

| | |
|---------|---|
| 氏名 | Mahmoud Ibrahim Mohamed Farahat |
| 授与した学位 | 博士 |
| 専攻分野の名称 | 歯学 |
| 学位授与番号 | 博甲第5482号 |
| 学位授与の日付 | 平成29年3月24日 |
| 学位授与の要件 | 医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当) |
| 学位論文の題目 | <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) |
| 論文審査委員 | 杉本 朋貞 教授 中野 敬介 准教授 松本 卓也 教授 |

学位論文内容の要旨

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 *in vitro* 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、*in vitro* 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。

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)。

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。

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。

論文審査結果の要旨

近年、三次元生体組織を *in vitro* で構築するオルガノジェネシス研究が注目を集めている。唾液腺組織についても、*in vitro* での組織生成に向けた取り組みが進められている。唾液腺組織自己組織化モデルの構築ならびにその詳細な検討は、生体組織の発生過程理解に有効だけでなく、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適正条件を設定することにより顎下腺組織構築モデルを作製し、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応用して、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。

その結果、適切な組織酵素処理と細胞塊作製法を応用しマトリゲル内に細胞塊を挿入、培養することで、細胞集合塊の自己組織化、ならびに唾液腺様組織の構築に成功した。この自己組織化組織は初期細胞数により、形成される腺房数が異なり、一部管腔構造を有していることが認められた。この自己組織化過程における詳細な細胞動態の検討の結果、上皮系細胞の急速な凝集と腺房の形成、ならびにその形態変化を支持するような間葉系細胞が周囲に認められた。また、上皮系細胞の速度移動は自己組織化初期において特に細胞塊の周辺部で大きいこと、形成される腺房は中心部よりも周辺部の方が有意に大きいこと、周辺部の腺房において細胞増殖率が有意に高いことなどを確認した。さらに、この自己組織化過程の組織に対し、細胞外マトリックスタンパク質のひとつであるフィブロネクチンを作用させたところ、自己組織化組織中での著しい管腔構造形成促進が認められた。この影響を確認するため、単離した実際の唾液腺上皮組織の器官培養中にフィブロネクチンを添加したところ、同様に管腔構造の形成促進が認められた。

以上の結果は、本研究の自己組織化モデルが唾液腺組織の組織化過程を *in vitro* にて再現したことを示している。また、この自己組織化モデルは、唾液腺組織発生過程の細胞動態を予測できる新しい研究用ツールとして有効であること、さらには、自己組織化過程における種々のタンパク質の影響を検討するツールとしても有効であることを示している。このように、本論文は唾液腺発生研究の新しい方法となりうるだけでなく、今後の唾液腺組織再生制御技術の確立にとっても重要な知見であるといえる。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。