

胎仔マウス顎下腺原基の
器官凍結保存法の開発

あだち けいすけ
足立 圭亮

本論文の要旨は第213回朝日大学大学院歯学研究科発表会(2018年10月24日, 岐阜)において発表した。
本論文の一部は, 第60回歯科基礎医学会学術大会(2018年9月5日, 福岡), 第55回日本口腔組織培養学会(2018年11月10日, 兵庫)において発表した。

緒 言

再生医療では摘出した組織や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) から構築した器官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、現在適応は限られており、凍結の有用性については不明なことが多い。一方、単離細胞などの凍結保存技術は目まぐるしく進歩しており、医療においては生殖細胞の凍結保存、畜産においては種の保存のために利用されている¹⁻⁷⁾。

一般的に細胞を無処理で凍結した場合、細胞内外の水分子が結晶化し、細胞膜などの細胞構造が物理的に破壊されてしまうため生存することができない^{5, 8, 9)}。凍結保護剤は、凍結時の細胞構造の破壊を抑制する薬剤であり、その主な成分は dimethyl sulfoxide (DMSO)、グリセロール、ショ糖、ポリエチレングリコールなど多種存在し、凍結に用いる細胞によって組成が異なる⁸⁾。凍結保護剤は高い溶質濃度による浸透圧から、細胞に対して強い障害性がある⁵⁾。凍結保護剤に細胞を懸濁し保存する場合、迅速に -80°C 以下で凍結させる必要がある。

現在、一般的な凍結方法は細胞を凍結保護剤に懸濁させ、超低温フリーザーまたは磁場環境下プログラムフリーザー (CAS フリーザー)^{10, 11)}を用いた冷凍保存によって行われる (緩慢凍結法)^{5, 8)}。また、凍結後

の細胞を長期保存する場合，液体窒素内に移すことも行われている．緩慢凍結法で保存が困難な細胞に対しては，高濃度の DMSO，アセトアミド，プロピレングリコールなどを組み合わせた溶液で液体窒素により急速に凍結する方法（ガラス化凍結法）が用いられる⁵⁾．桑山ら¹²⁾は卵子のガラス化凍結法を確立し，増田ら¹⁰⁾は CAS フリーザーを用いた歯髄細胞の凍結保存に一定の成果をあげた．

再生医療で課題となっているのが，iPS 細胞やヒト胚性幹細胞 (ES 細胞) では凍結保存後の生存率が低いという点である^{5, 9)}．それらの細胞を凍結するのに適した凍結保護剤の開発が進んでいる．ヒト iPS 細胞や ES 細胞から器官・組織を構築し，移植することが再生医療の大きな目標である．現在，細胞シートやメッシュ状の人工心臓組織の開発の成功が報告されている^{13, 14)}．

歯科医療，特に口腔外科学分野における治療部位は，歯牙・顎骨などの硬組織と口腔内及び口腔周囲軟組織が挙げられる．それらの口腔組織の一部は，機能の低下や機能の喪失を伴った場合，効果的な治療法が行われている．しかし，唾液腺においては加齢や全身疾患，唾液腺疾患などで機能が極端に低下したり，あるいは唾液腺自体を失った場合，その後の治療で効果的な手段がなく，時に口腔乾燥症やそれに続発する口内炎などで治療に困窮することもある．その際，患者

の Quality of Life (QOL)の低下は避けられないため、唾液腺の移植・再生医療の発展が望まれる。基礎研究において、近年 Ogawa ら¹⁵⁾は胎生期のマウス顎下腺の未成熟な上皮細胞と間葉細胞から顎下腺を再建したのち、顎下腺欠損マウスに移植し、移植腺からの唾液の分泌に成功したことを報告した。このように唾液腺の再生治療は着実に進みつつある。一般的に幹細胞から器官を誘導するには時間を要すると考えられる。また、器官の凍結保存に関する研究は非常に少なく、確定したプロトコールもないのが現状である。したがって再生器官の凍結保存が可能になれば、移植治療の効率が上がり、その有用性は飛躍的に増すと思われる。

胎生マウス顎下腺原基は器官培養によって体外で維持することが可能である¹⁶⁻¹⁸⁾。マウス顎下腺原基の発生は胎生12日目に口腔底の上皮組織が頸部方向に陥没することから始まる。胎生13日目では顎下腺原基はおよそ500 μm の楕円体をしており、分枝形態形成(branching morphogenesis)とよばれる上皮組織の先端の「枝分かれ反応」と「伸長反応」の繰り返しにより、急速に腺体が形成される¹⁹⁻²¹⁾。分枝形態形成は顎下腺原基を無血清培地に浮かべたフィルター上に静置し、器官培養をしても観察することができる²²⁻²⁵⁾。

顎下腺原基を構成する上皮細胞は、細胞成長因子や細胞接着因子等からの刺激を受けることにより分枝形

態形成を促進させていく。Kashimata ら^{23, 24)}は上皮成長因子 (epidermal growth factor: EGF) が顎下腺上皮の枝分かれ反応 (小葉形成) を強く促進することを, Hoffman ら²⁶⁾は線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor: FGF) が伸長反応を促進することを明らかにしている。EGF や FGF は, 顎下腺原基の間葉から分泌され, 顎下腺上皮に存在するそれぞれの受容体と結合した後, 細胞内情報伝達経路の mitogen-activated protein kinase (MAPK) や phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-AKT を活性化する。EGF のように細胞増殖や分化を誘導する細胞成長因子は, 古典的 MAPK の 1 つである extracellular responsible kinase-1/2 (ERK1/2) が, その作用を伝達すると考えられている^{24, 27-30)}。

著者は, 胎仔マウスの顎下腺原基を種々の凍結保護剤とともに凍結保存し, 解凍後の顎下腺原基を器官培養することによって形態学的変化が生じているのか否か, また凍結後の培養顎下腺原基に EGF を作用させた時に誘導される ERK1/2 と AKT のリン酸化状態を未凍結の顎下腺原基と比較することによって機能的な変化が生じているのか否かについて検討を行った。

材料および方法

1. 実験材料

顎下腺原基の凍結保護剤として，dimethyl sulfoxide (DMSO: 和光純薬工業，大阪)，TC Protector[®] (DS-ファーマバイオメディカル，大阪)および CELLBANKER^{TM1}[®] (日本全薬工業，福島)を用いた．一部の実験では凍結温度レートを調節するために，Nalgene[®] Mr. Frosty[®] Cryo 1°C Freezing Containers (Thermo Scientific, Waltham, USA)を用いた．EGFはR & D Systems Inc. (Minneapolis, USA)のものを使用した．

