

学 位 論 文 審 査 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>論文審査の要旨</u></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が、いまだに確立された方法が少なく、検討が急がれる。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。</p> <p>ヒト唾液腺は、疾患による機能の低下・喪失に対する効果的な治療法がなく、口腔内の Quality of Life 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>胎仔マウス顎下腺は分枝形態形成 (Branching Morphogenesis: BrM) と呼ばれる上皮の切れ込み反応と芽状突起の伸長反応の 2 つで構成されており、それらの反応を促進する因子の 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> <p>実験は、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、試料として用いた。対照群は未凍結の顎下腺原基を、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、-80℃で凍結保存した。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した。24 時間後、37℃で温めた DMEM/F12 を直接チューブ内に添加して解凍・洗浄した顎下腺原基を器官培養した。またシグナル伝達系の解析のため、未凍結の顎下腺原基は対照群とし、CB と Mr. Frosty®を用いて保存した顎下腺原基は凍結群とした。上述の方法と同様に解凍・洗浄処理し、24 時間器官培養後 EGF でそれぞれの顎下腺原基を処理した後、Western Blotting を用いて BrM と深い関与がある ERK1/2 と AKT を解析した。</p> <p>これらの結果から、未凍結の顎下腺原基では BrM が認められた。凍結保護剤を含めずに凍結させた群は、BrM が全く観察されなかった。しかし、10% DMSO 群、TC 群、CB 群では BrM が観</p> | |

察された。3つの群の中ではCB群の顎下腺原基がより凍結による障害を緩和されていた。シグナル伝達系の解析結果では、未凍結群と凍結群の間でERK1/2とAKTのEGF応答性に有意な変化は認められなかった。

以上のことより、胎仔マウス顎下腺原基は器官として機能を保持した状態で凍結保存が可能であり、本研究は将来的に器官・臓器の凍結保存に有効な手法であることが示唆された。

よって審査委員は、本論文を博士（歯学）の学位を授与するに値すると判定した。