

Title	A novel method of culturing human oral mucosal epithelial cell sheet using post-mitotic human dermal fibroblast feeder cells and modified keratinocyte culture medium for ocular surface reconstruction
Author(s)	大家, 義則
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58220
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【12】

氏 名	大 家 義 則
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 4 1 1 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 22 年 5 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学 位 論 文 名	A novel method of culturing human oral mucosal epithelial cell sheet using post-mitotic human dermal fibroblast feeder cells and modified keratinocyte culture medium for ocular surface reconstruction (皮膚線維芽細胞および医薬品を用いたケラチノサイト培養液による眼表面再建のための口腔粘膜上皮細胞シートの新規作製法)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 不 二 門 尚 (副査) 教 授 澤 芳 樹 教 授 仲 野 徹

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

自家口腔粘膜上皮細胞を温度応答性培養皿上で培養して作製した上皮細胞シートを用いた

培養移植によって、従来の他家細胞を用いた角膜移植による治療では極めて治療成績が悪かったステューブンスジョンソン症候群や眼類天疱瘡などの難治性角膜上皮疾患に対する治療精製気が飛躍的に向上した。しかしながら、従来法での培養は異種由来フィーダー細胞である3T3細胞や異種由来血清である牛胎子血清を用いており、異種由来感染症の危険性が否定できなかった。さらに培地成分には研究用試薬を用いており、安全性の問題が存在した。そこで我々は移植用のヒト口腔粘膜上皮細胞シートの製造方法の安全性向上のため、ヒト皮膚線維芽細胞をフィーダー細胞とし、医薬品を成分とした培養液を用いた培養法について検討を行った。

〔 方 法 〕

X線処理したヒト皮膚線維芽細胞およびNIH/3T3細胞をフィーダー細胞とし、温度応答性培養皿上で3名の健常ボランティアから採取した口腔粘膜上皮を培養した（おのおの線維芽細胞群、3T3細胞群）。培地成分には研究用試薬の代わりに同一成分の医薬品を用い、コレラトキシンの代わりにイソプロテレノールを用いた。まずフィーダー細胞の評価としてRT-PCRによって、上皮幹細胞の維持、増殖に必要な遺伝子（epiregulin (EPR), pleiotrophin (PTN), cystatin C (CC), hepatocyte growth factor (HGF), keratinocyte growth factor (KGF), inslin-like growth factor 1a (IGF1a), N-cadherin (N-cad)) を発現しているかどうかを確認した。またフィーダー活性の評価としてコロニー形成試験を行った。培養した上皮細胞シートはヘマトキシリンエオジン(HE)染色による組織学的検討、免疫組織染色による各種マーカーの発現解析を行った。またシートに含まれる細胞の生細胞率および上皮細胞純度をflow cytometryを用いて解析した。

〔 成 績 〕

ヒト皮膚線維芽細胞およびNIH/3T3細胞の両者においてPTN, CC, HGF, KGF, IGF1a, N-cadの発現を認めた。EPRはNIH/3T3細胞において発現を認めなかった。コロニー形成試験において、両群においてコロニーを形成することが確認され、ヒト皮膚線維芽細胞はフィーダー活性をもつことが確認された。コロニー形成率は皮膚線維芽群では $1.5 \pm 0.8\%$ であり、3T3細胞群では $2.3 \pm 0.8\%$ であり、両群間には統計学的な有意差を認めなかった ($P=0.266$, t-test)。またコロニーサイズは線維芽細胞群において $15.0 \pm 11.5 \text{mm}^2$ 、3T3細胞群においては $6.4 \pm 2.1 \text{mm}^2$ であり、両群間に統計学的な有意差は認めなかった ($P=0.271$, t-test)。口腔粘膜上皮細胞シートは両群において作製が可能であり、20℃における30分の処理によって回収することができた。HE染色による細胞シートの組織学的観察では両群ともに角膜上皮層に類似した形態の4から5層の上皮細胞シートであることが確認された。免疫組織染色では両群ともにkeratin 3/76, 4, 15, 20-1, MUC16, p63の発現を認めた。Keratin1, 10, 12, 13の発現は認めなかった。p63陽性細胞率は線維芽細胞群 ($46.1 \pm 4.2\%$) が3T3細胞群 ($30.7 \pm 7.6\%$) より有意に高かった ($P=0.038$, t-test)。K15陽性細胞率は線維芽細胞群 ($24.0 \pm 3.7\%$) と3T3細胞群 ($20.6 \pm 2.5\%$) で統計学的な有意差はなかった。生細胞率は線維芽細胞群で $88.7 \pm 4.1\%$ 、3T3細胞群で $85.9 \pm 3.5\%$ であった。上皮細胞純度は線維芽細胞群で $98.2 \pm 1.9\%$ 、3T3細胞群で $96.3 \pm 3.6\%$ であった。生細胞率、上皮細胞純度について両群間に統計学的な有意差はなかった。

〔 総 括 〕

ヒト皮膚線維芽細胞をフィーダー細胞とし医薬品を成分とした培地を用いる、異種由来成分を用いない安全な口腔粘膜上皮細胞の新規プロセッシング法を開発することができた。

論文審査の結果の要旨

培養口腔粘膜上皮細胞シートの作製方法の安全性を向上させるため、皮膚線維芽細胞をフィーダー細胞として、医薬品あるいはGMP準拠の製品を培地成分とした新規作製法を開発した。

X線処理したヒト皮膚線維芽細胞およびNIH/3T3細胞をフィーダー細胞とし、温度応答性培養皿上で3名の健常ボランティアから採取した口腔粘膜上皮を培養した。培地成分には研究用試薬の代わりに同一成分の医薬品あるいはGMP準拠の製品を用いた。まずフィーダー細胞の評価としてRT-PCRによって、上皮幹細胞の維持、増殖に必要な遺伝子を両フィーダー細胞が発現していることを確認した。またフィーダー活性の評価としてコロニー形成試験によって両フィーダー細胞によってコロニーを形成することを確認した。両フィーダー細胞によって培養した上皮細胞シートはヘマトキシリンエオジン(HE)染色による組織学的検討、免疫組織染色による各種マーカーの発現解析によって発現のパターンが同等であることを確認した。またシートに含まれる細胞の生細胞率および上皮細胞純度は同程度であった。

この報告により、培養口腔粘膜上皮細胞シートの作製方法の安全性が飛躍的に向上すると考えられ、学位論文に値する。