

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

古川 真司, 佐藤 和朗, 藤村 朗*, 大塚 正人**, 三浦 廣行

岩手医科大学歯学部口腔保健育成学講座歯科矯正学分野

*岩手医科大学解剖学講座機能形態学分野

**東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

(主任: 三浦 廣行 教授)

(受付: 2013年12月19日)

(受理: 2014年 1 月 7 日)

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. tdTomato マウスの組織より得られた細胞は非常に強い赤色蛍光を有し, 動物生体内に移植された細胞はリアルタイムに体表からの観察が可能である. 今回, 我々は tdTomato マウスの唾液腺における, 赤色蛍光発現部位を組織学的に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能を評価した. さらに不死化細胞株を樹立し, 細胞表面マーカーの発現について検討した.

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培養細胞においても細胞質内の F-actin の局在と一致した. さらに顎下腺由来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. F-actin と共局在する tdTomato 赤色蛍光の分布は, 遊走能の高い顎下腺由来初代培養細胞において, 核の周囲にフェルト様に分布し, 核の輪郭が明瞭であったのに対し, 遊走能の低い舌下腺由来初代培養細胞では, 核の周囲に綿様に分布し, 核の輪郭が不明瞭であった. 加えて, 遊走能の高い細胞が存在する顎下腺組織より遊走した細胞を不死化し, Sca-1⁺CD44⁺CD90⁺の未分化間葉細胞の可能性を示す細胞株を樹立することに成功した.

本研究で得られた唾液腺由来の細胞は, その細胞骨格の変化と遊走能との関連性や, 唾液腺における未分化間葉細胞の役割を明らかにするための研究ツールとして, 極めて有用である.

Localization of the red fluorescence and characteristics of culture cells derived from salivary gland of tdTomato mice

Shinji FURUKAWA, Kazuro SATOH, Akira FUJIMURA, Masato OHTSUKA, Hiroyuki MIURA

Division of Orthodontics, Department of Developmental Oral Health Science, School of Dentistry, Iwate Medical University

(Chief : Prof. Hiroyuki MIURA)

1-3-27, chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

Division of Functional Morphology, Department of Anatomy, Iwate Medical University

2-1-1 Nishitokuta, Yahaba-Cho, Shiwa-Gun, Iwate, 028-3694, Japan

Division of Basic Molecular Science and Molecular Medicine, Department of Molecular Life Science, School of Medicine, Tokai University

143 Shimokasuya, Isehara, Kanagawa, 259-1193, Japan

緒 言

様々な高次生命現象を解明するためには *in vitro* における生体分子の解析に加え、個々の細胞やその細胞が産生する生体分子が *in vivo* でどのように動き、どのように相互作用するのかを観察するためのバイオイメーキング技術が重要である。とりわけ再生医療の分野においては、移植された細胞の動態を追跡するために、バイオイメーキングが広く利用されている。近年の再生医療の研究において、バイオイメーキング技術の発展は目覚ましく^{1~5)}、2008年にノーベル化学賞を受賞した緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein, GFP) が見出されたのを機に、これらの蛍光タンパク質を利用した蛍光イメージングの技術が発展してきた。蛍光タンパク質は非侵襲的に、しかも経時的に観察が可能であるため急速に普及した。しかしながら、生体内に移植された細胞や臓器を *in vivo* イメージング装置を用いて観察するためには、体表からでも検出可能な強い蛍光強度が必要である。

tdTomato マウスは、大塚らが独自に開発したトランスジェニックマウスの一系統で、CAG プロモーター (cytomegalovirus enhancer; chicken β -actin promoter; rabbit β -globin polyA signal site) に連結した赤色蛍光タンパク tandem dimer Tomato (tdTomato) の cDNA を Rosa26 遺伝子座に導入することにより作製された⁶⁾。tdTomato は、サンゴから単離された蛍光タンパク質 DsRed に改変を加えて作製された 7 種類のフルーツ蛍光タンパク (CLONTECH, Laboratories, Inc.)^{7~9)} の一つであり、dimeric Tomato (dTomato) 遺伝子をタンデムにつなぎ合わせ、効率よく二量体を形成するように設計されている¹⁰⁾。dTomato が効率良く二量体を形成することで他の蛍光タンパク質よりも強い蛍光強度を示し、少ない細胞数でも体表からの蛍光イメージングが可能である。tdTomato マウスは現在最も利用されている高感度 GFP (enhanced GFP, EGFP)^{11~13)} を

遺伝子導入したトランスジェニックマウス (EGFP マウス)¹⁴⁾ と比較して、肝臓、脾臓、腎臓における有用性が報告されている¹⁵⁾。しかしながら、これら臓器や全身の組織レベルにおける蛍光発現は報告されている^{15, 16)} もの、単一細胞レベルにおける細胞内の tdTomato 赤色蛍光発現の局在や分布の詳細は明らかになっていない。

通常再生医療では、生体より少量の組織や細胞を採取し、目的の細胞のみを *in vitro* で培養、増殖させ、再び生体内へと戻す手法が用いられる。そのため再生医療の研究では、胚性幹細胞 (embryonic stem cell, ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell, iPS 細胞) のみならず、生体の様々な臓器から採取された体性幹細胞が対象とされる。唾液腺も例外ではなく、唾液腺からの体性幹細胞の採取が必要であり、唾液腺由来体性幹細胞は介在部導管にその存在が報告されている¹⁷⁾。唾液腺より得られた幹細胞を用いた再生医療研究は唾液腺の再生^{18, 19)}にとどまらず、腎臓や肝臓など他の臓器の再生への利用も期待されている^{20~24)}。tdTomato マウス唾液腺から得られた幹細胞をトレーサーとして用いる研究は、その蛍光強度の特性故に応用が期待される。

本研究では、まず、tdTomato マウスの唾液腺より分離された細胞の蛍光の局在や分布などの発現様式を明らかにすると共に、この細胞の幹細胞性の指標の一つとなる移動能力を評価する目的で、tdTomato 赤色蛍光のトレースによる移動度の数値化を試みた。さらに、移動性の高い顎下腺由来細胞をもとに、赤色蛍光強発現不死化細胞株を樹立し、その幹細胞マーカーの発現を確認した。

材 料

対象動物と飼育条件

唾液腺内の未分化な細胞が豊富で、細胞増殖が旺盛な生後 3 週齢の tdTomato マウス^{6, 15, 16)} 13 匹を用いた。動物は岩手医科大学医歯薬総合研究所動物研究センター飼育室 (室温 23±

1°C, 湿度 60±10%) で飼育し, γ 線滅菌済み CE-2 固形飼料 (CLEA Japan, INC., Japan) と濾過水は自由摂取とした. 本研究は, 岩手医科大学動物実験委員会の許可 (実験計画書承認番号 23-075) を受け, 岩手医科大学動物実験指針ならびに動物の保護および管理に関する法律に従って実施した.

方 法

1. パラフィン切片作製

tdTomato マウス 5 匹を炭酸ガスにて屠殺後, 顎下腺, 舌下腺をそれぞれ, または一塊にして摘出し, 4% paraformaldehyde/PBS を用いて浸漬固定を行った. その後アルコール上昇系列にて脱水し, キシレンにて透徹後, 通法に従ってパラフィン包埋を行った. パラフィン包埋試料は滑走式ミクロトーム (SLEDGE MICROTOME IVS-400®, SAKURA, Japan) を用いて 4 μ m 厚の連続切片を作製した. 切片は 1 枚目を組織構造観察のため hematoxylin-eosin 染色 (H-E 染色) (Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Japan) を, 2 枚目を Alexa Fluor®488 標識 Phalloidin 染色 (Life Technologies Co., Carlsbad, CA USA) を施し, F-actin 分布と tdTomato 赤色蛍光発現分布を観察した. 3 枚目は必要に応じて使用した.