2. 顎下腺原基の摘出

顎下腺原基の摘出は過去の報告を参考に，一部変更して行った³¹⁾．すなわち，ICR系統妊娠マウス（日本SLC，浜松）をKN式炭酸ガス安楽死装置（夏目製作所，東京）により安楽死させ，子宮を取り出した．子宮は直ちに α -modification of eagle's medium（和光純薬工業，大阪）を含むシャーレに移し，子宮から胎仔を分離した．顎下腺原基は実体顕微鏡（島津製作所，京都）下で胎仔マウスから摘出した．なお，本研究の動物実験は朝日大学動物実験専門委員会の承認を得て実施した．（承認番号：18-007）

3. 顎下腺原基の凍結保存

摘出した胎仔マウス顎下腺原基を4種類の異なる媒体 ① Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12, 100 unit/ml ペニシリン, 100 µg/ml ストレプトマイシン (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 50 µg/ml トランスフェリン, および 150 µg/ml アスコルビン酸 (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) 含有 (DMEM/F12), ② 10% DMSO 含有 DMEM/F12 (10% DMSO), ③ TC Protector® (TC, 無血清タイプ), ④ CELLBANKER™1® (CB, 血清タイプ) に浸漬し, -80°C で 24 時間凍結した. 凍結の際には, 2つの異なる方法を用いた (方法 A: サンプルボックスを用いて保存 (以下急速凍結), 方法 B: Mr. Frosty®: -1°C/min を用いて保存 (以下緩徐凍結)). 対照群として凍結させずに DMEM/F12 中で 4°C, 24 時間保存したものを用いた.

4. 顎下腺原基の解凍

凍結 24 時間後, 37°C で温めた DMEM/F12 を保存チューブに添加し, ピペッティングにより攪拌することで顎下腺原基を急速に解凍した. その後, シャーレに移し, DMEM/F12 にて洗浄して凍結保護剤を除いた.

5. 顎下腺原基の器官培養

顎下腺原基の培養は過去の報告を参考に, 一部改変して行った^{30, 31}). すなわち, 解凍した顎下腺原基は

DMEM/F12 (400 μ l)に浮かべたフィルター (Nuclepore membrane, 0.1 μ m pore size; GE healthcare UK LTD, Amersham, UK)上に静置し, 37°C, 5% CO₂, 95% air, 湿度 80%環境下で培養した. 培養顎下腺原基は, 培養後 0, 24, 48 および 72 時間に実体顕微鏡 (オリンパス, 東京) 下で観察した. 培養後 72 時間で上皮の分枝数 (bud numbers)と上皮の面積 (area)を Image J (NIH, Bethesda, USA)を用い計測し, 統計処理を行った. なお, 処理の一連の流れを図 1 に示した.

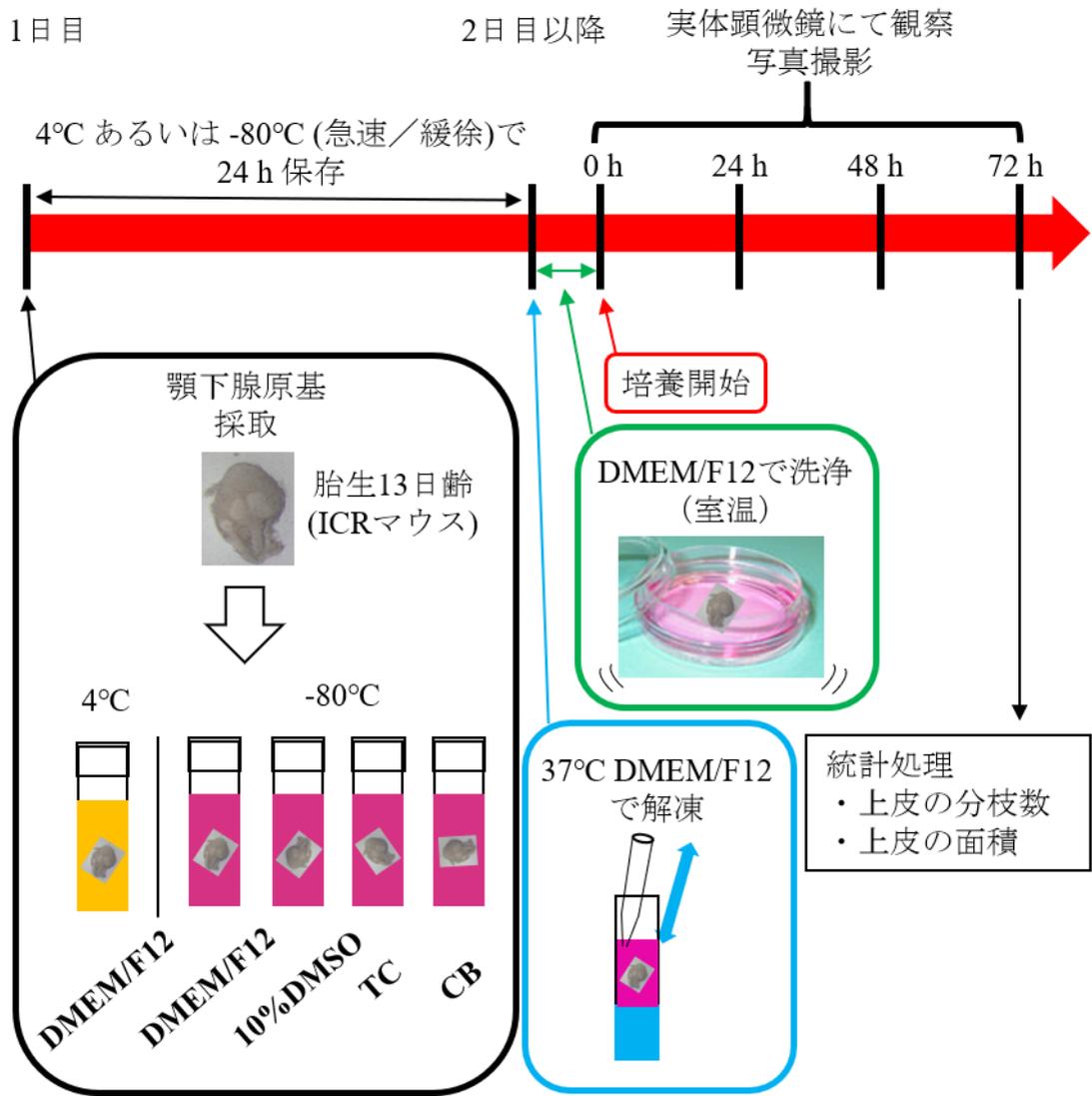


図1 胎仔マウス顎下腺原基の摘出・凍結・解凍・器官培養までの実験操作
 1日目, 胎仔マウス顎下腺原基を採取し, それぞれの凍結保護剤に浸漬, 表記の条件下で24時間保存した.
 2日目, 顎下腺原基を解凍・洗浄し, 器官培養を行った. 培養後0, 24, 48および72時間で形態形成の変化を写真に記録した.
 培養後72時間の写真を用い, 上皮の分枝数・面積を定量し, 統計処理を行った.
 急速=急速凍結, 緩徐=緩徐凍結
 TC: TC Protector, CB: CELLBANKER™1®

