The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ラット顎下腺の幹細胞に関する研究
Author(s)	木本, 雅也
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46401
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

【11】

氏　　名	木本雅也（きもとまさや）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　２０２１２　号
学位授与年月日	平成 18 年３月 24 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	**ラット顎下腺の幹細胞に関する研究**
論文審査委員	（主査） 教　授　由良　義明 （副査） 教　授　豊澤　悟　　助教授　玉川　裕夫　　講　師　山田　聡

論文内容の要旨

【目的】

幹細胞は自己複製能と分化能を有する未分化細胞、言い換えると非対称分裂によって自己と分化に踏み出した娘細胞をつくり出す未分化細胞であると定義される。幹細胞は生体内のほとんどの組織に存在し、それらの修復やホメオシターシスに働いていると考えられている。唾液腺はゆっくりとではあるが絶えず turnover しており、障害を受けると再生を行なうことから、幹細胞が存在すると考えられるが、未だ同定されていない。

上皮組織に存在する幹細胞の信頼性の高い同定法として、発生中あるいは再生中の組織を ^{3}H-thymidine や bromodeoxyuridine（BrdU）でラベルし、長期間にわたる chase の後に幹細胞をラベル保有細胞（LRC）として同定する方法がある。この方法によって表皮、角膜、小腸などの幹細胞が同定されてきた。

本研究は唾液腺の幹細胞を同定する目的で行なわれ、ラットの顎下腺に LRC を出現させた。出現した LRC のうち一部のものは未分化であり非対称分裂を行なったことから、幹細胞と考えられた。

【材料と方法】

実験には雄性ウィスター系ラットを用いた。

１．LRC の出現

それぞれ４匹のラットの正常顎下腺と再生顎下腺に LRC を出現させた。正常顎下腺では、11 日齢のラットに４日間連続で BrdU を腹腔内注射投与した。投与終了後８週で顎下腺を摘出した。再生顎下腺では６週齢のラットの顎下腺の導管を外科用微小クリップで結紮した。１週間後にクリップを除去した。同日より１週間連続で BrdU を投与し、投与終了後 11 週で顎下腺を摘出した。

２．LRC の分裂

12 匹のラットの正常顎下腺に iododeoxyuridine（IdU）を用いて LRC を出現させた。上記と同様に、11 日齢のラットに４日間連続で IdU を投与した。投与終了後８週で左側顎下腺を摘出し、対側顎下腺に代償性の過形成を惹起させた。摘出の翌日から３日間連続で chlorodeoxyuridine（C1dU）を投与し、投与終了日、４日後、11 日後（それぞれ摘出３日、７日、14 日後）に残存右側顎下腺を摘出した。

３．免疫組織化学

摘出した顎下腺はメタカンで固定した後パラフィンに包埋した。切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色とBrdU、IdU、C1dU、ケラチン 18（K18）、α平滑筋アクチン（αSMA）に対する抗体を用いた免疫染色を行なった。

【結果】

1．LRC の出現

正常顎下腺では腺房、介在部導管、顆粒導管、線条部導管、排出導管のすべてに LRC が出現した。再生顎下腺では LRC は介在部導管、顆粒導管、線条部導管、排出導管に出現したが、腺房には出現しなかった。正常顎下腺、再生顎下腺共に各実質構造内では LRC は単独あるいは数個の細胞の集団として存在した。なお介在部導管では近位側に偏在し腺房に隣接していた。

2．LRC の分化マーカー発現

以上の LRC の唾液腺細胞分化マーカー（K18 とαSMA）の発現を免疫多重染色で調べたところ、大部分の LRC は分化マーカーを発現したが、腺房との境界部に位置する介在部導管の LRC と排出導管の極少数の LRC は分化マーカーを発現しなかった。

3. LRC の分裂

残存顎下腺では IdU 陽性細胞の増加と C1dU 陽性細胞の出現が見られ、細胞の分裂が亢進した。この亢進は腺房では摘出 7 日後には認められなくなったのに対し、導管では実験期間をとおして認められた。なお分裂亢進は顆粒導管では遅れ摘出後 7 日であったが、この時介在部導管では C1dU 陽性細胞が著しく減少した。導管における IdU 陽性細胞の増加の結果、同細胞は各導管の間の移行部にも頻繁に認められるようになった。なお IdU 陽性細胞の増加は小葉外線条部導管の小葉に接する部分では見られなかった。

IdU、C1dU、分化マーカーの免疫多重染色を行なうと、C1dU 投与直後には介在部導管と排出導管に存在する IdU 陽性/分化マーカー陰性の LRC に C1dU 陽性のものが認められた。この IdU 陽性/C1dU 陽性/分化マーカー陰性の細胞はその後減少し、摘出後 14 日では IdU 陽性/C1dU 陰性/分化マーカー陰性の細胞のみとなった。この間この IdU 陽性/C1dU 陰性/分化マーカー陰性の細胞に隣接して C1dU 陽性/分化マーカー陽性の腺房細胞や導管細胞がしばしば認められた。

【考察と結論】

介在部導管と排出導管に存在する LRC は分化マーカーを発現せず（未分化で）、分裂に際し IdU でラベルされた古い DNA 鎖を選択的に保持する（非対称分裂を行なう）ことから唾液腺の幹細胞と考えられた。

介在部導管の幹細胞は腺房との境界に位置したこと、ならびに片側顎下腺摘出実験におけるラベル陽性細胞の動態解析で小葉外線条部導管の小葉に接する部分を除いて各構造間に細胞の移行を示唆する所見が得られたことから、介在部導管の幹細胞は小葉内構造の維持に、排出導管の幹細胞は小葉外構造の維持に働いているものと思われた。

論文審査の結果の要旨

本研究は唾液腺の幹細胞を同定する目的で行なわれ、ラットの顎下腺にラベル保有細胞（LRC）を出現させた。

その結果、出現したラベル保有細胞のうち介在部導管と排出導管に存在する一部のものは未分化であり非対称分裂が認められたことから唾液腺の幹細胞とみなすことができた。

以上、本研究は唾液腺の幹細胞をはじめて同定したもので、今後の唾液腺の発生や再生の研究に大いに寄与するものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認められる。