2. H-E 染色による唾液腺組織構造の観察

tdTomato マウスの正常唾液腺組織構造を観察するために, 作製した連続切片は前述の手順の通り 3 枚おきに, 通法に従って H-E 染色を施した. 染色した切片は HS オールインワン蛍光顕微鏡 (BIOREVO®, BZ-9000, Keyence, Japan) を用いて観察, 撮影した. 倍率は 40 倍から 400 倍とした.

3. 唾液腺組織の tdTomato 赤色蛍光発現ならびに F-actin の観察

連続切片を 3 枚おきにキシレンによる脱パラフィン処理後, Alexa Fluor®488 標識 Phalloidin を用いて染色した. 染色した切片は HS オールインワン蛍光顕微鏡を用いて, 露光時間を統一し観察, 撮影した. tdTomato 赤色蛍光発現観

察のために, Texas Red 蛍光フィルタ (OP-66838 BZ フィルタ: 透過波長帯域 540-560 nm の励起フィルタ, 透過波長帯域 630-660 nm の吸収フィルタ, 595 nm 以下の波長帯を反射, 595 nm 以上の波長帯を透過するダイクロイックミラー) を用いた. また F-actin 観察のために, GFP-BP 蛍光フィルタ (OP-66836 BZ フィルタ: 透過波長帯域 440-470 nm の励起フィルタ, 透過波長帯域 535-550 nm の吸収フィルタ, 495 nm 以下の波長帯を反射, 495 nm 以上の波長帯を透過するダイクロイックミラー) を用いた. 観察倍率は 40 倍から 400 倍とした. 撮影した無染色像と Alexa Fluor®488 標識 Phalloidin 染色像を KEYENCE BZ-II 画像解析ソフトウェアを用いて重ね合わせ, 蛍光部位の一致を確認した.

4. 唾液腺由来初代培養細胞の分離と蛍光観察

唾液腺由来細胞の tdTomato 赤色蛍光発現を詳細に観察するために, tdTomato マウスの唾液腺より初代培養細胞を分離した. 生後 3 週齢の tdTomato マウス 5 匹から左右側合計 10 個ずつの顎下腺と舌下腺をそれぞれ摘出し, 細切した. 35mmディッシュ (Thermo Fisher Scientific K.K., Nunc, Japan) に細切された組織を静置し, 20% ウシ胎仔血清 (FBS) (Gibco™, USA), 1% Antibiotic-Antimycotic (Gibco™, USA) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) (Sigma Aldrich, Co., LLC, USA) を加え 5% CO₂, 37°C の条件下で培養を開始した. 1 週間培養後に組織片より遊走した細胞 (図 1) を, 0.25% トリプシン, 1 mM EDTA を含む PBS で剥離し, チャンバースライド (Thermo Fisher Scientific K. K., Nunc, Japan) に 20 cells/chamber の密度で播種した. 24 時間培養後, 4% paraformaldehyde/PBS で固定し, 0.1% Triton X-100 (Sigma Aldrich, Co., LLC, USA) 処理後, PBS で数回洗浄し, Alexa Fluor®488 標識 Phalloidin を用いて F-actin 染色を施した. 観察, 撮影には HS オールインワン蛍光顕微鏡を用いた. 撮影条件は露光時間を統一し, F-actin 配列の観察と撮影には GFP-BP 蛍光フィ

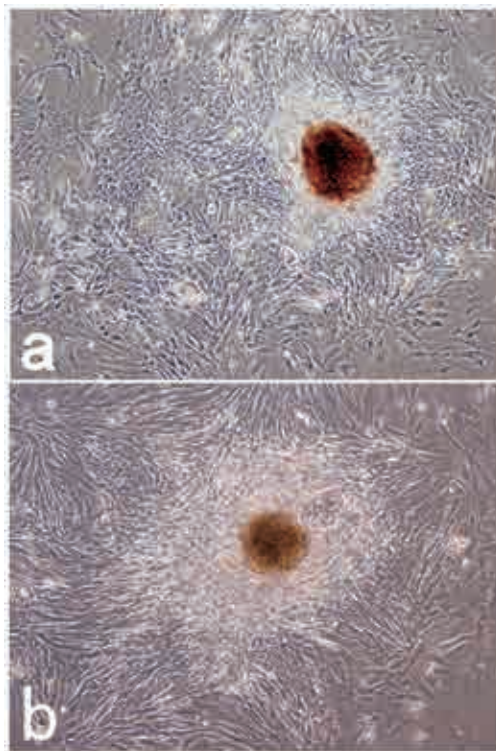


図 1. 唾液腺由来初代培養細胞の位相差顕微鏡像

a) 顎下腺由来初代培養細胞

b) 舌下腺由来初代培養細胞

培養 1 週間後に唾液腺組織塊より遊走した細胞を撮影した。

ルタを用いた。tdTomato 赤色蛍光発現観察と撮影は前述の tdTomato 赤色蛍光発現観察と同じ条件とした。観察倍率は 400 倍とし、無染色像、Alexa Fluor®488 標識 Phalloidin 染色像を KEYENCE BZ-II 画像解析ソフトウェアを用いて重ね合わせた。

5. 唾液腺由来初代培養細胞の遊走能の評価

顎下腺ならびに舌下腺由来初代培養細胞の遊走能を比較するために、生後 3 週齢の tdTomato マウス 3 匹より顎下腺と舌下腺を左右側それぞれ一塊に摘出し、合計 6 個を試料とした。20% FBS を含む D-MEM を用いて 5% CO₂, 37°C の条件下で培養を開始した。培養開始 21 日後、顎下腺由来の初代培養 44 細胞と舌下腺由来の初代培養 20 細胞について、HS オー

ルインワン蛍光顕微鏡を用いて 10 分間隔で 60 分間のタイムラプス撮影を行った。撮影条件は露光時間を 1/2 秒で統一し、前述した Texas Red 蛍光フィルタを用い、観察倍率は 200 倍とした。9 枚の写真から 1 区画 1.7mm × 1.3mm の連結画像を作成し KEYENCE BZ-II 画像解析ソフトウェアを用いて計測した。移動距離の算出方法は、撮影開始時の細胞の核の中心を基点とし、10 分ごとの移動距離を 60 分間合計して細胞の移動距離とした (図 2)。計測した結果からそれぞれ 1 細胞あたりの移動距離を算出し、非等分散の 2 標本を対象とする t 検定を用いて双方の移動量を比較検討した。

6. 顎下腺由来不死化細胞株の樹立

唾液腺由来細胞の初代培養において、通常条件下では腺房細胞や上皮細胞の培養は困難である^{25~27)}。本研究では、遊走能の高い細胞が存在する顎下腺由来細胞の不死化を試みた。顎下腺組織より遊走した細胞に、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (human telomerase reverse transcriptase, 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 (simian vacuolating virus 40 large T antigen, SV40LT) のプラスミドベクターを Lipofectamine LTX (Invitrogen, USA) を用いて通法に従って導入した。旺盛な増殖活性を示す細胞を選択し、単一細胞由来不死化細胞株を樹立した。樹立した不死化細胞は形態学的に大きさが明らか

