



Title	集密的な条件下で培養したヒト網膜色素上皮細胞の挙動解析に基づく成熟化の促進に関する研究
Author(s)	園井, 理恵
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/59596
rights	
Note	

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

氏 名 (園 井 理 恵)

論文題名

集密的な条件下で培養したヒト網膜色素上皮細胞の挙動解析に基づく成熟化の促進に関する研究

論文内容の要旨

第1章 集密的な条件下で培養した細胞挙動の把握の重要性：網膜色素上皮細胞 (Retinal pigment epithelial cell, RPE細胞) は、緊密な敷石状の形態を維持するために、集密的な条件下で培養する。これまでに、RPE特異的な分化マーカーを用いて、集密的に培養した細胞の特性が、位置的に不均一であることが報告されてきた。しかしながら、このような集密的な条件下のRPE細胞の特性や挙動を時空間的かつ定量的に検討した報告は少ない。

第2章 集密的な条件下で培養した網膜色素上皮細胞の未成熟逸脱細胞の定量的な解析：本章では、成熟化に伴う形態学的な特徴を把握するために、集密的な条件下で培養したRPE細胞のZO-1と細胞核の染色画像を用いて時間依存的な解析をした。その結果、高密度かつ積層していない領域では、細胞が成熟に達していることがわかった。

第3章 集密的な条件下で培養した集団倍加回数の異なる網膜色素上皮細胞の定量的な解析：本章では、集密的な培養条件下で培養した集団倍加回数 (PD) の異なる網膜色素上皮細胞の定量的な解析を行った。その結果、敷石状を示す細胞 (I型) が減少するとともに、ドーム状 (II型)、大きな細胞 (III型)、積層した細胞 (IV型) が増加し、4つのタイプが出現した。 $PD = 5.6$ では、培養経過とともに、II型の細胞が培養面から剥離し、周囲の細胞が活発な増殖と遊走を示した。その後、この細胞は成熟せず、III型になることがわかった。これらの結果から、RPE細胞が成熟するためには、集密的な条件下で培養することが重要であり、培養環境が、RPE細胞の特性や挙動に重要な影響を及ぼすことがわかった。

第4章 動きの変化による網膜色素上皮細胞の位置的不均一性：本章では、細胞挙動を通じて培養容器中心と端領域でのRPE細胞の特性を遡及的に理解することを試みた。RPE細胞の成熟化における挙動を把握するために、容器中心と端領域の細胞のタイムラプス観察とZO-1染色を同じ箇所で行ったところ、RPE細胞は、成熟化とともに細胞が小さくなりながら、遊走速度の低下を示し、緊密な敷石状の形態を示すことがわかった。容器の中心と端領域の細胞の遊走速度を比較したところ、 $5.0 \mu\text{m/h}$ 以下を示す細胞が、容器の中心領域では、端領域の1.4倍高かった。これらの結果から、細胞の動きが、RPE細胞の成熟化に影響を及ぼす因子であり、容器内でのRPE細胞の不均一な成熟化を引き起こすことがわかった。

第5章 協調的集団運動による網膜色素上皮細胞の均一な成熟化の促進：容器内の未成熟細胞は、活発な遊走を示した一方、成熟細胞は、協調的集団運動と中心方向を示す協調的な集団運動を示し、容器内の成熟化は不均一であった。動きをそろえるために、遊走阻害剤であるRac1阻害剤を暴露したところ、容器内の細胞の動きが、集密的集団運動から中心方向を示す協調的な集団運動へ転換し、成熟化を均一に促進することがわかった。

第6章 総括：本研究で得られた結果は、再生医療製品製造に用いる評価手法としての展開だけでなく、動きによる細胞特性の制御という新しい戦略を提案している。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (園 井 理 恵)			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	教授	紀ノ岡 正博
	副 査	教授	福崎 英一郎
	副 査	教授	渡邊 肇
	副 査	教授	村中 俊哉
	副 査	教授	金子 嘉信
	副 査	教授	大政 健史
	副 査	教授	清水 浩
	副 査	教授	藤山 和仁
	副 査	教授	仁平 卓也
	副 査	教授	永井 健治
論文審査の結果の要旨			
培養細胞は、気相・液相・固相から生物学的及び物理化学的な影響を受けており、その刺激に応じて細胞挙動や特性が変化し、細胞接着の様式に従って適切に制御される。上皮細胞では、活発な増殖と遊走を示しながら、初期の細胞間接着を形成し、集密的な状態に達する。この時、細胞は、細胞－基質間接着主体の状態から細胞－細胞間接着を主とする状態に変化し、細胞の増殖性は停止する（接触阻害）。細胞間接着の形成とともに、細胞が小さく緊密になりながら、敷石状の形態を示し、細胞間接着の維持を可能としたゆっくりとした動きになることが知られている。さらに、集密的な条件下の細胞集団内を空間的に把握した時、集団内の位置によって、接着、形態、遊走、分裂のような細胞挙動や特性が異なることが知られていることから、それらを時空間的に理解することは、培養手法の改善につながる。これまでに、培養細胞の特性を評価するために、免疫染色法または PCR 法のような侵襲的な手法やタイムラプス観察または代謝産物の解析のような非侵襲的な手法が利用されてきた。特に、免疫染色法は、1 細胞レベルで細胞の特性を評価でき、広範囲のタイムラプス観察は、非侵襲的かつ時空間的にデータを取得できることから、このような手法は、時空間的な細胞の特性や挙動の把握を可能とする。 網膜を構成する網膜色素上皮細胞（Retinal pigment epithelial cell, RPE 細胞）は、緊密な敷石状の形態を維持するために、集密的な条件下で培養される。これまでに、RPE 特異的な分化マーカーを用いて、集密的に培養した細胞の特性が、位置的に不均一であることが知られている。しかし、このような集密的な条件下の RPE 細胞の特性や挙動を時空間的かつ定量的に検討した報告は少ない。本博士論文では、RPE 細胞を集密的な条件下で培養し、その細胞の特性や挙動の変化を調べ（第 2 章及び第 3 章）、その解析データに基づいて、成熟化には動きが重要であることを明らかにし（第 4 章）、その動きを用いて、成熟化を促進させることを示した（第 5 章）。 以上のように、本論文は、網膜色素上皮細胞の成熟過程を把握し、その知見に基づく成熟過程の促進を実現したものであり、その成果は、生命先端工学の発展に大きく寄与することが大きい。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。			