6. Western Blot による ERK1/2 と AKT の解析

胎生 13 日齢の胎仔マウス顎下腺原基を摘出後，2 つの異なる群 ① 4°C: DMEM/F12，② - 80°C: CB，緩徐凍結で 24 時間保存し，前述の方法と同様に解凍・洗浄し，24 時間器官培養を行った．その後，20 ng/ml EGF で 0，10，および 30 分間刺激した．Western Blot は過去の報告を参考に，一部改変して行った^{30, 31)}．すなわち，EGF 刺激後の顎下腺原基を 1 mM sodium orthovanadate と 1 mM PMSF (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) 含有 phosphate buffered saline (PBS) で 3 回洗浄して回収し，1 mM PMSF 含有 cell lysis buffer (Cell Signaling Technology, Danvers, USA) を用いてホモジネートを作製し，上清を得た．上清のタンパク質量は BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) を用いて定量し，一定量 (2 μg) のタンパク質を含む試料を電気泳動により分離した．この際 10% 濃度の Mini-PROTEAN® TGX™ Gels (Bio-Lad Laboratory Inc., Hercules, CA, USA) を使用した．泳動後，タンパク質を 0.2 μm ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜に転写 (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System: Bio-Lad Laboratory Inc., Hercules, CA, USA) し，5% BSA 含有 Tris-Buffered Saline (0.1% Tween 20 含有) (T-TBS) にて 1 時間室温でブロッッキング処理を施した後，PVDF 膜に 1 次抗体 (抗 phospho-ERK1/2 抗体，抗 total-ERK1/2 抗体，抗 phospho-AKT

抗体および抗 total-AKT 抗体：Cell Signaling Technology, Danvers, USA)を 2000 倍希釈で 4℃下, over night で処理した。その後, peroxidase 結合抗ウサギ IgG 抗体にて 1 時間室温下で処理し, T-TBS で洗浄後, PVDF 膜を ECL Western Blotting Detection Reagent (GE health care UK LTD, Amersham, UK)で蛍光発光させて検出した。ウエスタンブロットのリン酸化 ERK1/2 およびリン酸化 AKT の検出したバンドの発現強度は Cooled CCD CameraSystem ATTO Light-Capture IIを用いて定量化し, 対照群に対する比で表した。

7. 統計解析

各解析によるデータ間の比較, 検討は Student's-*t* 検定による両側検定を行い評価し, $p < 0.05$ の場合を有意差ありとした。

結 果

1. DMEM/F12 で凍結保存した顎下腺原基

顎下腺原基を DMEM/F12 中で 4℃保存した後に器官培養を行った場合，正常な分枝形態形成が認められた(図 2 対照群)．一方，顎下腺原基を DMEM/F12 中で -80℃冷凍保存すると，解凍後の培養顎下腺原基は 0 時間から 72 時間まで形態に変化は認めず，また上皮と間葉の識別も困難な状態であった．凍結時の冷却速度の違いもほとんど認めなく，分枝形態形成の進行も全く認められなかった(図 2 急速凍結，緩徐凍結)．

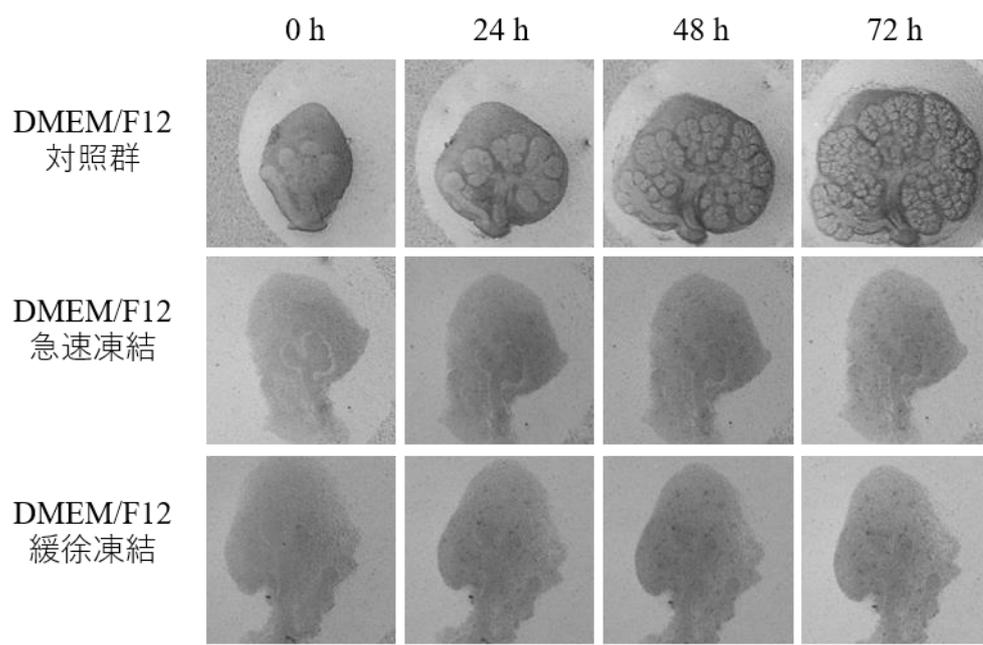


図 2 DMEM/F12 で凍結保存した顎下腺原基

顎下腺原基を DMEM/F12 中で 4°C 保存し，器官培養した(DMEM/F12，対照群)。
 顎下腺原基を DMEM/F12 中で -80°C，サンプルボックス(DMEM/F12，急速凍結)と
 Mr. Frosty® (DMEM/F12，緩徐凍結)で保存したのち解凍後，器官培養した。
 培養後 0，24，48 および 72 時間で写真に記録した(スケールバー 200 μm)。

2. 10% DMSO 含有 DMEM/F12 で凍結保存した顎下腺原基

DMEM/F12 中で 4℃保存した顎下腺原基は分枝形態形成が認められた(図 3 対照群). 10% DMSO 中で -80℃保存した顎下腺原基では, 両群(急速凍結, 緩徐凍結)とも分枝形態形成が認められた. 培養後 0 時間では急速凍結と緩徐凍結ともに対照群と比較すると上皮と間葉の識別がやや困難な形態であった. しかし, 24 時間以降の培養では上皮の識別は可能となり, 上皮の分枝形態形成が進行していることを認めた. なお, 一部の顎下腺上皮では個々の小葉が肥大化するような形態が観察された(図 3 急速凍結). 形成された顎下腺上皮の小葉の発育は, 対照群と比較して急速凍結と緩徐凍結ともに大きく抑制された(図 3 急速凍結, 緩徐凍結).