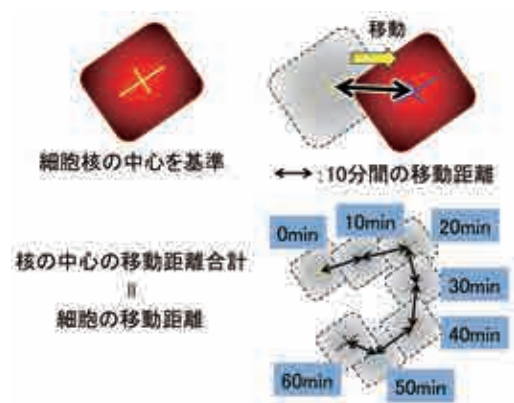


図 2. Time-lapse 撮影による細胞移動距離の計測方法

に異っており, GL, GM, GS の三種類に分けられた。

7. フローサイトメトリーによるマーカー発現の解析

顎下腺由来不死化細胞株 (GL, GM, GS 細胞) について唾液腺幹細胞マーカーである Sca-1, CD44, CD90 の細胞表面への表出をフローサイトメーターで解析した。サブコンフルエントの細胞株を 0.5% FBS と 2 mM EDTA を含む PBS に懸濁し, fluorescein isothiocyanate (FITC) ラベルされた抗 stem cell antigen-1 (Sca-1) 抗体 (Miltenyi Biotec K.K., Japan, Sca-1-FITC), 抗 CD44 抗体 (Miltenyi Biotec K.K., Japan, CD44-FITC) または抗 thymocyte antigen-1 (Thy-1) /CD90 抗体 (Miltenyi Biotec K.K., Japan CD90-FITC) をそれぞれ添加した。30 分間静置後の細胞を PBS で洗浄し, EPICS XL ADC デジタル 4 カラーフローサイトメーター (Beckman Coulter, Inc., USA) にて FL1 の波長域における蛍光強度を解析した。対照として FITC ラベルされた isotype control IgG (IgG-FITC) を用いた。

結 果

1. tdTomato マウス唾液腺組織における赤色蛍光発現部位の観察

パラフィン包埋された tdTomato マウスの唾液腺組織の連続切片を作製し, 組織構造の観察を行った。図 3 に顎下腺と舌下腺境界部の H-E 染色像を示す。両唾液腺の間は薄い被膜で境されているが, その被膜は非常に薄く, 境界不明瞭である (図 3-insert)。顎下腺を構成する細胞基質は分泌顆粒が好酸性に染まるのが観察され, 舌下腺にはいわゆる半月状の構造が確認された。正常マウス唾液腺では通常, 腺房部とそれに付随する筋上皮細胞と導管部 (線条部導管, 介在部導管) を持ち, 介在部導管では背の低い単層立方上皮が, 線条部導管では背の高い単層円柱上皮が tdTomato マウスでも同様に観察された。

唾液腺組織の連続切片に Alexa Fluor®488 標

識 Phalloidin 染色を施した後, tdTomato 赤色蛍光発現と F-actin の局在を検討した (図 4)。H-E 染色による観察と同様に, 顎下腺と舌下腺との境界は不明瞭であった。顎下腺ならびに舌下腺組織における tdTomato 赤色蛍光発現は, 核および分泌顆粒を除く組織全体で観察された。特に顎下腺では細胞質内の顆粒を除いて曇りガラス様に tdTomato 赤色蛍光発現が観察されたのに対し, 舌下腺では細胞質内に籠状に観察された (図 4 a)。興味深いことに, Alexa Fluor®488 標識 Phalloidin 染色による F-actin は tdTomato 赤色蛍光発現と同一の部位局在を示した。腺房内では, 個々の腺細胞どうしが接触する側面部に, 膜の裏打ち構造としての F-actin が弱い発現を示した (図 4 b)。tdTomato 赤色蛍光と, Alexa Fluor®488 標識 Phalloidin 染色像との重ね合わせによって, tdTomato 発現部位 (赤色蛍光) と F-actin 配列 (緑色蛍光) は一致した (図 4 c)。

2. 唾液腺由来初代培養細胞における蛍光発現部位の観察と遊走能の評価

唾液腺由来細胞の tdTomato 赤色蛍光発現を詳細に観察するために, tdTomato マウス唾液腺組織より初代培養細胞を分離した。図 5 に顎下腺ならびに舌下腺より分離された初代培養細胞の tdTomato 赤色蛍光発現 (図 5 a, d), Alexa Fluor®488 標識 Phalloidin 染色による F-actin の局在 (図 5 b, e), さらにはそれらの重ね合わせ像 (図 5 c, f) を示す。顎下腺由来初代培養細胞では, 核を取り囲むようなフェルト様赤色蛍光と, 核を支えるように束状の赤色蛍光が観察された (図 5 a, 6 a)。核の周囲には顆粒状の赤色蛍光も観察された。F-actin は太いアクチンバンドとして紡錘型の長軸に沿って配列し, 核の周囲に密なアクチンフィラメントが観察された (図 5 b)。一方, 舌下腺由来初代培養細胞では核周囲に綿様赤色蛍光が観察された (図 5 d, 6 b)。さらに, 太いアクチンバンドが星型や扁平型の外形の長軸短軸に関係なくほぼ一定方向に配列し, それに直行する細いアクチンバンドが観察された。核の周囲には疎に配列したアク

チンフィラメントが観察され (図 5 e), 顎下腺由来初代培養細胞で観察された顆粒状の赤色蛍光は観察されなかった. 両唾液腺由来初代培養細胞において, tdTomato 赤色蛍光発現部位と F-actin 配列部位は, 核周囲の顆粒を除くすべての部位で一致した (図 5 c, f).

唾液腺由来初代培養細胞の典型的な形態を図 7 に示す. 両唾液腺由来初代培養細胞とも星型, 扁平型, 紡錘型を呈するものがほとんどであったが, 顎下腺由来初代培養細胞の形態は紡錘型が多く, 先の丸い葉状仮足様構造が多く見られた (図 7 a). 舌下腺由来初代培養細胞は星型や扁平型が多く, 細胞が伸ばした突起の先端に槍型の形態が観察された (図 7 b). 一般的に仮足の形成は細胞の移動に関与する. 形態の異なる両唾液腺由来初代培養細胞の遊走能を評価するために, 単位時間あたりの平面移動距離を計測した. 図 8 に細胞の移動量を大きい順に並べたグラフを示す. 平均移動量は顎下腺由来初代培養細胞のほとんどが $20\text{ }\mu\text{m}$ 以上 (平均 $37.95 \pm 2.29\text{ }\mu\text{m}$) であったのに対し, 舌下腺由来初代培養細胞は平均 $27.09 \pm 1.56\text{ }\mu\text{m}$ で $40\text{ }\mu\text{m}$ を超える移動距離を示したものはなかった. したがって, 顎下腺由来初代培養細胞が舌下腺

のそれと比較して遊走能が高いことが示唆された. また, 顎下腺由来初代培養細胞の核は移動方向に対して前方や後方などに偏在するものが

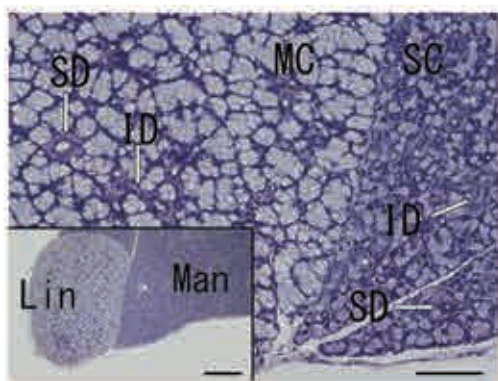


図 3. tdTomato マウスの顎下腺と舌下腺の H-E 染色像 (bar : $100\text{ }\mu\text{m}$)

顎下腺と舌下腺の間には薄い被膜が認められる.
insert : 顎下腺と舌下腺の全体像 (bar : $500\text{ }\mu\text{m}$)
境界不明瞭である.

