



Title	唾液腺培養細胞の腺房細胞分化に関する解析
Author(s)	山澤, 通邦
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45201
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	やま ざわ みち くに 山 澤 通 邦
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 1 8 5 8 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 16 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学 位 論 文 名	唾液腺培養細胞の腺房細胞分化に関する解析
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 古郷 幹彦 (副査) 教 授 米田 俊之 助教授 小川 裕三 講 師 中澤 光博

論 文 内 容 の 要 旨

[緒言]

生体の器官は細胞が周囲の環境と調和を図りながら増殖、分化、アポトーシスを調節し形態形成がなされている。唾液腺は原始口腔上皮が間充織に陥入することに始まり、この上皮細胞が下層へ索状に増殖し、樹枝状に枝分かれをしつつその終末に腺房を形成して形態形成される。原始口腔上皮は多分化能を有する Stem Cell であり、周囲環境とクロストークしながら増殖・分化すると考えられている。

当研究室において白砂らが樹立したヒト顎下腺由来腺癌細胞株 HSG は多分化能を有し、これまで種々の分化が報告されている。田中と Dr. Hoffman らは HSG 細胞を Matrigel 上で培養すると腺房細胞へ分化することを発見した。Matrigel には様々な細胞外マトリックスと増殖因子が含まれているが、このうち腺房細胞分化に関わる因子については不明である。

そこで本研究においてはこの HSG 細胞を用い、唾液腺細胞分化に関わる因子を同定し、その因子からのシグナル伝達経路について検討を行った。また、その他の唾液腺悪性腫瘍細胞を用いて分化誘導の可能性について検討を行った。

[方法と結果]

Matrigel 中のどの因子が腺房細胞分化に関与するのか検討するため、Gelatin のみの gel、さらに Laminin 1 あるいは Fibronectin を Gelatin に加え gel 状としてシャーレをコートし、その上で細胞培養したところ、Laminin 1 gel 上培養においてのみ約 10 個ほどの細胞が辺縁のなめらかな球形のコロニーを形成し、HE 染色で細胞が tight に接着し核が偏芯して腺房細胞様形態をなしているのが観察された。この結果は Matrigel 上での培養結果と同様であった。腺房細胞分化には Matrigel と同様に 3D 培養の環境が必要であり、各成分にてシャーレをコートしたのみの 2D 培養では腺房細胞分化は認められなかった。

つづいてどの Integrin が分化に関わっているかを同定するため、各 Integrin に対し機能阻害する抗体を培養液中に添加して Laminin 1 gel 上で抑制実験を行ったところ、Integrin $\alpha 3$ 、 $\alpha 6$ 、 $\beta 1$ 抗体において腺房細胞分化が抑制された。

Matrigel 上での腺房細胞分化には Src family tyrosine kinase が関わっている。Laminin 1 での関与について検討する目的で c-Src dominant negative 発現 HSG 細胞 (K297M) を用いて Laminin 1 gel 上で培養したところ、細胞

は遊走してコロニーを形成するが、大小不定で辺縁形態は不整であり、核の偏芯は認めず細胞間の接着はややルーズで腺房細胞分化は認めなかった。

次に、他の唾液腺悪性腫瘍細胞における分化誘導について検討を行った。下顎骨中心性に生じた粘表皮癌の原発病巣および転移リンパ節より細胞株（以降 MEC 細胞）の樹立に成功した。MEC 細胞はシャーレ上では大きく菱形に伸張し、SMA・Vimentin の細胞骨格を有し、Cytokeratin の発現は認めず、PAS 染色陽性という細胞特性を有した。MEC 細胞および腺様嚢胞癌細胞株（以降 ACC 細胞）を用いて Laminin 1 gel 上で培養し、分化誘導について検討を行った。

MEC 細胞は Laminin 1 gel 上で培養すると、20 個程度の細胞数が辺縁の比較的滑らかな球状のコロニーを形成した。HE 染色にて核の偏芯は認めず腺房細胞様分化は認めなかったが、免疫染色にて一部に Cytokeratin (8.12, CK19)、EMA を発現する細胞を認め、導管管腔側細胞分化を認めた。一方 ACC 細胞は Laminin 1 gel 上で培養すると、細胞数 10 個程度の辺縁不整なコロニーを形成するものも認めたが、HE 染色にて核の偏芯は認めず、DAPI 染色にてクロマチンが凝集しアポトーシスを起こしているものを認めた。

[結論と考察]

HSG 細胞の腺房細胞分化には Laminin 1 からのシグナルと 3D 環境での培養が必要不可欠であり、さらに Laminin 1 は Integrin $\alpha 3 \beta 1$ 、 $\alpha 6 \beta 1$ と結合し、細胞内ドメインが Src family tyrosine kinase を介してシグナル伝達をおこなうことが明らかになった。

今回樹立した粘表皮癌細胞株 MEC 細胞を Laminin 1 gel 上培養すると導管管腔側細胞分化を認め、また、腺様嚢胞癌細胞株 ACC 細胞においては Laminin 1 gel 上培養にてアポトーシスへの誘導を認め、唾液腺悪性腫瘍に対する新しい治療法として Laminin 1 gel を用いた分化誘導療法が期待された。

論文審査の結果の要旨

HSG 細胞の腺房細胞分化には Laminin 1 かつ 3D 培養の環境が必要不可欠であり、Integrin $\alpha 3 \beta 1$ 、 $\alpha 6 \beta 1$ から Src family tyrosine kinase を介してシグナル伝達が行われることが明らかになった。

初めて粘表皮癌細胞株樹立に成功し、粘表皮癌細胞や腺様嚢胞癌細胞の Laminin 1 gel 上培養において増殖抑制を認め、分化誘導やアポトーシス誘導が示唆された。

本研究結果は唾液腺の再生と唾液腺悪性腫瘍の新しい治療法としての分化誘導療法の開発に有用な指針を与える。よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与するに十分値するものと認められる。