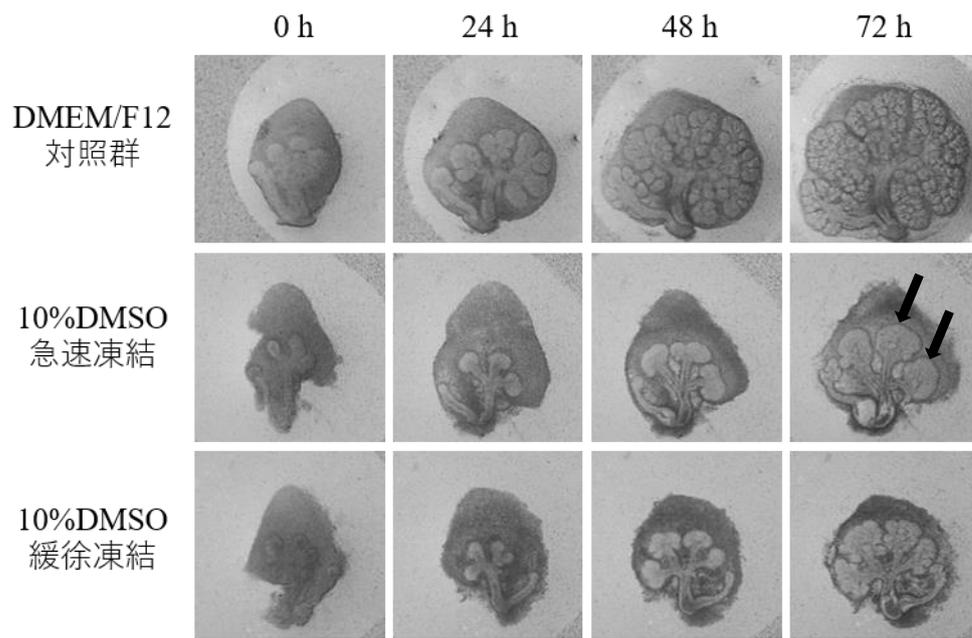


図3 10%DMSO 含有 DMEM/F12 で凍結保存した顎下腺原基

顎下腺原基を DMEM/F12 中で 4°C 保存し，器官培養した(DMEM/F12，対照群).
顎下腺原基を 10% DMSO 含有 DMEM/F12 中で -80°C，サンプルボックス(10%
DMSO，急速凍結)と Mr. Frosty®(10% DMSO，緩徐凍結)で保存したのち解凍後，器官
培養した.

培養後 0，24，48，および 72 時間で写真に記録した(スケールバー 200 μm).
一部の顎下腺上皮において小葉の肥大化を示した(黒矢印).

3. TC で凍結保存した顎下腺原基

DMEM/F12 中で 4℃保存した顎下腺原基は，器官培養によって分枝形態形成が進行することがわかった (図 4 対照群). TC 中で -80℃凍結保存した顎下腺原基は両群 (急速凍結，緩徐凍結)ともに，10% DMSO で凍結した群より活発な分枝形態形成が認められた (図 4 急速凍結，緩徐凍結). 培養後 0 時間では対照群と比較すると上皮の識別はやや困難であったが，24 時間以降から上皮は識別が容易となり 10% DMSO 群でみられた上皮の肥大化も認められなかった (図 4 急速凍結，緩徐凍結).

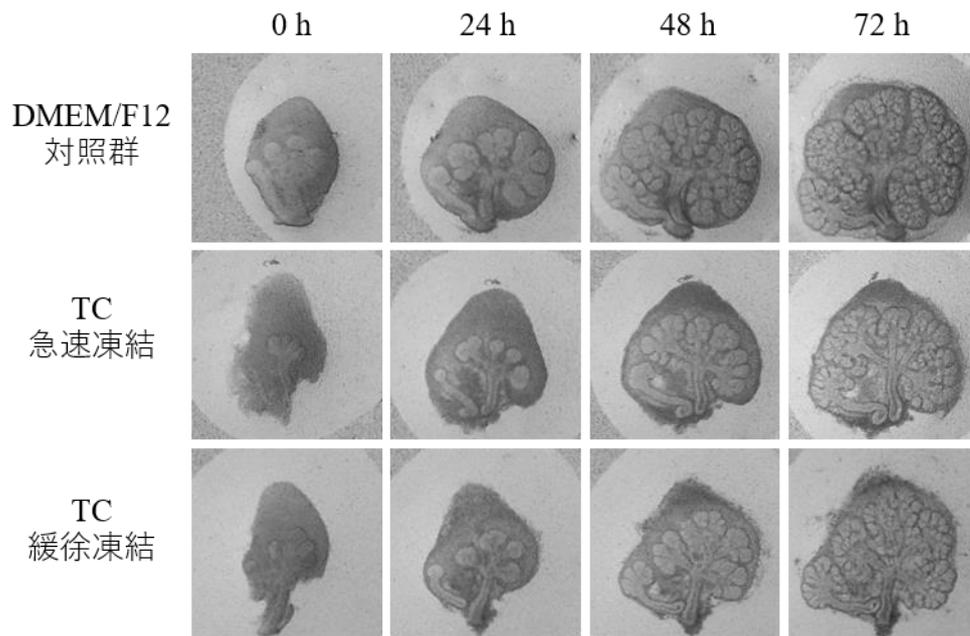


図 4 TC Protector®で凍結保存した顎下腺原基

顎下腺原基を DMEM/F12 中で 4°C 保存し、器官培養した(DMEM/F12, 対照群).
 顎下腺原基を TC 中で -80°C, サンプルボックス(TC, 急速凍結)と Mr. Frosty®(TC, 緩徐凍結)で保存し解凍後器官培養した.
 培養後 0, 24, 48, および 72 時間で写真に記録した(スケールバー 200 μm).

4. CB で凍結保存した顎下腺原基

DMEM/F12 中で 4°C 保存した顎下腺原基は，器官培養によって分枝形態形成が認められた(図 5 対照群)．CB 中で -80°C 冷凍保存した顎下腺原基は両群(急速凍結，緩徐凍結)とも，10% DMSO 群や TC 群よりもより活発な分枝形態形成の進行が認められた．培養後 0 時間では上皮の識別は 10% DMSO 群や TC 群と比べると比較的容易であり，上皮の発育も対照群とほぼ同等であった(図 5 急速凍結，緩徐凍結)．