Man : 顎下腺, Lin : 舌下腺, MC : 粘液細胞,
SC : 漿液細胞, SD : 線条部導管, ID : 介在部導管

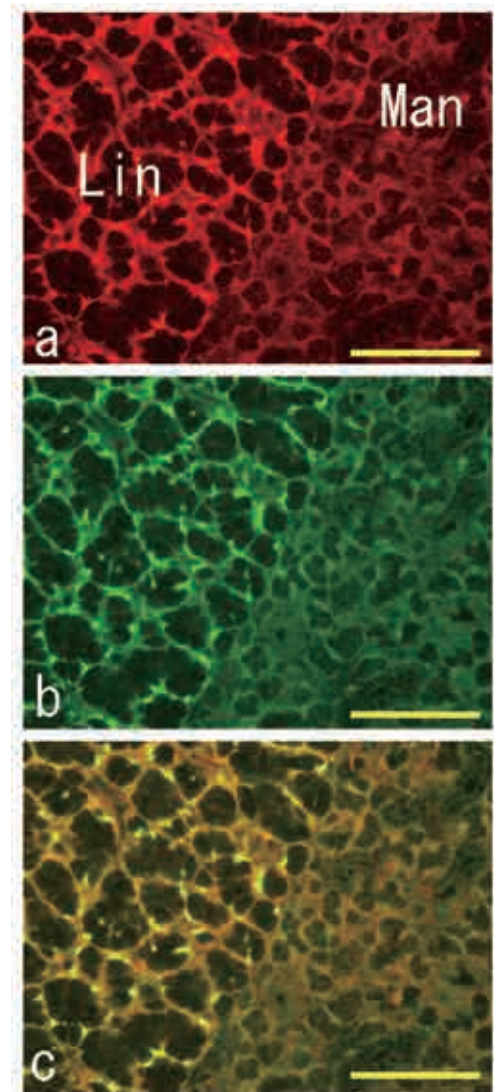


図 4. tdTomato マウス唾液腺組織の蛍光像

a) tdTomato 赤色蛍光像 (bar : $500\text{ }\mu\text{m}$)

b) Alexa Fluor[®]488 標識 Phalloidin 染色像 (F-actin) (bar : $500\text{ }\mu\text{m}$)

c) tdTomato 赤色蛍光像と Alexa Fluor[®]488 標識 Phalloidin 染色像との重ね合わせ像 (bar : $500\text{ }\mu\text{m}$)

顎下腺では細胞質内の顆粒を除いて曇りガラス様に蛍光が観察され, 舌下腺では細胞質内に籠状に蛍光が観察された.

Man : 顎下腺, Lin : 舌下腺

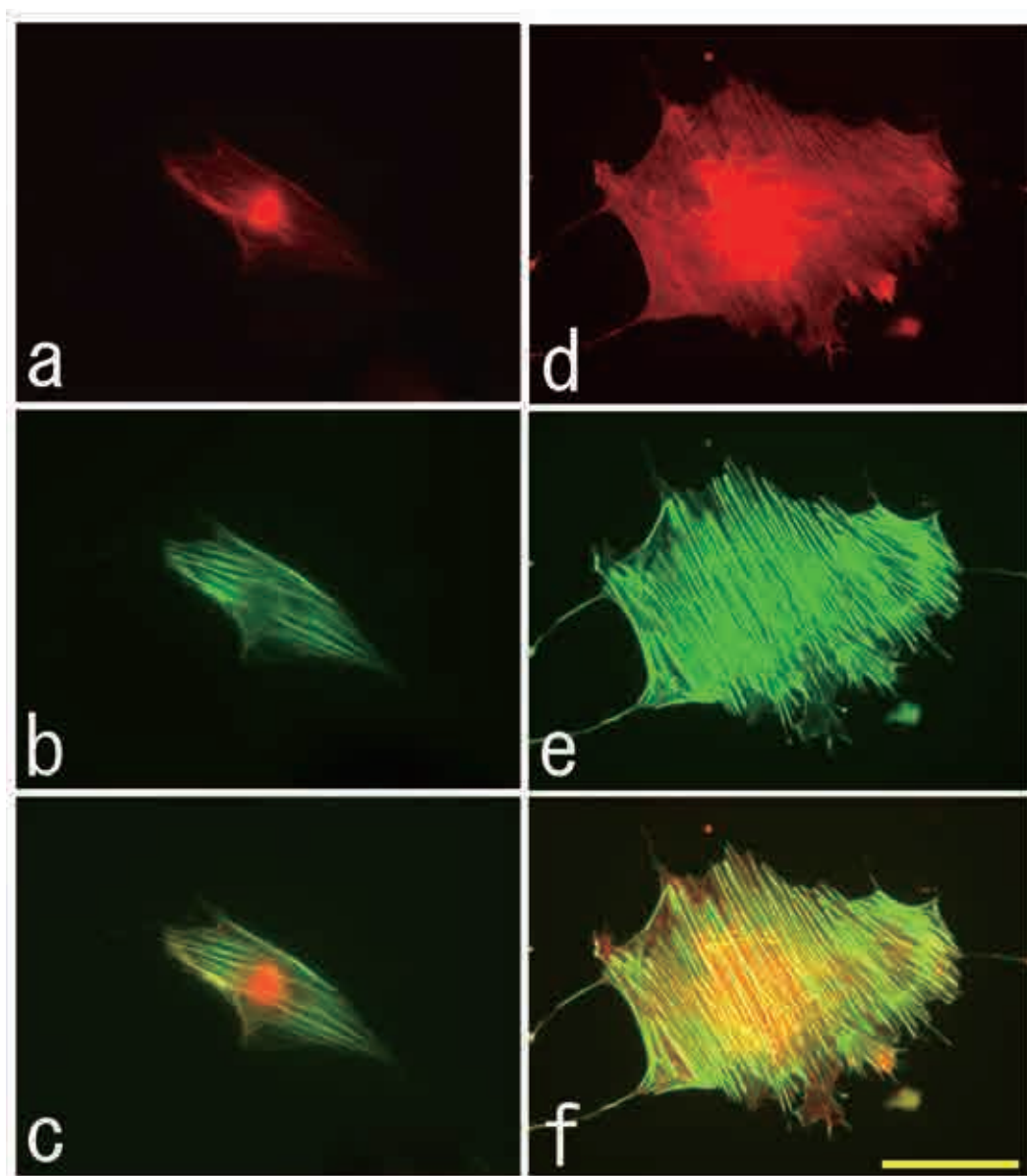


図 5. 唾液腺由来初代培養細胞の蛍光像 (bar : 100 μ m)

a~c) : 顎下腺由来初代培養細胞

a) tdTomato 赤色蛍光像

b) Alexa Fluor[®]488 標識 Phalloidin 染色像 (F-actin)

c) tdTomato 赤色蛍光像と Alexa Fluor[®]488 標識 Phalloidin 染色像との重ね合わせ像

d~f) : 舌下腺由来初代培養細胞

d) tdTomato 赤色蛍光像

e) Alexa Fluor[®]488 標識 Phalloidin 染色像 (F-actin)

f) tdTomato 赤色蛍光像と Alexa Fluor[®]488 標識 Phalloidin 染色像との重ね合わせ像

多く見られた (図 7 a) のに対し, 舌下腺由来初代培養細胞の核は細胞の中心に位置するものが多く見られた (図 7 b)。

3. 顎下腺由来不死化細胞株の樹立とマーカー遺伝子発現の評価

幹細胞性の指標の一つとなる遊走能²⁸⁾は顎下腺由来初代培養細胞で有意に高いことから, 顎下腺組織より遊走した細胞を不死化し, 三系統の培養細胞株を確立した。細胞株はその形態学的な大きさに従ってそれぞれ GL, GM, GS 細胞とした (図 9)。GL 細胞は円形状に拡張した形態を示した (図 9 a)。GM 細胞は最も一般的な線維芽細胞様形態を呈した (図 9 b)。一方, GS 細胞はよく発達した葉状ならびに糸状仮足様構造を認めた (図 9 c)。これらの顎下腺由来不死化細胞株において唾液腺幹細胞マーカーである Sca-1, CD44, CD90 の発現を解析した。その結果, 全てのマーカーが陽性であったものの, GL 細胞において CD44 の発現が, GS 細胞

