

学位論文審査結果の要旨

氏名	三谷 亜里沙
審査委員	主査 松田 正司 副査 北澤 荘平 副査 矢野 元 副査 村上 正基 副査 吉田 素平

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

審査結果の要旨

【研究開始当初の背景と目的】

ドライアイは、涙液の減少や質的变化によって涙液層が不安定になり、眼精疲労や実用視力の低下など生活の質を著しく低下させる。このインターネット社会のなか、VDT(Visual Display Terminals)作業時間は増える一方であり、ドライアイ患者数は年々増加、有病者は 2200 万人程度存在すると推定され、決して軽視できない疾患となっている。近年、ムチンによる粘膜バリアの役割が明らかにされつつあり、ドライアイの臨床的観点からもその重要性が指摘されている。結膜上皮は、ムチン分泌による粘膜バリア形成、イオンチャネル・ポンプの発現による涙液量コントロールの両面において重要な役割を担うと考えられ、臨床的観点からもその重要性が指摘されている。しかし、適切な結膜上皮培養細胞が存在しないために、詳細な検討が困難な現状がある。今後、長期間増殖可能でかつ結膜上皮の特徴・分化能を保持した細胞株の樹立が可能になれば、結膜上皮細胞の分子細胞レベルでのメカニズムや病態解明、治療薬開発が飛躍的に進むことが期待できる。本研究では、ドキシサイクリン(Dox)の有無で SV40 大型 T 抗原(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の作製を行い、その増殖能について検討した。さらに、上皮細胞と実質細胞を 3次元で共培養する 3次元培養システムを結膜上皮の培養に応用し、結膜上皮特有の分化能を保持しているかについて明らかにした。

【研究の方法と成果】

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、Dox 誘導性 SV40LT 遺伝子を導入し、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) を導入し、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) を組み込むことによって Dox の有無で SV40LT 遺伝子の発現を制御できるようにしたものを用いた。Western Blotting 法にて、iHCjEC の Dox 有無による発現変化を検討したところ、Dox 存在下では SV40LT の発現が認められ、Dox 非存在下では SV40LT の発現が経時的に減少した。Dox 存在下では iHCjEC は高い増殖能を長期間維持できることが確認でき、現時点で少なくとも 25 継代以上の培養が可能であった。リアルタイム PCR により Dox 群では Dox+ 群に比べ、CK13、MUC4、MUC16 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。全ての培養条件において iHCjEC の重層化が確認できた。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。

【得られた成果の国内外における位置づけとインパクト】

本研究では Tet-On システムを応用し、ドキシサイクリン (Dox) の有無で simian virus 40 大型 T 抗原 (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の作製に成功した。この不死化培養細胞では、Dox 存在下で SV40LT が誘導され長期間の培養が可能となる一方、Dox 非存在下ではその発現が抑制され、正常結膜上皮と同様の分化形質を発現することが期待できる。本細胞は、Dox 存在下で少なくとも 25 継代以上培養可能であり、Dox 非存在下で SV40LT の発現が抑制されることが確認された。また我々の教室では角膜上皮の基礎研究において 3次元培養システムを用いており、上皮細胞と実質細胞を 3次元で共培養することで、それぞれの細胞が生体と類似した挙動を示すことを証明してきた。この技術を結膜上皮の培養に応用することにより正常結膜に類似した環境で分化誘導を行ったところ、重層化した結膜上皮細胞が得られ、また Dox 非存在下では、結膜上皮細胞の分化マーカーであるサイトケラチン (CK) 13 の発現が亢進し、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。さらに、ムチン (KL-6) の発現も確認でき、誘導性 SV40LT 導入不死化結膜上皮細胞は、高い増殖能と共に分化能を有することから、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。

公開審査会は、令和元年 7 月 23 日に開催され、申請者は、研究内容を英語で明確に発表した後に、審査員から本研究に関する以下の質問がなされた。結膜初代培養と継代の困難な点、生体モデルの可能性、角膜培養との相違、不死化細胞の分化度、細胞内小器官の形態、FBS の細胞毒性、コラーゲンゲルと羊膜利用、クローン化の可能性、本研究の最終目的、ドライアイのタイプ、ドライアイ関連物質、ドライアイの地域差と性差、細胞株樹立の改良点と将来展望等、多くの質問が出されたが、申請者はこれらの質問に的確に回答した。審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。