を用いて眼組織再生医療に使用可能な角膜上皮細胞シートの作製が可能であるため、臨床応用に寄与する内容であり、学位の授与に値すると考えられる。