においては Sca-1 ならびに CD90 の発現が低い傾向にあった (図 10)。

考 察

近年, 再生医療の進歩は非常に目覚ましいものがある。その要因の一つにバイオイメージング技術の発展がある。GFP をはじめ, DsRed や mCherry などの様々な蛍光タンパクが開発された。特に tdTomato は, その波長特性を活かし, 他の蛍光タンパクよりも生体の深部における蛍光シグナルを検出でき, 体表からの追跡が可能である。tdTomato マウス由来の細胞を利用した移植実験では, 移植された細胞がどのような働きをし, どう再生に関与するのかをリアルタイムで評価することが期待される。すなわち, 再生医療研究において tdTomato マウスは重要な研究ツールとなり得る。しかしながら, tdTomato マウスにおいて摘出臓器単位での蛍光イメージングや, 全身切片による組織学的検索は行われている^{15, 16)}が, 単一細胞レベルでの赤色蛍光発現の検索は行われていない。今回, 我々は 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部位を組織学的に明らかにすると共に, これらの唾液腺由来初代培養細胞の tdTomato 赤色蛍光発現と細胞遊走能を評価した。加えて, 顎下腺組織より不死化細胞株を樹立し, 細胞表面マーカーの発現について検討した。

1. tdTomato マウスにおける唾液腺組織の蛍光発現部位の観察

遺伝子改変動物であるトランスジェニックマウスは, 様々な臓器で異常が出現する可能性があるため, 異常の有無を確認する必要がある。組織学的検索の結果, tdTomato マウスの顎下腺ならびに舌下腺の組織構造は遺伝子導入による影響は認められなかった (図 3)。腺組織の腺房には, 周囲を取り囲む筋上皮細胞や線維芽細胞が存在するが, 光学顕微鏡レベルでの見分けが不可能であり, まして蛍光観察では, 腺房周囲が強い蛍光を示していることが確認できるのみであった。本研究において tdTomato 赤色蛍

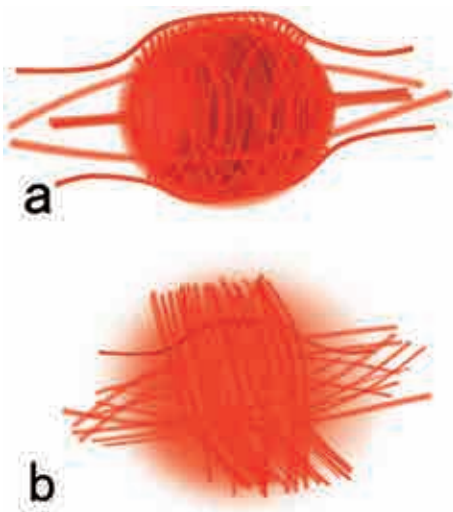


図 6. 唾液腺由来初代培養細胞の核と赤色蛍光発現の模式図

- a) 顎下腺由来初代培養細胞
- b) 舌下腺由来初代培養細胞

顎下腺由来初代培養細胞は核周囲をフェルト様に赤色蛍光が分布し, 舌下腺由来初代培養細胞は核周囲を綿様に赤色蛍光が分布していた。

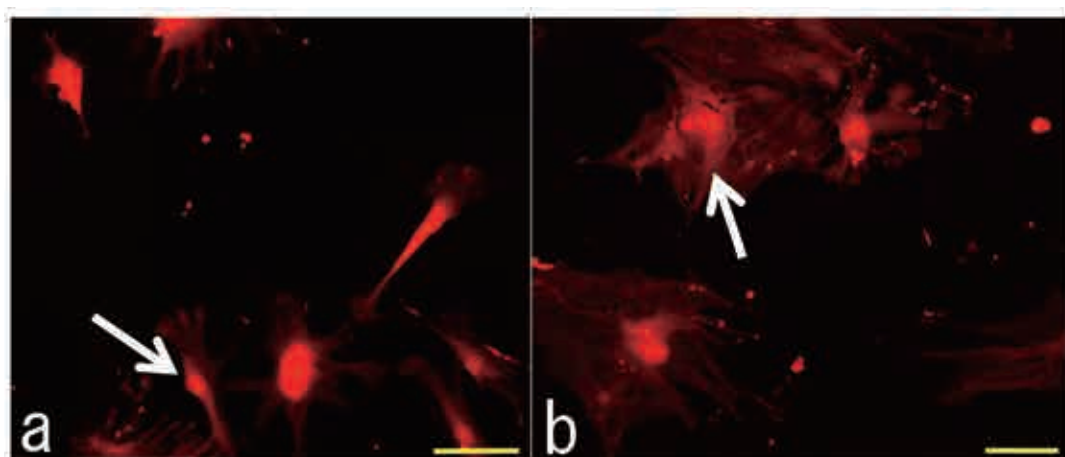


図7. 唾液腺由来初代培養細胞の典型的な形態 (bar : 100 μm)

- a) 顎下腺由来初代培養細胞
- b) 舌下腺由来初代培養細胞

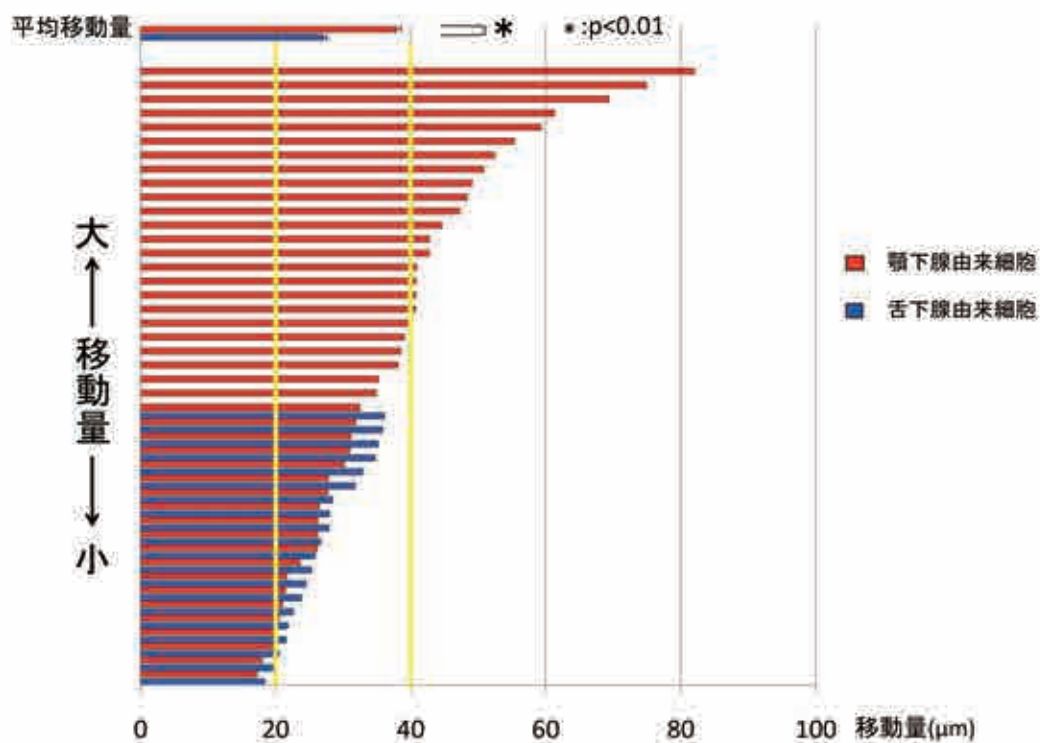


図8. 顎下腺由来初代培養細胞と舌下腺由来初代培養細胞の移動量および平均移動量 (平均値 \pm S.E.)

