

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性質の違い

李 妮

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座
(主指導教員：各務 秀明 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士（歯学）学位申請論文要旨

Characterization of spontaneous spheroids from oral
mucosa-derived cells and their direct comparison with
spheroids from skin-derived cells

NI LI

*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University
(Chief Academic Advisor : Professor Hideaki Kagami)*

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

【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比較した。

【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。

【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、Caspase 7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。