

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
窪木拓男 印	研究計画に関わる全般的な指導
松本卓也 印	研究内容、学位論文作成の指導
印	

学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野 インプラント再生補綴学分野	身分 大学院生	氏名 Mahmoud Ibrahim Mohamed Farahat
<p>論 文 題 名 <i>In vitro</i> self-organization of submandibular gland cells for reproducing branching morphogenesis (唾液腺細胞を用いた<i>in vitro</i>自己組織化と分岐形態形成の再現)</p>		
<p>論文内容の要旨 (2000字程度)</p> <p>生体組織の発生は多様な化学的、物理的因子に大きな影響を受けている。この影響により組織特異的な形態、機能の発現が制御されているのは周知の事実である。唾液腺組織を構成する腺房生成過程は分岐形態形成とよばれ、体内にある多くの腺組織に認められる特徴的な形態形成過程である。近年、三次元生体組織の <i>in vitro</i> での構築を目指すオルガノジェネシス研究が注目を集めており、唾液腺組織についても、<i>in vitro</i> での組織生成に向けた取り組みが進められている。このモデルの構築ならびにその詳細な理解は、生体組織の発生過程理解に有効なだけでなく、将来の組織再生医療への応用など、大きな発展性が見込める。本研究では、マウス胎児から取り出した顎下腺組織の細胞を元に、これら細胞の自己組織化誘導による簡便な顎下腺組織構築モデルを作製し、この自己組織化過程の詳細な細胞動態を検証した。さらにこのモデルを用いることで、基質タンパク質として重要であるフィブロネクチンが唾液腺組織形成に及ぼす影響について検討を行った。</p> <p>ICR マウス胎児 (E13) から顎下腺を採取し、ディスパーゼ、トリプシンを作用させることで、間葉系細胞、上皮系細胞の単離を行った。この単離にあたり、種々の濃度でのディスパーゼ、トリプシン処理を行い、最適化を行った。得られた細胞を遠心分離器に低速でかけることで、三次元細胞集合塊を獲得した。この細胞集合塊をマトリゲルに挿入し、DMEM/F12 培地中で培養を行った。細胞の自己組織化過程は、顕微鏡ステージ上に装備した培養器内での培養を行い、72 時間のタイムラプス観察を行った (Nikon TE2000)。</p> <p>自己組織化により生成された唾液腺や腺房のサイズ、細胞数のカウントなどは画像解析ソフト (NIH ImageJ) を用いて行った。また、管状構造の形成などを確認するため、CK-7、F-actin を用いた蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon C-1) にて観察を行った。フィブロネクチンは 0-25 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で DMEM/F12 培地中に添加し、細胞の自己組織化過程に及ぼす影響について検討を行った。</p>		

論文内容の要旨（2000字程度）

種々の細胞数で細胞塊を作製し、細胞の自己組織化を検討したところ、マトリゲル内での高度な自己組織化に成功した。また、初期細胞数の増加にともない、生成する腺房数も増加することが分かった。マウス1個体から回収できる細胞数、および細胞集合塊の操作性を考慮し、以降の実験では4万個の細胞数で自己組織化実験を行うこととした。自己組織化過程において、細胞集合塊は時間とともに球形状を示すようになり、それとともに腺房形成を進める。外側の腺房は内側の腺房と比較して大きなサイズを示すこと、特に外側の腺房において細胞増殖が多いことなどが明らかとなった。

本モデルを用いて、基質タンパク質であるフィブロネクチンを自己組織化過程に作用させたところ、顕著な管腔構造形成の促進が認められた。この管腔形成は、6 $\mu\text{g/ml}$ 以上のフィブロネクチン添加で徐々に減少する傾向が認められた。さらにこのフィブロネクチンの効果を再確認するため、顎下腺上皮組織を用いた器官培養を行ったところ、予測どおり、管腔構造の有意な増加が認められた。

本研究では顎下腺構成細胞を単離し、凝集塊を形成する最適な実験プロトコルを構築し、さらに細胞集合塊からの唾液腺組織自己組織化を達成した。また、この過程における細胞動態、腺房組織の成長を定量化し、周囲細胞同士の相互作用や周囲の力学環境により、細胞移動や増殖、腺房組織の成長が変化することを明らかにした。次に、このモデル実験系を用いた実験を通し、従来、腺房の分岐を促進する因子として知られているフィブロネクチンが、管腔形成の促進にも効いていることを示した。

このように、唾液腺組織の発生過程のメカニズムならびに新規知見を獲得する手法として、本研究モデルは有効であることが示された。