計測した細胞 (顎下腺由来初代培養細胞 44 細胞, 舌下腺由来初代培養細胞 20 細胞) の移動距離の大きい順に並べた。

平均移動量は顎下腺由来初代培養細胞が有意に大きかった ($p < 0.01$)。顎下腺由来初代培養細胞はほとんどが 20 μm 以上の移動量を示したが, 舌下腺由来初代培養細胞は 40 μm を超える移動量を示したものはなかった。

光発現と F-actin の局在は一致することが示された (図 4). 舌下腺では細胞質内に籠状に tdTomato 赤色蛍光が観察された. 舌下腺腺房細胞は分泌顆粒が細胞内に充満しており, ほとんど蛍光を発しないため細胞内小器官, 特に

tdTomato と共局在する F-actin は分泌顆粒により圧迫されて籠状を呈していたと推測した. 一方, 顎下腺では細胞質内の顆粒を除いて曇りガラス様に tdTomato 赤色蛍光が観察された. これは, 顎下腺腺房細胞は細胞内の核と小さな分泌顆粒を除いて全体的に F-actin が分布しているため曇りガラス様の蛍光を呈していたと推測した. 両腺組織の導管系は腺細胞に比べると細胞内の蛍光は多少低い, 所々蛍光の強い部分があった. これは筋上皮細胞または線維芽細胞の存在を示していると推測した. 一般的に F-actin は細胞外形の決定や, 核を含む細胞内小器官の位置決定などに関与する. F-actin の配列を tdTomato 赤色蛍光によりトレースすることで, 細胞の形態や遊走能も推測できると考えられた.

2. 唾液腺由来初代培養細胞における蛍光発現部位の観察と遊走能の評価

顎下腺ならびに舌下腺由来初代培養細胞の tdTomato 赤色蛍光発現と F-actin の配列はほぼすべて一致し, 両者の局在は強く相関した (図 5). また, 顎下腺由来初代培養細胞は舌下腺由来のそれと比較して有意に遊走能が高かった (図 8). 細胞が移動するためには形態の変化が必須である. すなわち, 細胞骨格であるアクチンフィラメントの再重合が重要である. 細胞が移動するときには treadmilling と呼ばれる F-actin の重合により生体膜を押し出し, 移動する前方は葉状仮足, 後方は糸状仮足と呼ばれる F-actin が存在する²⁹⁾. よって移動量の多い細胞は, 細胞の形態が移動方向に対して伸展し, 紡錘形に近い形態をしていると考えられた. 逆に移動量の少ない細胞は基質へと定着するため扁平型の形態をしていると考えられた. 実際, 遊走能の高い顎下腺由来初代培養細胞の多くは紡錘形を呈し, 遊走能の低い舌下腺由来初代培養細胞は星型や扁平型を呈していた (図 7). 一方, 仮足伸長部において F-actin と tdTomato 赤色蛍光の共局在が弱い部分が観察された. 仮足伸長部はアクチン重合が盛んな部位であるので, F-actin と tdTomato の相互作

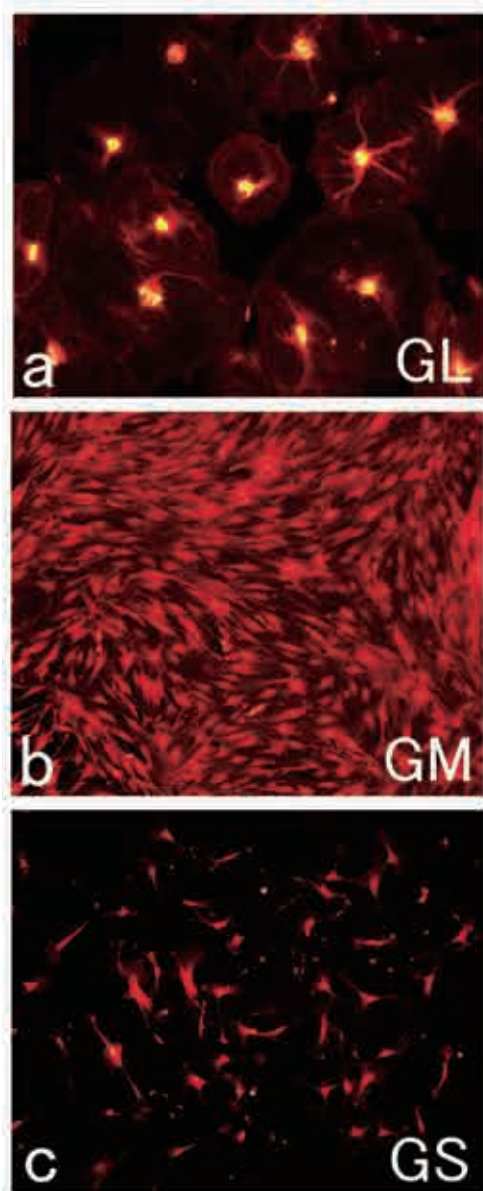


図 9. 顎下腺由来不死化細胞株の tdTomato 赤色蛍光像

細胞の形態的な大きさに従って, 大きい細胞を GL (a), 小さい細胞を GS (c), 中間の細胞を GM (b) と区分した.

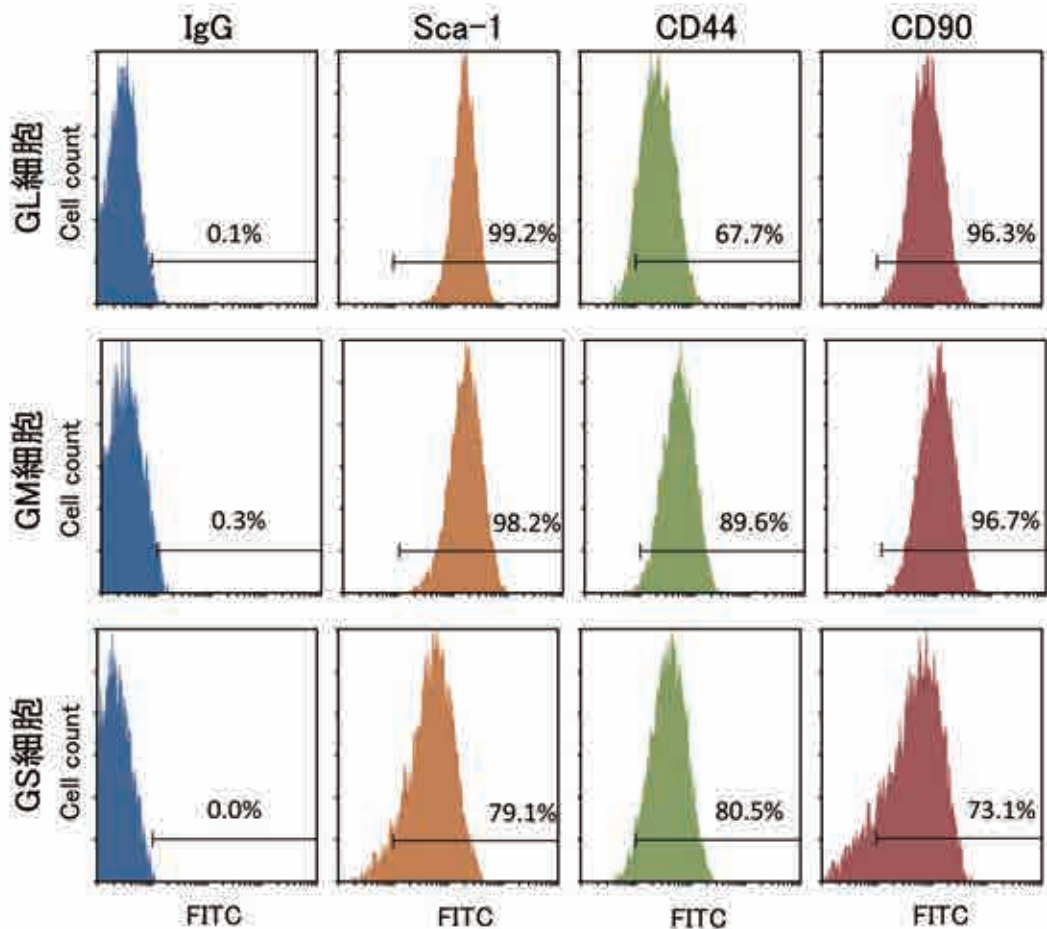


図 10. 顎下腺由来不死化細胞株の細胞表面マーカーの発現量

三細胞株のすべてにおいて Sca-1, CD44 ならびに CD90 陽性であった。GM に対して GL の CD44 は低く, GM, GL に対して GS の Sca-1 と CD90 が低かった。

