氏　　　　　名	武田　宏明
学　　　　　位	博士
専門分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第４９４３号
学位授与の日付	平成２６年３月２５日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻 （学位規則（文部省令）第４条第１項該当）
学位論文題目	生体擬似的環境の構築による唾液腺形態形成のメカニズム理解と制御
学位論文審査委員	松尾　龍二　教授　　　辻極　秀次　准教授 山本　敏男　教授

学位論文内容の要旨

近年の細胞工学，組織工学の進歩から，ボトムアップアプローチで実験室にて細胞から生体組織を合成する機運が高まっている．この達成には，生体内で起こる物理的・化学的刺激を人工材料を用いて再現した生体擬似的環境の構築が有効であると考えられる．多くのハイドロゲルは親水性で生体親和性が高く，官能基などを利用した化学修飾が可能であり，種々の生体擬似的環境の構築に適している．そこで，本研究ではハイドロゲルを用いた生体擬似的環境を基盤に，周囲環境に伴う顎下腺成長変化メカニズムの検討，および顎下腺成長制御を目的とし，以下の３つの研究を段階的に進めた.

1. 堅さ環境が顎下腺分枝形態形成に関与するメカニズムの検討
2. 機能性ペプチド修飾ゲルによる接着環境が顎下腺分枝形態形成に及ぼす影響の検討
3. 機能性ペプチド修飾ビーズを用いた顎下腺分枝形態形成制御

材料および方法

1. ゲルシート，ゲルビーズの作製

アルギン酸溶液をアルミナセラミックス製多孔性モールドへ注ぎ， $CaCl_2$溶液に浸漬して，堅さの異なるアルギン酸ゲルシートを作製し，顎下腺培養に使用した．また，アルギン酸ナトリウム水溶液にCarbodiimide hydrochloride，Sulfo-NHS，G_4RGDSペプチドを添加し，攪拌した後，透析膜を用いて反応溶液を透析後，凍結乾燥し，得られたRGD修飾アルギン酸をゲル作製に使用した．なお得られたRGD修飾アルギン酸のRGD導入率についてはアミノ酸分析装置を用いて測定した.ゲルビーズは$CaCl_2$溶液にアルギン酸，RGD修飾アルギン酸溶液を等量ずつ断続的に供給し作製した.

2. 顎下腺組織培養

胎生12.5日目のICRマウス胎児から取り出した顎下腺および顎下腺上皮組織を作製したゲルシート上で３日間培養した．ゲルシート上で，上皮組織のみの培養も行った．また，ゲル上にて培養中の顎下腺上にゲルビーズを静置した状態での培養も行った.

3. 神経細胞培養

PC12細胞をコラーゲンコートしたアルギン酸ゲル，RGD修飾ゲル上でNGFを添加した状態で培養し，神経突起の長さを測定した.

4．蛍光免疫染色

パラホルムアルデヒドにて固定した顎下腺について一次抗体として anti-FGF7，anti-FGF10，Lectin from Arachis hypogaea，anti-β-Ⅲ-Tubulin を用い，二次抗体として Alexa Fluor568 を用いて染色し，共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した．

5．Western Blotting

培養した顎下腺からタンパク質を抽出し，ウェスタンブロッティングにより FGF7，FGF10 の発現量を検討した．

結果・考察

1．堅さ環境が顎下腺分枝形態形成に関与するメカニズムの検討

顎下腺上皮組織はどの堅さ環境においても分枝せず，成長は抑制された．このことから，堅さ環境は間葉組織に影響を及ぼし，間接的に上皮組織形態変化を誘導すると考えられた．そこで，顎下腺の成長に重要な役割を果たす FGF7，FGF10 の発現について検討したところ，これらタンパク質はいずれの堅さ環境でも間葉組織に発現が認められるものの，発現量は堅さ環境により異なり，184 kPa の堅さ（堅い環境）では有意に抑制されていた．

また，堅さ環境の違いによる顎下腺神経組織と PC12 細胞の神経突起伸長について検討したところ，184 kPa の堅い環境では共に抑制されていた．

以上のことから，堅さ環境は顎下腺間葉組織における増殖因子発現の変化および神経組織の伸長に影響を及ぼし，顎下腺分枝形態形成変化に関与していることが示された．

2．機能性ペプチド修飾ゲルによる接着環境が顎下腺分枝形態形成に及ぼす影響の検討

顎下腺分枝形態形成において分枝境界部におけるフィブロネクチンの高発現が報告されている．フィブロネクチンは細胞接着に働き，RGD 配列がその接着モチーフとして重要であることが知られている．そこで，この RGD ペプチドを修飾したアルギン酸ゲルを用い，顎下腺分枝形態形成に及ぼす影響を検討した．RGD 修飾ゲルを用いて培養した顎下腺は，アルギン酸ゲルを用いた場合と比較し，FGF7，FGF10 の発現量が有意に多かった．また，RGD 修飾ゲル上で培養した顎下腺は神経組織が広く分布し，PC12 細胞の神経突起伸長も促進された．これらのことから，RGD 修飾環境は顎下腺における増殖因子発現や神経組織の伸長を誘導することが明らかとなり，RGD 修飾ゲルによる顎下腺組織の分枝形態形成制御の可能性が示唆された．

3．機能性ペプチド修飾ビーズを用いた顎下腺分枝形態形成制御

RGD 修飾ゲルにより顎下腺分枝形態形成制御の可能性が示されたので，RGD 修飾ゲルビーズを作製し，このビーズを用いて局所的な顎下腺形態制御を試みた．その結果，アルギン酸ゲルビーズと比較して，RGD 修飾ゲルビーズを置いた部位では分枝を有意に多く誘導できた．一方，ビーズサイズが大きい程分枝が多く認められたことから，物理的障壁が組織形態変化に関与することも示唆された．

結論

堅さといった物理的因子や RGD といった接着因子を付与した組織周囲環境をハイドロゲルを基に擬似的に構築することで，唾液腺分枝形態形成のメカニズム理解と制御の可能性が示された．

学位論文審査結果の要旨

近年の細胞工学、組織工学の進歩から、ボトムアップアプローチで実験室にて細胞から生体組織を合成する機運が高まっている。この達成には、生体内で起こる物理的・化学的刺激を人工材料を用いて再現した生体擬似的環境の構築が有効であると考えられる。そこで、本研究ではハイドロゲルを用いた生体擬似的環境を基盤に、胎生 12.5 日の ICR マウスから取り出した顎下腺を使用し、周囲環境に伴う顎下腺成長変化メカニズムの検討、および顎下腺成長制御の解明を目的とした。本研究は、以下の結果を得ている。

１）堅さ環境は顎下腺間葉組織における増殖因子発現の変化および神経組織の伸長に影響を及ぼし、顎下腺分枝形態形成変化に関与していることが示された。
２）RGD（接着因子）修飾環境は顎下腺における増殖因子発現や神経組織の伸長を誘導することが明らかとなり、RGD 修飾ゲルによる顎下腺組織の分枝形態形成制御の可能性が示唆された。
３）アルギン酸ゲルビーズと比較して、RGD 修飾ゲルビーズを置いた部位では分枝を有意に多く誘導できた。一方、ビーズサイズが大きい程分枝が多く認められたことから、物理的障壁が組織形態変化に関与することも示唆された。

これらの結果は、堅さといった物理的因子や RGD といった接着因子を付与した組織周囲環境をハイドロゲルを基に擬似的に構築することで、唾液腺分枝形態形成のメカニズムの理解と制御の可能性を示すものであり、新しい歯科医学研究手法として有用である。

よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。