

論文内容の要旨

tdTomato マウス唾液腺における赤色蛍光の局在と唾液腺由来培養細胞の特性
(岩手医科大学歯学雑誌 平成 26 年 4 月)

ふるかわ しんじ
古川 真司

I. 研究目的

tdTomato マウスの唾液腺における、赤色蛍光発現部位を明らかにすると共に、唾液腺由来初代培養細胞の tdTomato 赤色蛍光発現と細胞遊走性を評価し、唾液腺由来不死化培養細胞を樹立することにより、再生医療研究に応用可能なツールの作製を目的とした。

II. 研究方法

1. 実験には、生後 3 週齢の tdTomato マウスを用いた。顎下腺、舌下腺を摘出し、パラフィン切片を作成し、組織構造観察のために H-E 染色を、tdTomato 赤色蛍光と F-actin の観察のために Phalloidin 染色を施し、観察した。
2. 各唾液腺由来細胞を培養した。チャンバースライドを用いて唾液腺由来初代培養細胞を固定後、Phalloidin 染色を施し、赤色蛍光発現と F-actin の分布を観察した。
3. 培養中の唾液腺由来初代培養細胞のタイムラプス撮影を行い、遊走能の評価を行った。
4. tdTomato マウスより顎下腺を摘出し、ヒトテロメアーゼ逆転写酵素(hTERT)ならびにシミアンウイルス 40 由来腫瘍性タンパク質ラージ T 抗原(SV40LT)のプラスミドを導入し、不死化した。
5. 顎下腺由来不死化細胞株を形態学的な大きさに従って GL, GM, GS 細胞とし、唾液腺幹細胞マーカーである Sca-1, CD44, CD90 の発現をフローサイトメーターにて確認した。

III. 研究成績

1. 顎下腺の細胞質は顆粒を除いて曇りガラス様に赤色蛍光が観察された。一方、舌下腺は細胞質内に籠状に赤色蛍光が観察された。
2. 顎下腺由来初代培養細胞では、核を密に取り囲むようなフェルト様蛍光が観察された。一方、舌下腺由来初代培養細胞では、核を疎に囲む綿様蛍光が観察された。
3. 顎下腺由来初代培養細胞ならびに舌下腺由来初代培養細胞において、tdTomato赤色蛍光部位は F-actinの局在と一致していた。
4. 顎下腺由来初代培養細胞の方が、舌下腺由来初代培養細胞に比べて遊走能が有意に高かった。
5. 顎下腺由来不死化細胞株を樹立した。
6. 形態により区分した3種類の顎下腺由来不死化細胞株は、いずれも唾液腺幹細胞マーカー陽性であったが、マーカー発現傾向に差が認められた。

IV. 考察及び結論

1. tdTomato 赤色蛍光発現は組織・細胞レベルで F-actin の局在と一致した。
2. 顎下腺由来初代培養細胞は舌下腺由来初代培養細胞に比べて、遊走能が有意に高かった。
3. 顎下腺より未分化性の高い間葉系細胞の可能性を示す細胞株を樹立することに成功した。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 石崎 明 (生化学講座 細胞情報科学分野)
副査 教授 藤村 朗 (解剖学講座 機能形態学分野)
副査 教授 三浦 廣行 (口腔保健育成学講座 歯科矯正学分野)

赤色蛍光強発現遺伝子導入マウス (tdTomato マウス) は再生医療研究において大変有用であると期待されている新しい実験動物である。特に、本マウスより採取した組織から分離された培養細胞は非常に強い赤色蛍光を有し、移植先の動物内でリアルタイムに体表から観察できる利点がある。一方、歯科矯正治療において、唾液・唾液腺の果たす役割は大きく、唾液の分泌量は矯正装置の口腔内装着によるカリエスリスクに影響を与える因子として注目されている。しかしながら、唾液腺組織の機能の維持や組織再生メカニズムは細胞レベルあるいは分子レベルで不明な点が多く、唾液腺組織を構成する細胞の機能の発現や再生機構に唾液腺内の未分化間葉系細胞がどのような役割を果たすかについては明らかとされていない。

今回、古川らは3週齢 tdTomato マウスを用いて、顎下腺と舌下腺における赤色蛍光発現様式について組織学的に明らかにすると共に、これらの唾液腺組織からそれぞれ間葉系細胞を採取・培養し、赤色蛍光の細胞内局在の特徴について比較調査した。加えて、採取した細胞の幹細胞性の目安となる細胞遊走性の評価を行うと共に、その遊走能力の高い細胞に不死化遺伝子を導入することにより唾液腺由来赤色蛍光強発現間葉系幹細胞株の樹立を試みた。

その結果、tdTomato マウスの赤色蛍光の発現は組織切片上のみならず唾液腺由来初代間葉系培養細胞においても細胞質内の F-actin の局在と一致した。興味深いことに、顎下腺由来間葉系細胞と舌下腺由来間葉系細胞では核周囲の赤色蛍光発現パターンに違いが見られた。さらに顎下腺由来間葉系初代培養細胞の遊走能は舌下腺由来のそれと比較して有意に高かった。加えて、遊走能の高い細胞が存在する顎下腺組織より out-growth した細胞の不死化を試みたところ、Sca-1/CD44/CD90 の発現性の高い間葉系幹細胞の可能性を持つ単一細胞由来の細胞集団が得られた。

以上の結果を総合的に判断すると、本研究の結果で得られた唾液腺由来赤色蛍光強発現未分化間葉系細胞は、その細胞内赤色蛍光の局在様式の観察により、由来する唾液腺の種類の特異性や細胞骨格の変化と遊走性との関連性を明らかにするために有用な研究ツールであると判断された。加えて、この細胞が唾液腺細胞の機能維持や再生に如何に係るかについて、唾液腺器官培養を用いた共培養系や *in vivo* 障害唾液腺への移植実験系への応用により明らかにするための有用な研究ツールとして大いに期待されることから、本研究が博士 (歯学) の学位に値すると判断した。

試験・試問結果の要旨

本研究の目的、概要について説明がなされ、研究方法、結果や考察に対する試問に適切な回答がなされていた。よって、学位に値する学識と研究能力を有すると判断した。

参考論文

1. Lymphatic architecture of the human gingival interdental papilla
(安藤 禎紀他 8 名と共著)
Lymphology
第 44 卷
146 頁～154 頁
平成 22 年 12 月
2. ヒト皮下リンパ管の流れの方向性
(安藤 禎紀他 3 名と共著)
リンパ学
第 35 卷 1 号
3 頁～7 頁
平成 23 年 7 月