用も多様化すると予測され, この多様性が, これら生体分子の共存性に影響を与えるのかもしれない。

細胞が移動すると核も移動, 形態変化しなければならない。核と細胞骨格は linker of nucleus and cytoskeleton (LINC) によって結合し, そのうちアクチンフィラメントは nuclear envelope spectrin repeat protein (nesprin) を介して核と結合することによって力学的刺激, つまり細胞が移動する際の外形変化を核に伝えている³⁰⁾。遊走能の高い細胞は核の移動や形態移動の為に, アクチンフィラメントが核と密に

結合している可能性が高い。実際, 顎下腺由来初代培養細胞は核の周囲に密にアクチンフィラメントが配列しているのが観察された。よって核周囲の F-actin と共局在する tdTomato が拡散しないため, 核周囲が明瞭に観察できたと考えた (図 5 a, 6 a)。一方, 舌下腺由来初代培養細胞は遊走能が低いことから, アクチンフィラメントと核の結合も弱く, 細胞形態維持のために多方向に細いアクチンフィラメントが配列されていると考えた。よって核周囲の tdTomato 赤色蛍光発現が綿様を呈し, 核の周囲は不明瞭に観察されたと推測した (図 5 b, 6 b)。

3. 顎下腺由来不死化細胞株の樹立とマーカー遺伝子発現の評価

我々は三系統の顎下腺由来不死化細胞株を樹立することに成功した。樹立された細胞株は、マウス唾液腺幹細胞マーカーの Sca-1, CD44 ならびに CD90 を発現することが判明した。しかしながら、それぞれの細胞株間において形態 (図 9) やマーカーの発現傾向 (図 10) に差異が認められた。GL 細胞は GM ならびに GS 細胞と比較して CD44 の発現が少なかった。CD44 の発現が少ない間葉細胞は遊走能が低いことが報告されている³¹⁾。本研究ではこれら細胞株の遊走能は検証されていないが、GL 細胞は遊走能が低いことが示唆された。一方、GS 細胞は Sca-1 ならびに CD90 の発現が他の細胞株と比較して低かった。Sca-1, CD44, CD90 は唾液腺幹細胞のみならず間葉系幹細胞マーカーとしても知られている。唾液腺由来の導管細胞や腺房細胞はそれぞれアクアポリン、クロロディン、プロトンポンプなどが機能的マーカーとして、セラチンが上皮マーカーとして知られている。今回これらの発現のチェックは行っていないが、唾液腺上皮由来の細胞は、一般的に D-MEM による培養系においては長期の生存が困難であることが報告されている^{25~27)}。従って本研究で得られた細胞株は、間葉系の細胞である可能性が非常に高かった。すなわち、今回採取・樹立された顎下腺由来不死化細胞株は、様々な組織への多分化能を有する未分化間葉細胞である可能性が示唆された。

tdTomato マウス由来の細胞は赤色蛍光を発現するので、特別な処理を加えずにリアルタイムでのトレースが可能となる。本研究では顎下腺由来不死化細胞株が未分化間葉細胞である可能性を報告したが、将来的にはこの細胞株の多分化能の評価とともに、舌下腺由来細胞でも同様の検索を行うことで、それぞれの唾液腺由来幹細胞の *in vivo* 動態トレースを目的とした実験に利用可能な細胞ツールが作製可能であると考えられた。また、顎下腺ならびに舌下腺由来初代培養細胞内の赤色蛍光の局在が F-actin と

一致する事実は、アクチン再編成を赤色蛍光によりリアルタイムに観察可能であることを意味する。さらに我々は、この細胞の移動を蛍光トレースすることで、遊走能として数値化することに成功した。すなわち、今回得られた唾液腺由来未分化間葉細胞は、その細胞骨格の変化と遊走能との関連性や、唾液腺におけるこれらの細胞の役割を明らかにするための研究ツールとして、極めて有用であると判断できた。

結 論

tdTomato マウスの顎下腺と舌下腺における赤色蛍光発現部位を組織学的に明らかにすると共に、これらの唾液腺由来初代培養細胞の tdTomato 赤色蛍光発現と細胞遊走能を評価した。加えて、遊走能の高い顎下腺由来細胞を用いて不死化細胞株を樹立し、細胞表面マーカーの発現について検討した。その結果、以下のことが示された。

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のそれと比較して高い遊走能を示した。
3. 顎下腺より未分化性の高い間葉系幹細胞の可能性を示す細胞株を樹立することに成功した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の遂行に際しご教示いただきました、岩手医科大学学生化学講座細胞情報科学分野 石崎明教授、帖佐直幸特任講師、口腔保健育成学講座歯科矯正学分野 清野幸男准教授、金野吉晃講師に心より感謝の意を表します。最後に、御支援、御協力をいただきました口腔保健育成学講座歯科矯正学分野、解剖学講座機能形態学分野、生化学講座細胞情報科学分野、医歯薬総合研究所動物研究センター、腫瘍生物学研究部門ならびにバイオイメージングセンターの皆様にご感謝いたします。

本論文の要旨の一部は第 71 回日本矯正歯科学会大会 (平成 24 年 9 月 26 日~28 日、盛岡)、

第55回歯科基礎医学会学術大会・総会（平成25年9月20日～22日，岡山），第72回日本矯正歯科学会大会（平成25年10月7日～9日，松本）において発表した。本研究は，文部科学省戦略的研究基盤形成支援事業（未来医療開発プロジェクト）の助成により実施された。なお，本研究において，利益相反はない。