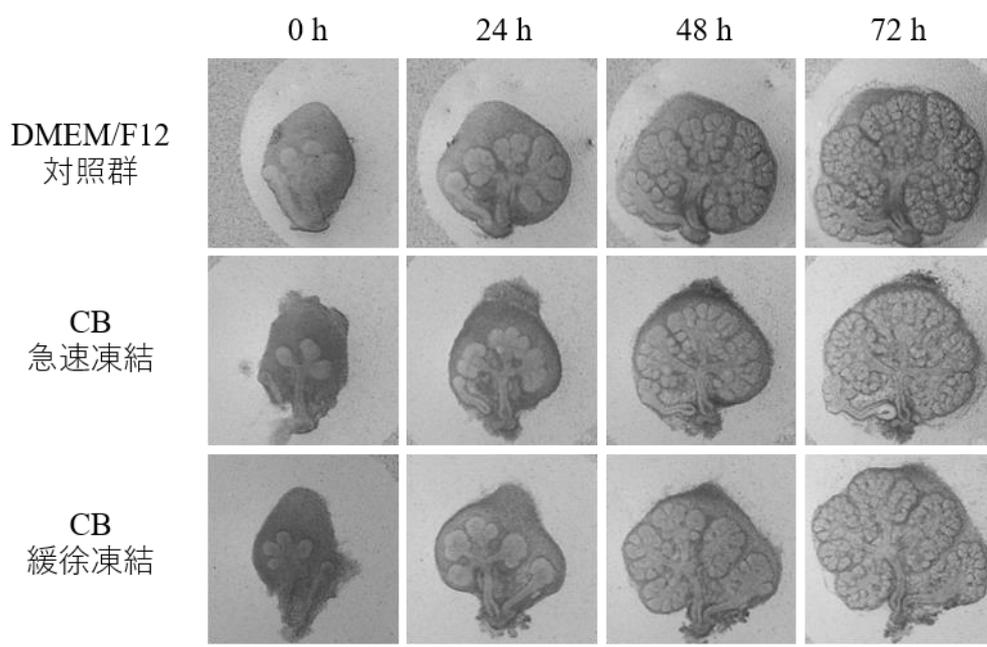


図5 CELLBANKER™1®で凍結保存した顎下腺原基

顎下腺原基を DMEM/F12 中で 4°C 保存し、器官培養した(DMEM/F12, 対照群).

顎下腺原基を CB 中で -80°C, サンプルボックス(CB, 急速凍結)と Mr. Frosty®(CB, 緩徐凍結)で保存し解凍後器官培養した.

培養後 0, 24, 48, および 72 時間で写真に記録した(スケールバー 200 μm).

5. 各媒体間での培養後 72 時間での分枝数と面積の比較

対照群と凍結群の顎下腺原基を客観的に評価するために，上皮の分枝数と総面積を測定した(図 6).

DMEM/F12 で凍結させた顎下腺原基の解凍後の器官培養の結果からは，上皮の識別が困難であり両項目とも測定不可能であった(N.D.). 分枝数(bud numbers)は，対照群(100%)に対して 10% DMSO 群は急速凍結で 6%，緩徐凍結で 10%，TC 群は急速凍結で 34%，緩徐凍結で 51%，CB 群は急速凍結で 59%，緩徐凍結で 79%となった(図 6 A). 面積(area)は，対照群(100%)に対して 10% DMSO 群は急速凍結で 19%，緩徐凍結で 22%，TC 群は急速凍結で 43%，緩徐凍結で 54%，CB 群は急速凍結で 69%，緩徐凍結で 79%となった(図 6 B). 分枝数と面積はそれぞれ 10% DMSO 群(急速凍結，緩徐凍結)，TC 群(急速凍結，緩徐凍結)，CB 群(急速凍結)は対照群と比較して有意に減少していたが，CB(緩徐凍結)は有意差が認められなかった(図 6 A, B).

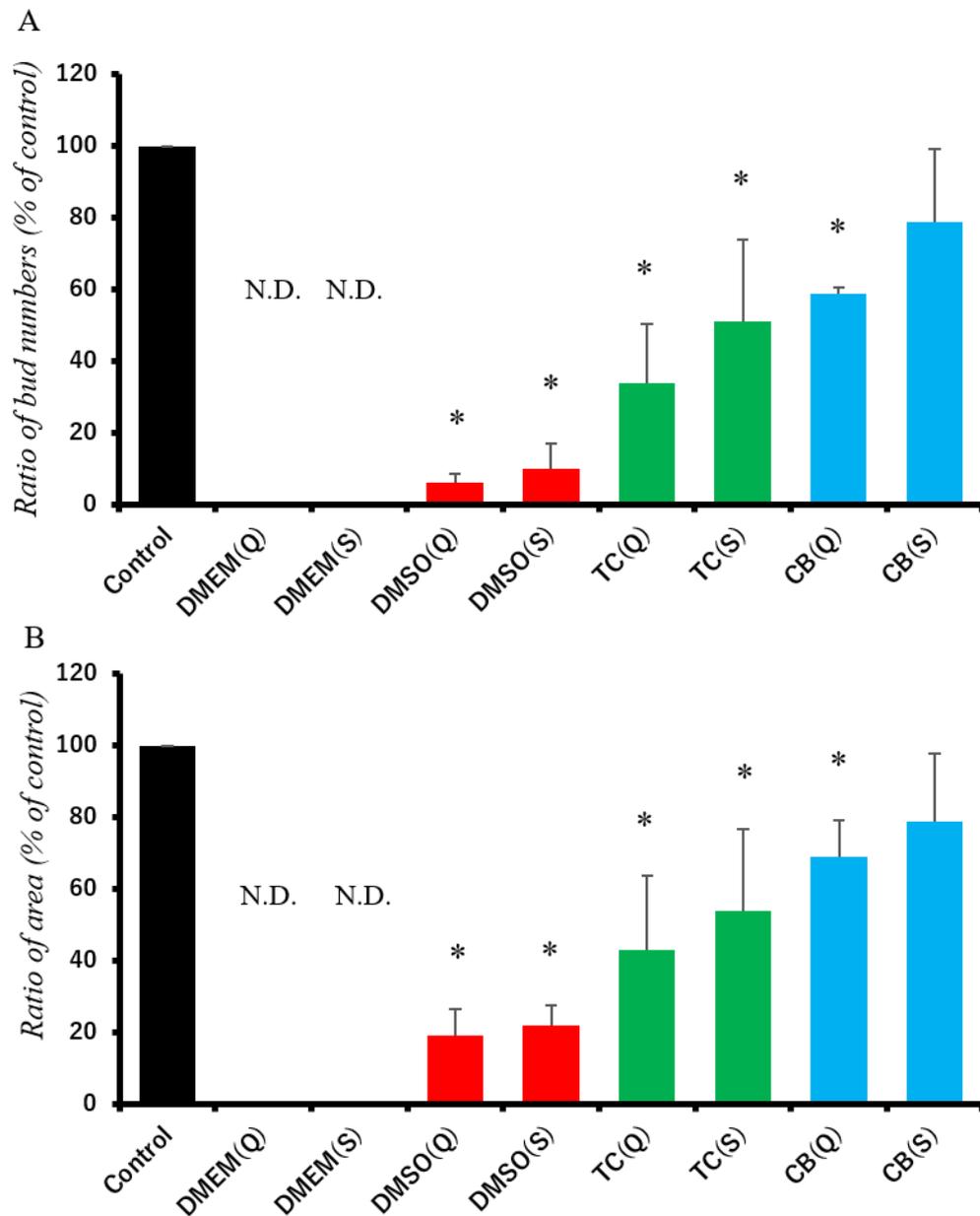


図6 培養後72時間での顎下腺上皮の分枝数と面積の比率

A: 培養後72時間での上皮の分枝数(bud numbers)を示した。

B: 培養後72時間での上皮の面積(area)を示した。

N.D.: 計測不可。

* $p < 0.05$ vs Control: Student's *t*-test.

