

Title	組織周囲堅さ環境が唾液腺分岐形態形成に及ぼす影響
Author(s)	宮嶋, 宏行
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/59265">https://hdl.handle.net/11094/59265</a>
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。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	宮嶋宏行
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第25029号
学位授与年月日	平成24年3月22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	組織周囲堅さ環境が唾液腺分岐形態形成に及ぼす影響
論文審査委員	(主査) 教授 今里 聡 (副査) 教授 竹重 文雄 准教授 中村 隆志 講師 墨 哲郎

## 論文内容の要旨

## [目的]

唾液腺は、器官形態形成の過程において上皮細胞の集合塊が分岐を繰り返し、上皮-間葉組織間の相互作用により三次元枝状組織として構築される。こういった複雑な器官形態形成には多様な因子が関与すると考えられるが、近年、細胞周囲組織の堅さなどの物理的環境がその増殖や分化を制御する重要な因子であることが報告され、注目されている。したがって、筋肉や下顎骨などの異なる種類の組織で囲まれる唾液腺の分岐形態形成も、周囲の堅さ環境によって制御されている可能性があるが、この点についてはこれまで全く検討がなされていない。

そこで本研究では、唾液腺の発生と成長が周囲の堅さ環境によって影響を受けるという仮説を *in vitro* 系の実験で検証することを目的に、まず、生体親和性ハイドロゲルを用いて唾液腺周囲の堅さ環境の再現を試みた。そして、構築した異なる堅さのハイドロゲル上でマウス唾液腺器官培養を行い、分岐形態形成の状態を詳細に検索するとともに、増殖因子の発現および細胞牽引力の点からそのメカニズムについて検討を行った。

## [方法]

## 1. 異なる堅さ環境の構築

0.3~4.0 wt%のアルギン酸ナトリウム水溶液を多孔性のアルミナプレートによるモールドに流し込んだ後、5%塩化カルシウム水溶液に浸漬して5種のアルジネートゲルを作製した。小型万能試験機を用いて一定変位量に対する最大圧縮応力を求め、各ゲルの弾性係数を算出した。また、作製した各ゲルのカルシウムイオン溶出性、アミノ酸透過性、ならびに唾液腺間葉細胞の接着性について評価した。

## 2. ゲルの堅さが唾液腺分岐形態形成に及ぼす影響の検討

ICR 系統マウス胎児(胎生13日)から摘出した顎下腺を、1で作製した弾性係数の異なるアルジネートゲル(平均弾性係数4~184 kPa)上で培養し、形態観察を行うとともに、

上皮分岐数と領域面積の測定により分岐形態形成を定量評価した。

## 3. 増殖因子の関与に関する検討

唾液腺の発生と成長に重要な増殖因子である FGF7 と FGF10 が、堅さ環境に応じた分岐形態形成変化にどのように関与しているのかを調べるため、弾性係数の異なるゲル上で培養した顎下腺における FGF7 と FGF10 の遺伝子発現を検索した。Fgf7, Fgf10 の局在は *in situ* ハイブリダイゼーションにて、発現量変化は Real-time RT-PCR にて評価した。

## 4. 細胞牽引力の関与に関する検討

堅さの異なるゲル上では唾液腺細胞の変形度が異なり、細胞牽引力に変化が生じて形態形成に違いを生じさせている可能性が考えられる。そこで、まず粒子法を用いたコンピュータシミュレーションにより、重力を模倣した力を加えた場合のゲル上での細胞の変形を解析した。次に、間葉細胞の変形によって生じる細胞牽引力の増大による影響を調べるため、弾性係数の大きい(184 kPa)ゲルにアルギニン-グリシン-アスパラギン酸(RGD)ペプチドを固定化して細胞接着性を付与し、その上で顎下腺を培養して形態変化について検討した。さらに、抗 FGF7 または抗 FGF10 抗体を添加した培養液を用いて RGD 固定化アルジネートゲル上で培養を行い、FGF7, FGF10 と細胞牽引力との関係について検討を加えた。

## [結果および考察]

アルギン酸ナトリウム水溶液の濃度を変えることで、4~184 kPa の異なる弾性係数を有する5種のシート状アルジネートゲルが得られた。5種のアルジネートゲルは、カルシウムイオン溶出性やアミノ酸透過性に差はなく、また、いずれも非常に低い細胞接着性を示すことが確認され、唾液腺器官培養のための異なる堅さ環境の構築に成功した。

顎下腺を5種のアルジネートゲル上で培養したところ、唾液腺分岐形態形成は、弾性係数の小さなゲル上では促進されたのに対し、弾性係数の大きなゲル上では抑制された。また、弾性係数が4 kPa と 184 kPa のいずれのゲル上でも、Fgf7 は上皮組織に、Fgf10 は間葉組織に発現しており、堅さの違いによるこれらの局在の変化は認められなかった。しかし、Real-time RT-PCR により、184 kPa のゲル上では Fgf7, Fgf10 とも発現量の減少が認められた。また、184 kPa のゲル上での培養でも、FGF7 または FGF10 を添加すると唾液腺の分岐は促進された。これらの結果より、堅さの違いにより生じる分岐形態形成変化に FGF7 と FGF10 が関与していることが示唆された。

コンピュータシミュレーションにより、弾性係数の小さなゲル上では細胞とゲルの接触部の伸長がより大きいことが分かり、堅さの違いに応じて細胞の変形と細胞牽引力に変化がもたらされていることが推測された。また、弾性係数の大きなゲル上であっても、RGD の固定化により細胞牽引力を高めると唾液腺の分岐が促進された。しかし、FGF7 または FGF10 の抗体を添加すると、細胞牽引力を介する分岐形態形成の抑制が認められた。

以上のように、周囲堅さ環境を再現したゲル上で唾液腺を培養した結果、弾性係数の小さな柔らかいゲル上では分岐形態形成が促進され、堅いゲル上では抑制されることが明らかとなり、組織周囲堅さ環境が唾液腺の発生と成長に影響を及ぼすことが分かった。また、堅さの違いによって FGF7 と FGF10 の遺伝子発現変化が引き起こされること、および、これらの発現変化には唾液腺間葉細胞の変形に起因する細胞牽引力が関与することが示された。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、堅さの異なるハイドロゲル上で唾液腺器官培養を行うことにより、唾液腺の分岐形態形成が周囲の堅さ環境によって影響を受けるという仮説を検証したものである。

その結果、柔らかいゲル上では唾液腺の分岐形態形成が促進され、堅いゲル上では抑制されることが分かり、FGF7、FGF10の発現変化と間葉組織の変形に起因する細胞牽引力がこの現象に関与することが明らかとなった。

以上の研究成果は、唾液腺の発生・成長の過程を理解するうえで有益な示唆を与えるものであり、本研究は博士(歯学)の学位授与に値するものと認める。