引用文献

- 1) 杉山拓：中枢神経再生におけるバイオイメーシング。日本再生医療学会雑誌，9：257-263, 2010.
- 2) Tran Cao, H. S., Reynoso, J., Yang, M., Kimura, H., Kaushal, S., Snyder, C. S., Hoffman, R. M. and Bouvet, M. : Development of transgenic Cyan Fluorescent Protein(CFP) expressing nude mouse for "Technicolor" cancer imaging. *J. Cell Biochem.*, 107(2) : 328-334, 2009.
- 3) Hayashi, K., Jiang, P., Yamauchi, K., Yamamoto, N., Tsuchiya, H., Tomita, K., Moossa, A. R., Bouvet, M., and Hoffman, R. M. : Real-time imaging of tumor-cell shedding and trafficking in lymphatic channels. *Cancer Res.*, 67(17) : 8223-8, 2007.
- 4) Jiang, P., Yamauchi, K., Yang, M., Tsuji, K., Xu, M., Maitra, A., Bouvet, M. and Hoffman, R. M. : Tumor cells genetically labeled with GFP in the Nucleus and RFP in the Cytoplasm for imaging Cellular Dynamics. *Cell Cycle*, 5 : 1198-1201, 2006.
- 5) Yang, M., Reynoso, J., Bouvet, M. and Hoffman, R. M. : A transgenic red fluorescent protein-expressing nude mouse for color-coded imaging of the tumor microenvironment. *J. Cell. Biochem.*, 106 : 279-284, 2009.
- 6) Ohtsuka, M., Ogiwara, S., Miura, H., Mizutani, A., Warita, T., Sato, M., Imai, K., Hozumi, K., Sato, T., Tanaka, M., Kimura, M. and Inoko, H. : Pronuclear injection-based mouse targeted transgenesis for reproducible and highly efficient transgene expression. *Nucleic Acids Res.*, 38(22) : e198, 2010.
- 7) Shaner, N. C., Lin, M. Z., McKeown, M. R., Steinbach, P. A., Hazelwood, K. L., Davidson, M. W. and Tsien, R. Y. : Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nat. Methods*, 5 : 545-551, 2008.
- 8) Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N., Palmer, A. E. and Tsien, R. Y. : Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.*, 22 : 1567-1572, 2004.
- 9) Shu, X., Shaner, N. C., Yarbrough, C. A., Tsien, R. Y. and Remington, S. J. : Novel chromophores and buried charges control color in mFruits. *Biochemistry*, 45 : 9639-9647, 2006.
- 10) Campbell, R. E., Tour, O., Palmer, A. E., Steinbach, P. A., Baird, G. S., Zacharias, D. A. and Tsien, R. Y. : A monomeric red fluorescent protein. *PNAS*, 99 : 7877-7882, 2002.
- 11) Shimomura, O., Johnson, F. H., and Saiga, Y. : Extraction, purification, and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 59 : 223-39, 1962.
- 12) Cody, C. W., Prasher, D. C., Westler, W. M., Prendergast, F. G. and Ward, W. W. : Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry*, 32 : 1212-1218, 1993.
- 13) Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F. H. and Winant, J. : Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry*, 13 : 2656-2662, 1974.
- 14) Okabe, M., Ikawa, M., Kominami, K., Nakanishi, T., and Nishimune, Y. : 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.*, 407 : 313-319, 1997.
- 15) 桑島幸紀, 大塚正人, 石崎明, 藤村朗：赤色蛍光強発現遺伝子導入マウスにおける蛍光発現部位の形態学的検討。岩医大歯誌，37：24-37, 2012.
- 16) Ohtsuka, M., Miura, M., Gurumurthy C. B., Kimura, M., Inoko, H., Yoshimura, S. and Sato, M. : Fluorescent transgenic mice suitable for multi-color aggregation chimera studies. *Cell tissue Res.*, 350 : 251-260, 2012.
- 17) Man, Y.-G., Ball, W. D., Marchetti, L. and Hand, A. R. : Contributions of Intercalated duct cells to the normal parenchyma of submandibular glands of adult rats. *The anatomical record*, 263 : 202-214, 2001.
- 18) Kishi, T., Takao, T., Fujita, K., and Taniguchi, H. : Clonal proliferation of multipotent stem/progenitor cells in the neonatal and adult salivary glands. *Biophys. Biochem. Res. Commun.*, 340(2) : 544-52, 2006.
- 19) Lombaert, I. M. A., Brunsting, J. F., Wierenga, P. K., Faber, H., Stokman, M. A., Kok, T., Visser, W. H., Kampinga, H. H., De Haan, G. and Coppes, R. P. : Rescue of salivary gland function after stem cell transplantation in irradiated glands. *PLOS ONE*, 3 (4) : e2063, 2008.
- 20) Matsumoto, S., Okumura, K., Ogata A., Hisatomi, Y., Sato, A., Hattori, K., Matsumoto, M., Kaji, Y., Takahashi, M., Yamamoto, T., Nakamura, K., and Endo, F. : Isolation of tissue progenitor cells from duct-ligated salivary glands of swine. *Cloning Stem Cells*, 9(2) : 176-190, 2007.
- 21) Sato, A., Okumura, K., Matsumoto, S., Hattori, K., Hattori, S., Shinohara, M., and Endo, F. : Isolation, tissue localization, and cellular characterization of

- progenitors derived from adult human salivary glands. *Cloning Stem Cells*, 9(2) : 191-205, 2007.
- 22) Okumura, K., Shinohara, M., and Endo, F. : Capability of tissue stem cells to organize into salivary rudiments. *Stem Cells Int.*, 2012.
- 23) Hisatomi, Y., Okumura, K., Nakamura, K., Matsumoto, S., Satoh, A., Nagano, K., Yamamoto, T., and Endo, F. : Flow cytometric isolation of endodermal progenitors from mouse salivary gland differentiate into hepatic and pancreatic lineages. *Hepatology*, 39(3) : 667-75, 2004.
- 24) Okumura, K., Nakamura, K., Hisatomi, Y., Nagano, K., Tanaka, Y., Terada, K., Sugiyama, T., Umeyama, K., Matsumoto, K., Yamamoto, T., and Endo, F. : Salivary gland progenitor cells induced by duct ligation differentiate into hepatic and pancreatic lineages. *Hepatology*, 38(1) : 104-13, 2003.
- 25) Kreider, J. W. : Stimulation of DNA synthesis of rat salivary gland cells in monolayer cultures by isoproterenol. *Cancer Res.*, 30 : 980-983, 1970.
- 26) Brown, A. M. : In vitro transformation of submandibular gland epithelial cells and fibroblasts of adult rats by methylcholanthrene. *Cancer Res.*, 33 : 2779-2789, 1973.
- 27) Marcante, M. L. : On the in vitro behaviour of mouse submaxillary gland cells. *J. Cell. Sci.*, 13 : 441-445, 1973.
- 28) Marquez-Curtis, L. A. and Janowska-Wieczorek, A. : Enhancing the migration ability of mesenchymal stromal cells by targeting the SDF-1/CXCR4 axis. *Biomed. Res. Int.*, 2013.
- 29) Bugyi, B. and Carlier, M. F. : Control of actin filament treadmilling in cell motility. *Annu. Rev. Biophys.*, 39 : 449-470, 2010.
- 30) Mellad, J. A., Warren, D. T. and Shanahan, C. M. : Nesprins LINC the nucleus and cytoskeleton. *Cell Biology*, 23 : 47-54, 2011.
- 31) Zhu, H., Mitsuhashi, N., Klein, A., Barsky, L. W., Weinberg, K., Barr, M. L., Demetriou, A., Wu, G. W. : The role of the hyaluronan receptor CD44 in Mesenchymal Stem Cell migration in the extracellular matrix. *Stem Cells*, 24 : 928-935, 2006.

研 究

Localization of the red fluorescence and characteristics of culture cells derived from salivary gland of tdTomato mice

Shinji FURUKAWA, Kazuro SATOH, Akira FUJIMURA*, Masato OHTSUKA**, Hiroyuki MIURA

Division of Orthodontics, Department of Developmental Oral Health Science, School of Dentistry,
Iwate Medical University

*Division of Functional Morphology, Department of Anatomy, Iwate Medical University

**Division of Basic Molecular Science and Molecular Medicine, Department of Molecular Life Science,
School of Medicine, Tokai University
(Chief : Prof. Hiroyuki MIURA)

[Received : December 19, 2013 : Accepted : January 7, 2014]

Abstract : The red fluorescent transgenic (tdTomato) mice are considered to be of great value in studies of regenerative medicine. One of their noteworthy features is that cultured cells from these mice show extremely strong red fluorescence, enabling real time observation of the cells examined through the body surface of grafted animals. This study will focus on the cellular distribution of red fluorescence in the submandibular and sublingual glands of tdTomato mice, the status of red fluorescence expression, the cell migration, and the stem cell marker gene expression of cultured cells from each salivary gland.

Red fluorescence expression was observed in submandibular and sublingual glands. Interestingly, the intracellular localizations of red fluorescence coincided with those of F-actin. In addition, a difference in the intracellular red fluorescent distributions between the cells derived from each salivary gland was observed. We also found that the cells of submandibular gland origin showed significantly higher migratory activity than those of sublingual gland origin. Finally, we established that the mesenchymal stem cell marker positive cell line derived from the submandibular gland.

Established cell lines could be useful for kinetic studies of mesenchymal stem cells *in vitro* and *in vivo*.

Key Words : tdTomato, transgenic mouse, submandibular gland, sublingual gland