データは平均値±標準偏差 (n=4)。

Control=対照群, Q=急速凍結, S=緩徐凍結。

6. 顎下腺原基の細胞内情報伝達系に及ぼす凍結保存の影響

対照群と緩徐凍結群：CB/Sでそれぞれのリン酸化状態を比較した結果，凍結の有無に関わらず ERK1/2 の発現量に変化はなかった．両群(対照群，CB/S)とも EGF 刺激後 10 分でリン酸化が亢進し，30 分でわずかにリン酸化が低下した(図 7 A, B)．ERK1/2 は対照群よりも CB/S 群のほうでシグナル応答性が高い傾向にあった．AKT においても，凍結の有無に関わらず発現量に変化はなかった．EGF 刺激後 10 分でリン酸化が亢進し，30 分で低下した(図 7 C, D)．両群ともシグナル応答性に変化はなかった．

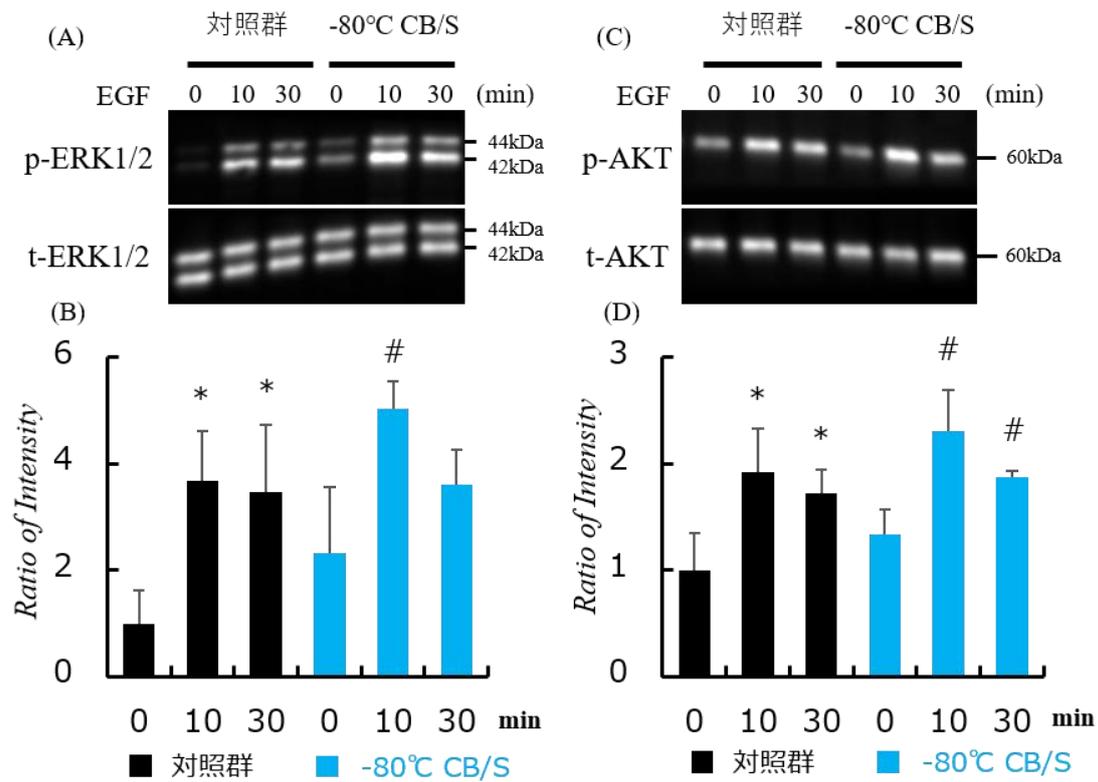


図7 顎下腺原基を凍結保存後、EGF刺激で誘導されるERK1/2とAKTのリン酸化状態

顎下腺原基を4°C、DMEM/F12で保存し24時間器官培養を行った対照群と、-80°C、CBとMr. Frosty®で保存し解凍後24時間器官培養を行った緩徐凍結群: CB/Sにそれぞれ20 ng/ml EGFで0、10、および30分間刺激した。

A: 上段がphospho-ERK1/2 (p-ERK1/2)を下段がtotal-ERK1/2 (t-ERK1/2)の結果を示した。

C: 上段がphospho-AKT (p-AKT)を下段がtotal-AKT (t-AKT)の結果を示した。

B, D: ウェスタンブロットのリン酸化ERK1/2およびリン酸化AKTの検出したバンドの発現強度は、Cooled CCD CameraSystem ATTO Light-Capture IIを用いて定量化し、対照群に対する比で表した。

データは平均値±標準偏差(n=3)。

* $p < 0.05$ vs 対照群 0 min, # $p < 0.05$ vs -80°C CB/S 0 min.

考 察

日本を含めた世界各国の研究機関において、体細胞、卵子、精子、受精卵、ES・iPS細胞等の凍結保存が検討されている^{4, 5, 12, 32)}。しかし、器官の凍結保存方法についてはいまだ確立されていないので本研究において顎下腺原基の凍結保存を試みた。その結果、凍結保護剤が存在しない溶液中では凍結による障害のため細胞は破壊され、顎下腺原基を構成するほとんどすべての細胞が死滅して、解凍後の培養顎下腺原基の分枝形態形成は全く観察されなかった(図2)。また、本実験の顎下腺原基を実体顕微鏡で観察すると、腺組織を構成する上皮と間葉の境界が明瞭ではないことがわかった(図2)。この現象は凍結により細胞が破壊されたことに加え、細胞外マトリクスなどの基質成分が破壊されたことによると考えられた。また、すでに報告されているように、凍結による細胞内外の水分子の結晶生成は、急速凍結することで抑制されることが知られている^{8, 33)}。そこで著者は顎下腺原基を液体窒素中で急速に凍結した場合の顎下腺原基の状態についても検討を行った。本論文では結果として示さないが、液体窒素中で凍結した場合でも凍結保護剤が存在しないと顎下腺原基の細胞は破壊され、解凍後の分枝形態形成は全く観察されないことがわかった。すなわち顎下腺原基を凍結する際には何らかの凍結保護剤の

添加が必須であると考えられた。

単離細胞を凍結保存する際，DMSOの添加が有用であることはすでに報告されている^{5, 8, 9, 34)}。本研究では顎下腺原基の凍結におけるDMSOの凍結保護効果について検討した。図3に示したように，10% DMSOで凍結保存し，解凍後の原基を器官培養すると分枝形態形成はわずかながら進行し，顎下腺上皮の小葉形成が確認された。しかし，この時の形態形成反応は正常（未凍結）の顎下腺原基とはかなり異なっていた。例えば，器官培養後24時間までは形態形成速度が非常に遅く，0時間との違いは少なかったが，それ以降（48時間以降）の培養で器官形成速度は回復した（図3）。また，10% DMSOで凍結保存した場合，小葉の切れ込み反応の抑制により小葉数が減少したことに加え，小葉の肥大化が観察された。この結果から，10% DMSOによる凍結は顎下腺原基に障害を与え，細胞や細胞外マトリックスの機能を抑制させてしまい完全な分枝形態形成が進行できない状態の原基に変性させたと推察できる。

