







学位論文審査の結果及び最終試験の結果の要旨

学位申請者氏名	李 妮		
学位論文名	Characterization of spontaneous spheroids from oral mucosa-derived cells and their direct comparison with spheroids from skin-derived cells (口腔粘膜由来細胞から形成された自発的スフェロイドの特性評価と皮膚由来細胞によるスフェロイドとの比較)		
論文審査委員	主査:	松本歯科大学 教授	平賀 徹 
	副査:	松本歯科大学 教授	川原一郎 
	副査:	松本歯科大学 講師	小出雅則 
	副査:		
	副査:		
	副査:		
最終試験	実施年月日	2019 年 12 月 12 日	
	試験方法	□答 ・ 筆答	
学位論文の要旨			
<p>【目的】 皮膚由来のスフェロイド形成細胞は、多能性を有することが知られている。同様に、口腔粘膜由来のスフェロイド形成細胞も、体性幹細胞の優れた細胞源であることが報告されている。われわれは、約 90 度の接触角を有する特殊な低接着性培養ディッシュを用いることで、自発的にスフェロイドが形成されることを発見した。本研究では、この方法を口腔粘膜由来細胞に応用した。はじめに、口腔粘膜由来細胞を用いて自発的スフェロイド形成を試みた。次に、口腔粘膜細胞および皮膚由来細胞による自発的スフェロイドを用いて、その幹細胞性と神経分化能を検討した。</p> <p>【材料と方法】 口腔粘膜由来細胞は、C57BL/6J マウスの口蓋および頬粘膜より通常の組織片培養によって得た。同様に、皮膚細胞は同系マウスの背部皮膚より組織片培養によって得た。細胞は通常の培養ディッシュにて平面培養を行い、2～3 継代目の細胞を実験に用いた。細胞をスフェロイド形成用培養ディッシュへ播種することで、スフェロイドを形成させた。はじめに線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、上皮細胞成長因子 (EGF)、B27 サプリメントがスフェロイド形成と維持に与える影響を検討した。次に自発的スフェロイドを用いて、多能性幹細胞マーカー、細胞分裂マーカー、アポトーシスマーカーの発現を、免疫蛍光法および定量的 PCR (qRT-PCR) にて解析した。さらにスフェロイド形成細胞の機能を解析するため、細胞を通常の培養ディッシュに播種後 7 日間神経分化誘導培地にて培養を行い、神経分化マーカーの発現を免疫蛍光法および qRT-PCR にて解析した。</p> <p>【結果】 スフェロイド形成用の特殊な培養ディッシュを用いることで、口腔粘膜由来細胞から自発的スフェロイドが形成された。bFGF、EGF、B27 サプリメントはスフェロイド形成効率を改善したが、スフェロイド形成に必須ではなかった。一方、スフェロイドの維持にはこれらの添加因子が必要であった。この結果は、添加因子を含まない培地で培養されたスフェロイドにおいて、添加因子を加えた培地で培養されたスフェロイドと比較して、Caspase7 の高発現が見られたことで確認された。口腔粘膜由来細胞からのスフェロイドは、幹細胞マーカーである Sox2, SSEA1, Oct4, Nanog, Nestin を発現していた。Sox2 は、皮膚細胞由来スフェロイドと比較して、口腔粘膜細胞由来スフェロイドで有意に高発現していた。口腔粘膜細胞およ</p>			

(様式第 13 号)

び皮膚由来細胞によるスフェロイドは、神経分化誘導後いずれも神経細胞およびシュワン細胞に分化する能力を持っていたが、MAP2, MBP, Nestin, Nurr1 の発現は口腔粘膜由来細胞によるスフェロイドで有意に高値であった。

【結語】

本研究の結果から、口腔粘膜由来のスフェロイドは、皮膚細胞由来のスフェロイドと同様に高い可塑性を有する幹細胞を含むことが示された。ドーパミン産生ニューロンのマーカーである Nurr1 を含む複数の神経分化マーカーは口腔粘膜細胞由来スフェロイドで高発現しており、口腔粘膜由来細胞の神経変性疾患治療への有用性を示すものと考えられた。

学位論文審査結果の要旨

本論文は、口腔粘膜由来細胞と皮膚由来幹細胞から、申請者らによって独自に開発された自発的スフェロイド形成法を行い、得られたスフェロイド中の幹細胞の性質と機能を解析したものである。形成されたスフェロイドは高い幹細胞性を示し、特に口腔粘膜由来幹細胞では神経系細胞への優れた分化能を示した。本研究の結果は、臨床的に容易に採取可能な口腔粘膜が優れた再生医療のための細胞源となることを示したものである。また、得られた幹細胞は、神経変性疾患など今後開発が期待される再生医療分野への応用の可能性を示した点で画期的である。よって審査委員会の委員全員の一致した意見として、本論文が著者に博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値あるものと判断した。

最終試験結果の要旨

申請者の学位論文を中心に、本研究に関する基礎知識・論文内容・研究成果および今後の展開などについて以下の質問を行った。

1. 本研究で用いたスフェロイド形成法の利点について。
2. ヒトの細胞での検討は行ったか。
3. SOX2 の神経分化に対する関与について。
4. スフェロイド細胞の多分化能について。
5. 約 90 度の接触角が良い理由について。
6. 各細胞マーカーの意味について。
7. スフェロイドが形成されたのち増殖しない理由について。それによる臨床応用への問題点について。
8. 本研究での可塑性の意味について。

上記の全ての質問に対し、申請者は最新の文献的知見も踏まえ適切に回答した。また申請者は、実験により得られた結果に対して適切な考察が行える専門知識を有しており、博士課程修了者としての十分な学力及び見識を有するものと認め、最終試験を合格と判定した。

判 定 結 果

合格

・

不合格

備考

- 1 学位論文名が外国語で表示されている場合には、日本語訳を（ ）を付して記入すること。
- 2 学位論文名が日本語で表示されている場合には、英語訳を（ ）を付して記入すること。
- 3 論文審査委員名の前に、所属機関・職名を記入すること。