

学位論文要旨

氏名 三谷 亜里沙

論文名 ドキシサイクリン誘導性 SV40 大型 T 抗原導入細胞を用いた
ヒト不死化結膜上皮細胞株の作製と評価

学位論文要旨

学位論文の要約

【背景】ドライアイは、眼不快感のみならず視機能異常をもたらすことが明らかになっており、日本での患者数は約 2,200 万人とも推定される。患者数は今後も増加することが予測され、病態解明と共にさらなる治療法の開発が望まれる。ドライアイの病態には涙液の不安定化が深く関与しており、その安定化にはムチンが重要な役割を担っている。眼表面における膜型ムチンは角結膜上皮細胞に存在する MUC1、MUC4、MUC16 などが知られ、結膜杯細胞は分泌型ムチンである MUC5AC を産生、分泌する。しかし、結膜上皮細胞の機能についてはまだ不明な点も多い。その一因に、適切な結膜上皮細胞株が存在しないことが挙げられる。一般に、正常結膜上皮細胞の長期間培養は困難であり、細胞の増殖能維持のため Simian Virus 40-大型 T 抗原 (SV40LT) 遺伝子導入などが用いられてきた。しかし SV40LT を導入した細胞は、高い増殖活性がある一方、細胞が本来有している分化形質を消失することが認められている。この SV40LT 発現抑制により、分化誘導が促進される可能性があるが、これまでに発現の制御が可能な結膜上皮細胞株の報告はない。

【目的】ドキシサイクリン (Dox) の有無で SV40LT 遺伝子の発現が制御できる誘導性 SV40LT 導入ヒト不死化結膜上皮細胞を作製し、増殖能および分化能について明らかにする。

【方法】

(1) ヒト不死化結膜上皮細胞 (iHCjEC) の作製

ヒト結膜上皮細胞は、結膜弛緩症の術中に切除された余剰組織を用いた。本研究にあたり、愛媛大学倫理審査委員会にて承認を得ている (承認番号 1407002)。得られた正常結膜上皮細胞に Dox 誘導性 SV40LT 遺伝子を有するレンチウイルスベクターを導入し、不死化を誘導した。Dox 誘導性 SV40LT 遺伝子は、SV40LT の上流にテトラサイクリン応答因子 (TRE) が導入され、

氏名 三谷 亜里沙

Dox 存在下で TRE の転写を誘導するリバーステトラサイクリン制御性トランス活性化因子 (rtTA) はその逆向きになるよう形で設計されているものを使用した。

(2) 細胞の評価

- I. Dox 存在下と非存在下における SV40LT の発現をウエスタンブロット法にて調べた。
- II. 増殖能評価の為、iHCjEC を培養後、細胞数を血球計算板で計測し、増殖曲線を作製した。
- III. iHCjEC をサブコンフルエント (12 継代目) で Dox 不含有無血清培地 (Dox-) または 5% 血清入り培地 (Dox-/FBS+) に交換し、5 日間培養した。結膜上皮特異的マーカー (サイトケラチン 13) およびムチン (MUC1、MUC4、MUC16) の発現をリアルタイム PCR により検討した。
- IV. 上皮細胞と実質細胞との相互作用を検討するため、ウサギ結膜実質由来線維芽細胞をコラーゲンゲル内で培養し、ゲル上にて iHCjEC を三次元培養した。培養液中の Dox 有無及び血清添加の違いによる影響について、CK13 および MUC1 の糖鎖抗原である KL-6 の免疫組織化学的検討を行った。

【結果】 ウエスタンブロット法にて、Dox 存在下では SV40LT の発現が常に認められ、Dox 非存在下では SV40LT の発現が経時的に減少した。このことから、iHCjEC は Dox の有無により、SV40LT 遺伝子の発現がコントロールできる細胞株であることが確認された。Dox 存在下において、細胞倍加時間は約 10.8 時間であり、少なくとも 20 継代以上の培養が可能であった。リアルタイム PCR による検討では、Dox-群では Dox+群に比べ、CK13、MUC4 の発現が亢進し、Dox-/FBS+群では、CK13、MUC1、MUC4、MUC16 の発現亢進が認められた。また、三次元培養において、全ての培養条件で iHCjEC の重層化が確認され、さらに Dox+群では CK13 の発現が認められなかったのに対して、Dox-群および Dox-/FBS+群では発現が確認された。KL-6 は Dox の有無に関わらず発現を認めた。

【考察】 本研究では、Dox の有無で SV40LT 遺伝子の発現が制御できる誘導性 SV40LT 導入不死化ヒト結膜上皮細胞を作製した。この細胞株は、Dox 存在下では SV40LT が誘導され、高い増殖能を維持し長期間の培養が可能であった。一方 Dox 非存在下では、結膜上皮細胞特異的マーカーである CK13 の発現が亢進し、さらに 5%血清を添加した群ではムチンの発現が亢進したことから、SV40LT 発現抑制下において、成熟した結膜上皮細胞への分化が促進されると推測された。これにより、機能的に分化した結膜上皮細胞を安定して用いる実験が可能になると考えられる。今後さらに培養法の改良を加え、本研究で作製した不死化細胞が、結膜上皮の機能解明や新規治療薬の開発に大きく貢献することが期待できる。

キーワード (3~5)	ヒト結膜上皮細胞株 サイトケラチン 三次元培養	ドキシサイクリン誘導性SV40大型T抗原 ムチン
-------------	-------------------------------	-----------------------------