次に著者は単離細胞の凍結保護剤としてよく使用されているTCとCBの効果について検討した。TCとCBの成分組成は明らかにされていないが，TCは無血清タイプであるのに対しCBは血清タイプであることが知られている。TC中で顎下腺原基を凍結すると解凍後の培養顎下腺原基の分枝形態形成は進行し，凍結

保護剤として明らかに好成績であることを示した(図4と図6). 分枝形態形成の進行速度はやや遅いと考えられたが, 72時間後の形態は明らかに10% DMSOの結果とは異なり, 分枝形態形成が進行していた. このことはTCが凍結による障害から顎下腺原基の細胞や細胞外マトリクスを保護したことを示すと考えられた. さらにCBの効果は優れており, 特に器官培養の初期から顎下腺原基の分枝形態形成は進行しており, 72時間までの器官形成反応も良好に観察された(図5と図6). したがってCBの方が顎下腺原基の凍結による障害から保護できたと考えられた. 両凍結保護剤の成分組成が明らかでないため, TCとCBの保護効果を詳細には検討ができないが, 血清の有無が効果の違いを生じさせているのかもしれない. 最近, ラットPC12細胞への成熟化は, nerve growth factor (NGF)を必要とし, 血清の存在はそれを抑制することが報告されている³⁵⁾. したがって, 本研究においても増殖因子や接着因子の存在や血清添加の効果についての検討が必要であると思われる. また, CB中で顎下腺原基を凍結する際の温度低下の速度(急速凍結, 緩徐凍結)により培養顎下腺原基の分子形態形成に違いが認められた(図6). Mr. Frosty[®]によるゆっくりと温度を低下させた方が顎下腺原基の凍結による障害から保護された. すなわちCBの凍結保護効果はゆっくりした温度低下が有効であると考えられる.

TC と CB は再生医療に関わる細胞等の凍結保存に利用されつつある。例えば，脂肪由来間葉系幹細胞³⁴⁾やヒト骨髄間葉幹細胞³⁶⁾などの細胞の凍結保存に TC や CB の使用が試みられている。これらの研究成果を詳細に分析することで，本研究のような器官の凍結保存がより有効に実現可能になることも考えられる。

顎下腺原基を凍結すると原基を構成する細胞や細胞外マトリクスに障害が生じて分枝形態形成が全く観察されなくなってしまうが，CB 中で凍結することで障害からかなり保護され，形態形成が進行することがわかった。そこで顎下腺原基の分枝形態形成を制御する細胞内情報伝達経路が凍結保存後にも正常に機能しているのか否かについて検討を行った。CB 中で凍結した後，解凍した顎下腺原基を常法により器官培養を行った。その後，EGF 添加により亢進する ERK1/2 と AKT のリン酸化状態を Western Blot 解析により検討した。その結果，EGF 刺激に応答して 10 分後，有意にリン酸化 ERK1/2 とリン酸化 AKT の上昇が確認された(図 7)。したがって CB 中で顎下腺原基を -80°C で凍結保存しても EGF 応答性の細胞内情報伝達系 (ERK1/2 と AKT) が保存できたことが明らかになった。

単離細胞の凍結保存は基礎研究分野で広く使用されてきている。しかし，器官の凍結は細胞内外の水分子

の結晶化によって細胞膜へ深刻なダメージを与えるため、困難であると考えられてきた^{5,8,9)}。本研究による結果から、顎下腺原基の凍結保存はCBなどの凍結保護剤を用いることで可能であると考えられた。しかし、CB中で凍結保存した顎下腺原基が、未凍結の顎下腺原基と完全に同一の性質を有しているのかは明確ではなく、今後さらなる検討が必要であると考えられる。例えば、顕微鏡学的・電子顕微鏡学的な観察により凍結による障害が確認されるのか否か、あるいは凍結後の顎下腺原基を動物に移植して腺の器官形成が正常に進行するのかなどの確認が必要である。ただし、本研究による結果から、生理的機能を保持した器官の凍結保存は可能であると考えられ、凍結の至適条件をさらに詳細に検討することで、より優れた器官凍結技術が確立できることが示唆された。さらに、種々の凍結保存の条件を詳細に検討することで顎下腺原基以外の器官の凍結が可能になるかも知れない。本研究は器官凍結の技術開発の基礎的知見として有用であると考えられる。

結 論

胎仔マウス顎下腺原基を凍結保存し，形態学的変化や機能的な変化について検討を行った．その結果，以下のような結論を得た．

1. 胎仔マウス顎下腺原基は凍結融解後も分枝形態形成を進行させることを確認できた．
2. CB 中で顎下腺原基を凍結することで最も有効に生理機能を保持した凍結保存が可能だった．
3. 凍結方法は緩徐凍結 ($-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) が適切な傾向にあった．
4. 凍結融解後も EGF 応答性の細胞内情報伝達系が機能していた．

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．

引用文献

- 1) 桑山正成．家畜，特に牛の卵子および胚の凍結保存．低温生物工会誌．2000；46：26-29．
- 2) Holm F, Strom S, Inzunza J, Baker D, Stromberg AM, Rozell B, Feki A, Bergstrom R and Hovatta O. An effective serum- and xeno-free chemically defined freezing procedure for human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Hum Reprod.* 2010; 25: 1271-1279.
- 3) Ha SY, Jee BC, Suh CS, Kim HS, Oh SK, Kim SH and Moon SY. Cryopreservation of human embryonic stem cells without the use of a programmable freezer. *Hum Reprod.* 2005; 20: 1779-1785.
- 4) 久慈直昭．クリニカルカンファレンス3 生殖医療の up-to-date 2)精子・卵子・卵巣の凍結保存とその安全性．日産婦誌．2010；62：136-140．
- 5) 今松伸介．霊長類 ES/iPS 細胞の凍結保存．生物学．2012；90：552-223．
- 6) Lindsay TJ and Vitrikas KR. Evaluation and treatment of infertility. *Am Fam Physician.* 2015; 91: 308-314.
- 7) Mandawala AA, Harvey SC, Roy TK and Fowler KE. Cryopreservation of animal oocytes and

