

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

論 文 提 出 者	足立 圭亮
論 文 審 査 委 員	(主 査) 朝日大学歯学部 教授 村松 泰徳 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 柏俣 正典 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 永山 元彦 (外部審査) 明海大学 教授 坂上 宏
論 文 題 目 胎仔マウス顎下腺原基の器官凍結保存法の開発	
<p><u>論文内容の要旨</u></p> <p>【目 的】</p> <p>再生医療を含め、移植医療では臓器や組織の長期的保存を目的として凍結保存が検討されている。しかし、いまだに確立された方法が少なく、検討が急がれる。細胞の凍結保存は古くから検討され、特に受精卵に関しては実際に臨床応用されている。細胞を凍結すると、損傷を受けて活性が失われる。これは凍結時に水分子の氷晶化が原因で細胞膜を傷害 (凍害) するためであり、これを低減する目的で凍結保護剤が用いられている。基礎研究領域で多用されている緩慢凍結法は、凍結保護剤中の細胞を超低温フリーザーまたはプログラムフリーザーで凍結保存する方法である。</p> <p>現在の口腔領域の主な疾患に対する治療部位の中で、歯牙・顎骨等の硬組織やそれに付属する周囲軟組織は、器質的に一部分を失っても代替治療が存在するため、患者の Quality of Life (QOL) の低下は最小限に留められる。しかし唾液腺は、機能の低下・喪失に対する効果的な治療法がなく、QOL の回復に移植医療や再生医療に頼らざるを得ない。唾液腺の再生医療の開発は必要であり、その基礎的な知見を集約するために唾液腺の凍結保存は検討する価値があると考えられる。</p> <p>唾液腺は胚発生中の上皮の枝分かれ反応を繰り返し起こすことによって形態形成を進行させる。この枝分かれ反応は分枝形態形成 (Branching Morphogenesis: BrM) と呼ばれており、上皮の切れ込み反応と芽状突起の伸長反応の 2 つで構成されている。顎下腺の分枝形態形成を促進する因子の 1 つに Epidermal Growth Factor (EGF) がある。EGF は細胞膜に存在する EGF 受容体と結合することで細胞内のシグナル伝達系 (Mitogen-activated Protein Kinase: MAPK (ERK1/2), PI3K-AKT) を活性化させ、これらのシグナルタンパク質がリン酸化することにより、BrM が引き起こされると考えられている。</p> <p>本研究は胎仔マウス顎下腺原基 (以下顎下腺原基) を用い、分枝形態形成およびその下流シグナルを観察することで機能を保持した凍結保存が可能かどうかを検討した。</p>	

【材料および方法】

ICR 系統妊娠マウスから、胎生 13 日齢の顎下腺原基を採取し DMEM/F12 に 24 時間 4°C で保存し器官培養したものを対照群とした。凍結群として DMEM/F12 だけを使用した群、10% dimethyl sulfoxide 含有 DMEM/F12 (10%DMSO)を使用した群、TC Protector® (TC)を使用した群、および CELLBANKER™1® (CB)を使用した群 に顎下腺原基を浸漬した。凍結方法はサンプルボックスで保存するものを急速凍結、Mr. Frosty®で保存するものを緩徐凍結と設定し、-80°Cで凍結させた。そして 24 時間後 37°Cで温めた DMEM/F12 を直接チューブ内に添加して解凍し、シャーレ上でさらに DMEM/F12 で洗浄した顎下腺原基を器官培養した。培養後、0, 24, 48, および 72 時間で実体顕微鏡にて形態を観察した。培養後 72 時間で上皮の分枝数(bud numbers)と上皮の面積(area)を計測し、統計処理を行った。

シグナル伝達系の解析のため、採取した顎下腺原基を DMEM/F12 で 4°C, 24 時間保存したものを対照群とし、CB と Mr. Frosty®を用いて-80°C, 24 時間凍結保存したものを凍結群とした。24 時間後、先の方法と同様に解凍・洗浄し、さらに 24 時間器官培養後、20 ng/ml EGF で 0, 10, および 30 分間刺激した。刺激後顎下腺原基を回収し、ホモジネートを作製して Western Blotting (WB)解析を行った。なお、一次抗体として抗 phospho-ERK1/2 抗体、抗 total-ERK1/2 抗体および抗 phospho-AKT 抗体、抗 total-AKT 抗体を用いた。

【結 果】

対照群の顎下腺原基を器官培養した結果、BrM が認められた。DMEM/F12 中で凍結した顎下腺原基は、凍結保護剤を含んでいないため凍害が著しく、BrM は全く観察されなかった。10%DMSO 中で凍結した顎下腺原基は、凍害による影響は受けたが、一部の上皮に発育が認められた。TC 中で凍結した顎下腺原基は、10%DMSO 群より活発な BrM が認められた。CB 中で凍結した顎下腺原基は、他のどの凍結群よりも活発な BrM が認められた。凍結速度の比較では急速凍結と緩徐凍結の間で有意差は認められなかった。

WB の結果において、対照群と CB 凍結群で ERK1/2 と AKT 両者共に EGF 添加 10 分後の顕著なリン酸化の亢進を認め、30 分後には減弱した。凍結の有無に関わらず、ERK1/2 と AKT の発現量に変化はなかった。

【考察および結論】

今回の研究において顎下腺原基を凍結するにあたり、用いた凍結保護剤の中では CB が適切であると考えられる。凍結速度の比較では急速凍結と緩徐凍結の間で有意差は認めなかったが、緩徐凍結の群がより凍害が少ない傾向にあり、組織保護に有利に働く可能性がある。また対照群と CB 凍結群において EGF 投与に対する ERK1/2 と AKT の応答性が類似していたことから、凍結後の顎下腺原基では細胞内のシグナル伝達系は機能保持されていたと考えられる。以上の結果から、胎仔マウス顎下腺原基は器官として凍結保存できる可能性が示唆された。