The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | 器官培養法を用いたマウス胎仔顎下腺の器官形成に関する研究 |
| Author(s) | 上田, 貴史 |
| Citation | 大阪大学, 2002, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/43655 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

【15】

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 上田貴史（うえだ たかし） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博　士（歯　学） |
| 学位記番号 | 第　16929　号 |
| 学位授与年月日 | 平成14年3月25日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当<br>歯学研究科歯学臨床系専攻 |
| 学位論文名 | **器官培養法を用いたマウス胎仔顎下腺の器官形成に関する研究** |
| 論文審査委員 | （主査）<br>教　授　松矢　篤三<br>（副査）<br>教　授　由良　義明　　助教授　小川　裕三　　講　師　岩本　容泰 |

## 論文内容の要旨

【研究目的】

唾液腺の発生は胎生期の肥厚した口腔上皮が索状に間葉組織中に嵌入し、10～12個の細胞で構成される蕾状の細胞塊として増殖することから始まる。その後、様々な増殖や分化の調節を受けながらその細胞塊は分枝し、分泌終末部や導管系組織が形成される。唾液腺の発生については現在まで様々な研究がなされており、器官培養法を用いた研究は経時的な形態変化を観察するのに有用である。唾液腺組織形成には上皮組織と間充織との間には様々な factor が関与しながら発生・分化し、器官形成を調節している。本研究では細胞外基質分解酵素や細胞成長因子の器官形成での影響を検索するための最も適した器官培養条件を検討した上で、唾液腺発生過程下での組織構築における細胞外基質分解酵素の働き、ならびにそれらを調節している細胞成長因子の役割を明らかにしようと試みた。

【方法】

器官培養法：マウス胎仔顎下腺の器官培養は Clifford Grobstein の方法に準じて行った。ICR 系妊娠マウスから胎生13日目の胎仔を取り出し、実体顕微鏡下にて顎下腺組織を摘出した。100 $\mu$g/ml のアスコルビン酸を添加した無血清合成培地 BGJb を増殖培養液とし、37℃　5％ $CO_2$気相下にて、ポアーサイズ0.4 $\mu$m の culture membrane 上で培養を行った。増殖培養液の交換は 2 日毎に行い、形態変化については位相差顕微鏡下で継時的に観察した。また蛋白分解酵素阻害剤としてペプスタチン、アプロチニン、アミロライド、1-10フェナントロリンを用いた。

組織形態の観察：各胎齢の顎下腺および器官培養組織を10％中性ホルマリンにて固定・パラフィン包埋後、薄切標本を作製し、ヘマトキシリン－エオジン染色を行った。

ザイモグラフィー：細胞溶解液にて可溶化した器官培養組織を SDS 化し、ゼラチンを基質とした10％ポリアクリルアミドゲルおよびプラスミノーゲン添加のカゼイン基質とした10％ポリアクリルアミドゲルに展開した。15mA・120分の条件下で電気泳動後、ゲルを incubation buffer に浸し、37℃、48時間反応させた後、クマシーブルーにて染色を行った。

RT-PCR 法：各胎齢のマウス顎下腺組織から QIAGEN RNeasy mini kit を用いて全 RNA を回収した。全 RNA を鋳型として相補鎖 DNA を作製し、MMP-2、膜貫通型マトリックスメタロプロテアーゼ（MT-MMP）、u-PA、ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベーターレセプター（u-PAR）、上皮成長因子レセプター（EGF-R）、血小板

由来増殖因子αレセプター（PDGF-Rα）のプライマーを用いてPCRを行った。
BrdU Proliferation Assay：5'-ブロモ-2'-デオキシウリジン（BrdU）を添加した培地で1時間培養後、組織を10%中性ホルマリンにて固定した。パラフィン包埋後、4μmに薄切した標本を作製し、抗BrdU抗体を用いて反応させ、染色を行った。光学顕微鏡にて陽性細胞を計測し、陽性細胞率を算定した。