- embryos: Current progress and future prospects.
Theriogenology. 2016; 86: 1637-1644.
- 8) 酒井 昭. 植物培養細胞・組織・胚の超低温保存.
化学と生物. 1992; 30: 441-448.
- 9) Reubinoff BE, Pera MF, Vajta G and Trounson AO.
Effective cryopreservation of human embryonic
stem cells by the open pulled straw vitrification
method. *Hum Reprod*. 2001; 16: 2187-2194.
- 10) 増田宜子, 大場崇史, 山田嘉重, 藤島昭宏, 宮本
洋一, 木村裕一, 上條竜太郎. 磁場下プログラム
フリーザーを用いた歯髄細胞の凍結保存に関する
研究. 日歯保存誌. 2010; 53: 274-280.
- 11) Nishiyama Y, Iwanami A, Kohyama J, Itakura G,
Kawabata S, Sugai K, Nishimura S, Kashiwagi R,
Yasutake K, Isoda M, Matsumoto M, Nakamura M
and Okano H. Safe and efficient method for
cryopreservation of human induced pluripotent
stem cell-derived neural stem and progenitor cells
by a programmed freezer with a magnetic field.
Neurosci Res. 2016; 107: 20-29.
- 12) Kuwayama M, Vajta G, Kato O and Leibo SP.
Highly efficient vitrification method for
cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed
Online*. 2005; 11: 300-308.
- 13) 原田裕次, 清水達也, 大和雅之, 菊池明彦, 岡野

- 光夫．細胞シート工学を用いた組織再構築および再生医療への応用．再生歯誌．2004；2：83-92.
- 14) Nakane T, Masumoto H, Tinney JP, Yuan F, Kowalski WJ, Ye F, LeBlanc AJ, Sakata R, Yamashita JK and Keller BB. Impact of cell composition and geometry on human induced pluripotent stem cells-derived engineered cardiac tissue. *Sci Rep.* 2017; 7: 45641.
- 15) Ogawa M, Oshima M, Imamura A, Sekine Y, Ishida K, Yamashita K, Nakajima K, Hirayama M, Tachikawa T and Tsuji T. Functional salivary gland regeneration by transplantation of a bioengineered organ germ. *Nat Commun.* 2013; 4: 2498.
- 16) Yamada A, Futagi M, Fukumoto E, Saito K, Yoshizaki K, Ishikawa M, Arakaki M, Hino R, Sugawara Y, Ishikawa M, Naruse M, Miyazaki K, Nakamura T and Fukumoto S. Connexin 43 is necessary for salivary gland branching morphogenesis and FGF10-induced ERK1/2 phosphorylation. *J Biol Chem.* 2016; 291: 904-912.
- 17) Sakai M, Matsushita T, Hoshino R, Ono H, Ikai K and Sakai T. Identification of the protective mechanisms of Lactoferrin in the irradiated salivary gland. *Sci Rep.* 2017; 7: 9753.
- 18) Tanaka J, Ogawa M, Hojo H, Kawashima Y,

- Mabuchi Y, Hata K, Nakamura S, Yasuhara R, Takamatsu K, Irie T, Fukada T, Sakai T, Inoue T, Nishimura R, Ohara O, Saito I, Ohba S, Tsuji T and Mishima K. Generation of orthotopically functional salivary gland from embryonic stem cells. *Nat Commun.* 2018; 9: 4216.
- 19) Takahashi Y and Nogawa H. Branching morphogenesis of mouse salivary epithelium in basement membrane-like substratum separated from mesenchyme by the membrane filter. *Development.* 1991; 111: 327-335.
- 20) Tucker AS. Salivary gland development. *Semin Cell Dev Biol.* 2007; 18: 237-244.
- 21) Hsu JC and Yamada KM. Salivary gland branching morphogenesis-recent progress and future opportunities. *Int J Oral Sci.* 2010; 2: 117-126.
- 22) Nogawa H and Takahashi Y. Substitution for mesenchyme by basement-membrane-like substratum and epidermal growth factor in inducing branching morphogenesis of mouse salivary epithelium. *Development.* 1991; 112: 855-861.
- 23) Kashimata M and Gresik EW. Epidermal growth factor system is a physiological regulator of development of the mouse fetal submandibular

- gland and regulates expression of the alpha6-integrin subunit. *Dev Dyn.* 1997; 208: 149-161.
- 24) 柏俣正典. 顎下腺分枝形態形成における上皮-間葉相互作用の分子メカニズム. 岐歯学誌. 2002; 28: 291-296.
- 25) Sakai T. Epithelial branching morphogenesis of salivary gland: exploration of new functional regulators. *J Med Invest.* 2009; 56: 234-238.
- 26) Hoffman MP, Kidder BL, Steinberg ZL, Lakhani S, Ho S, Kleinman HK and Larsen M. Gene expression profiles of mouse submandibular gland development: FGFR1 regulates branching morphogenesis in vitro through BMP- and FGF-dependent mechanisms. *Development.* 2002; 129: 5767-5778.
- 27) Gresik EW, Kashimata M, Kadoya Y, Mathews R, Minami N and Yamashina S. Expression of epidermal growth factor receptor in fetal mouse submandibular gland detected by a biotinyltyramide-based catalyzed signal amplification method. *J Histochem Cytochem.* 1997; 45: 1651-1657.
- 28) Kashimata M, Sayeed S, Ka A, Onetti-Muda A, Sakagami H, Faraggiana T and Gresik EW. The ERK-1/2 signaling pathway is involved in the

- stimulation of branching morphogenesis of fetal mouse submandibular glands by EGF. *Dev Biol.* 2000; 220: 183-196.
- 29) Larsen M, Hoffman MP, Sakai T, Neibaur JC, Mitchell JM and Yamada KM. Role of PI 3-kinase and PIP3 in submandibular gland branching morphogenesis. *Dev Biol.* 2003; 255: 178-191.
- 30) Koyama N, Hayashi T, Ohno K, Siu L, Gresik EW and Kashimata M. Signaling pathways activated by epidermal growth factor receptor or fibroblast growth factor receptor differentially regulate branching morphogenesis in fetal mouse submandibular glands. *Dev Growth Differ.* 2008; 50: 565-576.
- 31) 赤井崇浩, 式守道夫, 住友伸一郎, 柏俣正典. 胎仔マウス顎下腺の分枝形態形成における integrin $\alpha 5$ サブユニットの役割. 岐歯学誌. 2018; 45: 21-28.
- 32) Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology.* 2007; 67: 73-80.
- 33) 僧都 博. 生細胞の凍結による障害と保護の機構. 化学と生物. 1980; 18: 78-87.
- 34) Miyagi-Shiohira C, Kobayashi N, Saitoh I,

- Watanabe M, Noguchi Y, Matsushita M and Noguchi H. Evaluation of serum-free, xeno-free cryopreservation solutions for human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Cell Med.* 2017; 9: 15-20.
- 35) Sakagami H, Shi H, Bandow K, Tomomura M, Tomomura A, Horiuchi M, Fujisawa T and Oizumi T. Search of neuroprotective polyphenols using the “overlay” isolation method. *Molecules.* 2018; 23:1840.
- 36) Miwa H, Hashimoto Y, Tensho K, Wakitani S and Takagi M. Xeno-free proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cytotechnology.* 2012; 64: 301-308.