

論文内容の要旨

論文提出者	瀬尾 皓
論文題目	Formation of keratinocyte multilayers on filters under airlifted or submerged culture conditions in medium containing calcium, ascorbic acid, and keratinocyte growth factor
<p>(論文内容の要旨)</p> <p style="text-align: center;">研究目的</p> <p>従来のKC3次元培養法は、線維芽細胞含有ゲルが用いられており、線維芽細胞や血清由来の未知の因子による影響が考えられる。そこで我々は、線維芽細胞含有ゲルや血清を用いずにinsert膜上に直接KCを播種し、完全合成培地にcalcium (Ca), L-ascorbic acid phosphate magnesium salt n-hydrate (APM), keratinocyte growth factor (KGF)を種々の組み合わせで添加した計8種類の培地を使用し、これら3因子の役割を組織学的に再評価することを目的とした。</p> <p style="text-align: center;">材料および方法</p> <p>ヒト表皮由来のKCをinsert上に播種し、2日間培養した。コンフルエントを確認後、気液界面及び液浸培養を行った。気液界面培養で使用した分化培地は、完全合成培地にCa, APM, KGFを種々の組み合わせで添加した計8種の分化培地を使用した。気液界面培養後1, 2, 3週間で固定・包埋し、凍結切片を作製した。液浸培養で使用した分化培地は、完全合成培地にCa+APM+KGFを添加したものを使用した。insert内にも分化培地を入れて1, 2週間で固定・包埋し、凍結切片を作製した。これらを抗Keratin(K)1, K2, K4, K5, K10, K13, K14, Ki67, Involucrin(Inv), Integrin β4(Int β4)抗体による蛍光免疫染色およびヘマトキシリン・エオシン染色により形態学的に検証した。</p> <p style="text-align: center;">結果</p> <p>①重層化にはCaが必須であることがわかった。②CaまたはAPMを単独で加えると、3週でKi67陽性反応は消失し、K, Inv, Int β4の局在パターンが不均一となった。③KGFを添加すると、Ki67陽性の基底細胞が維持された。さらにAPMを添加すると、基底細胞の形態やケラトヒアリン顆粒、Invの局在などの組織構造が著しく改善された。液浸培養でも重層化が見られたが、その角質層には核がしばしば認められ、そこにInvが局在していた。</p> <p style="text-align: center;">考察および結論</p> <p>これらの結果より、三次元培養法で皮膚に類似した角化重層扁平上皮を得るには、calcium, APM, KGFを添加した分化培地で気液界面培養する方法が最も適切であることが分かった。液浸培養でも、類似の構造が得られたが、角質層に核が散在し、Invが局在するなど表皮との構造の違いが見られた。</p>	