【結果】
① 無血清培地を用いた顎下腺器官培養では、腺房様上皮細胞塊の個数は経時的に増加し、72時間後には培養開始時の10倍以上に増加した。一方10%ウシ胎仔血清を含むHAM F-12培地では72時間の培養にて形成された上皮細胞塊数は無血清培地での培養時とほとんど差はなかったが、血清添加培地では96時間以降も分枝を認め、168時間まで培養可能であった。両培地における器官培養法での組織学的所見では大きな差異はなかった。経時的に発達・形成された腺組織はin vivoにおける充実性の細胞塊の増殖と分枝を認めるpseudoglandular stageから複雑に分枝し細胞塊の中心部に内腔形成を認めるcanalicular stageに相当していた。
② マウス胎仔顎下腺器官形成における種々の細胞外器質分解酵素の関与をRT-PCR法にて検索を行った結果、胎齢13日から生後7日齢の全ての顎下腺組織中にMMP-2、MT-MMP、u-PA、u-PARのmRNAの発現を認めた。増殖培養液に添加した種々の細胞外基質分解酵素阻害剤の中でu-PAを阻害するアミロライドとMMP-2を阻害する1-10フェナントロリン添加群では上皮細胞塊の形成は完全に抑制された。さらにザイモグラフィーの結果からu-PAは器官培養72時間まで組織中に認められ、また培養24時間の組織中に活性型MMP-2を認めた。
③ RT-PCR法にてEGF-RのmRNAの発現をin vivoにおける顎下腺組織中で検索を行ったところ、すべての胎齢において発現していた。顎下腺器官培養系にEGFを100ng/mlの濃度で添加し72時間培養後、分枝した上皮細胞塊数は対照群と比べて約1.5倍に増加していた。さらにBrdUの取り込みを指標とした細胞増殖能を検索すると、EGF添加群では未添加群と比べて腺房部組織のBrdU陽性細胞率は1.6倍に上昇していた。またカゼインを基質としたザイモグラフィーにて検索を行うとu-PAの活性は増強していた。
④ RT-PCR法にてPDGF-RαのmRNAの発現をin vivoにおける顎下腺組織中で検索を行ったところ、すべての胎齢において発現が見られた。顎下腺器官培養系にPDGF-AAを10ng/mlの濃度で添加し72時間培養後、分枝した上皮細胞塊形成数は対照群と比べて約1.4倍に増加していた。さらにBrdUの取り込みを指標とした細胞増殖能を検索すると、PDGF-AA添加群では未添加群と比べて腺房部組織のBrdU陽性細胞率は1.8倍に上昇していた。ゼラチンを基質としたザイモグラフィーにて検索したところ、PDGF-AA添加群ではMMP-2の活性が24時間だけでなく48時間以降の培養試料中からも検出できた。

【結語】
本研究で確立した器官培養法は顎下腺の器官形成を検討するための有用なモデルであることを確認した。細胞外器質分解酵素であるMMF-2やu-PAはマウス胎仔顎下腺の器官形成過程において関与していることが示唆された。また、EGF、PDGF-AAは唾液腺組織構築の増殖促進活性を有しており、EGFはu-PAの活性化を、PDGF-AAはMMP-2の活性化を介して器官形成に関与している可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、無血清培地下でのマウス胎仔器官培養モデルを用いて顎下腺器官形成における細胞外器質分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ2（MMP-2）やウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベータ（u-PA）および細胞成長因子である上皮成長因子（EGF）や血小板由来増殖因子Aホモダイマー（PDGF-AA）の関与について検討したものである。その結果、MMP-2やu-PAはマウス胎仔顎下腺の器官形成過程に関与していることが明らかとなった。また、EGFおよびPDGF-AAは唾液腺組織形成の増殖促進活性を有するのみならず、EGFはu-PAの活性化を、またPDGF-AAはMMP-2の活性化を介して器官形成に関与していることが示唆された。

以上の結果は、唾液腺の発生機構を究明する上で、重要な知見を与えるものである。よって、本研究者は博士（歯学）の学位を授与するに値する。