Osaka University Knowledge Archive

Title	ヒト唾液腺細胞のin vitroにおける増殖及び分化に関する研究
Author(s)	大倉, 正也
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3086267
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【 3 】

氏　　名	大倉正也（おおくら まさや）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学位記番号	第　9923　号
学位授与年月日	平成 3 年 10 月 14 日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	**ヒト唾液腺細胞の in vitro における増殖及び分化に関する研究**
論文審査委員	(主査) 教　授　松矢　篤三 (副査) 教　授　作田　正義　講　師　滝川　正春　講　師　松尾　三郎

論文内容の要旨

唾液腺は腺房細胞，導管細胞，筋上皮細胞など各種細胞により構成されている。これらの細胞の分化過程は現在不明であり，これを明らかにすることは発生学的に，また唾液腺腫瘍の発生母地を理解するために重要である。一方，細胞の増殖や分化機構を観察する1つの手段として細胞培養法が広く用いられている。しかし正常唾液腺細胞を長期間培養することは困難とされ，現在まで極めて短期間の培養報告があるのみである。そこで本研究はヒト顎下腺細胞を長期間 in vitro で培養し，その細胞増殖や分化過程を解析することを目的として行なった。

顎下腺初代培養細胞の上皮様形態の維持及び増殖能を指標に至適培養液の検討を行ったところ，MCDB153とDMEMを9：1に配合した基礎培地（Ca^{++}濃度，0.227mM）にインシュリン1μg／ml，デキサメサゾン10^{-6}MとEGF10ng／mlを添加した無血清9：1培地が顎下腺の培養に適した培地であることがわかった。この培地でヒト顎下腺組織を培養すると均一な立方形細胞のみの増殖がみられ，この細胞はEGF受容体を強く発現しており，その増殖はEGFに強く依存性を示した。なお，この立方形細胞は上皮様形態を維持した状態で3～8代の継代が可能であった。

上記の分離された立方形細胞は顎下腺組織において小葉間導管（以下主導管と略す），腺条部，介在部の各種導管細胞と筋上皮細胞に局在する中間繊維のケラチンを発現しており，また筋上皮細胞と主導管基底細胞に局在するビメンチンと細線維のα-smooth muscle actin（SMA）も発現していた。さらに，基底膜に局在するⅣ型コラゲンに対する抗体で立方形細胞が染色されたことより，本細胞がⅣ型コラゲン産生能を持つ基底側に位置する細胞であることが示唆された。なお，本細胞は各種導管の管腔側と粘液細胞の腺腔側に局在する human epithelial membrane antigen（EMA）や漿液細胞の指標であるアミラーゼを発現していなかった。さらに立方形細胞の超微構造は細胞内小器官の発達が

乏しく，少量のtonofilamentを持つ未分化な細胞形態を示し，筋上皮細胞に特有な微細線維を保持していなかった。以上の超微形態や抗原発現所見より立方形細胞は主導管基底細胞と一致した抗原を発現する未分化な細胞であることが示唆された。

この未分化立方形細胞は無血清９：１培地でconfluentになるまで均一な細胞分布を示すが，さらに培養を続けると細胞が散在性に重層した。これらの重層細胞はケラチンとＥＭＡ抗原を強く発現し，tonofilamentの豊富な扁平上皮様細胞の形態をとった。このことより，未分化立方形細胞が扁平上皮様導管細胞への分化能を有することが示唆された。

一方，低Ｃａ培地の無血清９：１培地のＣａイオン濃度を1.0ｍＭに上昇すると，細胞は極性を持って一列に増殖する特異な増殖形態をとった。この一列に増殖する細胞は介在部導管上皮細胞と類似した超微形態を有し，基底側細胞の抗原（ＳＭＡ，Ⅳ型コラゲン陽性）を保有していると同時に，管腔側細胞の抗原（ＥＭＡ陽性）も獲得していることがわかった。以上の結果より，一列に増殖する細胞は介在部導管前駆細胞に相当する細胞であると思われた。さらに，この介在部導管前駆細胞は細胞が密になった部位で細胞が重層し，cell clusterを形成し，拡大した粗面小胞体や分泌顆粒などの著明に発達した細胞内小器官をもつ腺房細胞様の超微形態を示した。一方，介在部導管前駆細胞を継代培養を続けると継代５，６代目より徐々に紡錘形に形態変化した細胞が出現し，それらはケラチンとビメンチンとＳＭＡの線維を細胞質に豊富に持ち，筋上皮細胞に類似した形態を示した。以上の結果をまとめると，ヒト顎下腺組織をＭＣＤＢ153とＤＭＥＭを配合した低Ｃａ培地にインシュリン，デキサメサゾンとＥＧＦを加えた無血清培地で培養すると，均一な細胞分布を示す未分化な立方形細胞が得られることがわかった。この細胞は主導管基底細胞と一致した抗原を発現する未分化な細胞で低Ｃａ培地でconfluentになると扁平上皮様導管細胞に分化する一方，培地のＣａイオン濃度上昇に伴って，介在部導管前駆細胞に分化することが示された。さらに介在部導管前駆細胞は腺房細胞や筋上皮細胞に分化することが示唆された。以上の所見から，主導管基底細胞は唾液腺を構成する各種細胞に分化する能力をもつstem cellであることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

唾液腺細胞の増殖や分化調節機構は未だ不明な点が多い。細胞培養法はこれらの研究の有用な手段の一つであるが，唾液腺細胞に適した培養条件は未だ確立されていないのが現況である。本研究はヒト顎下腺細胞の培養に適した培地条件を確立し，その細胞培養系を用いて細胞の増殖動態と分化過程の解析を行ったものである。その結果，ＭＣＤＢ153とＤＭＥＭを９：１に配合した低Ｃａ培地にインシュリン，デキサメサゾン，ＥＧＦを加えた無血清培地を用いることにより，ヒト唾液腺組織から均一な上皮細胞を長期間培養することに成功した。この分離された細胞は主導管（小葉間導管）基底細胞の性状を有する未分化な細胞で，ＥＧＦ受容体を強く発現しておりその増殖はＥＧＦに依存していることが示された。さらに，本細胞は低Ｃａ培地で密に増殖すると扁平上皮様導管細胞に最終分化す

る一方，培地のＣａ$^{++}$濃度上昇に伴って介在部導管前駆細胞に分化し，この介在部導管前駆細胞から腺房細胞や筋上皮細胞へ最終分化するという２つの分化過程をとることが示された。すなわち主導管基底細胞が唾液腺のstem cellであることが示唆された。

本研究は唾液腺の分化過程を理解する上で大きな意義を持つとともにさらに本培養系は今後，唾液腺細胞の分化調節機構の更なる解明や，唾液腺腫瘍の発生母地の理解に有用な実験系になると考えられる。

よって，本研究者は博士（歯学）の学位を得る資格があるものと認める。