

主 論 文 要 旨

報告番号	① 乙 第	号	氏 名	池 浦 一 裕
主 論 文 題 名				
Characterization of Long-Term Cultured Murine Submandibular Gland Epithelial Cells (マウス顎下腺由来上皮細胞長期培養株の特性解析)				
(内容の要旨)				
<p>加齢や放射線治療による唾液腺萎縮に伴う口腔乾燥症は患者の生活の質を著しく低下させる。失われた唾液腺の機能を回復させる方法として、唾液腺組織再生を目指した研究は数多く報告され、ヒトやラットなどから樹立した唾液腺細胞株が広く用いられている。しかしこれらの細胞株は腫瘍細胞や遺伝子改変動物由来でありマウス由来の細胞株の報告はない。そこで野生型マウスの顎下腺から細胞株を樹立し、この増殖性細胞について特性解析を行うこととした。3週齢、メスの野生型マウスより顎下腺を摘出し、ヒアルロニダーゼ、コラゲナーゼにて酵素処理を行った。単離した細胞は0.1%ゼラチンコートを行った接着培養系にて低カルシウム、無血清、コレラトキシン含有のCnT-07培地を用いて初代培養を行い、セミコンフルエントな状態で継代培養を行った。コレラトキシンは上皮細胞の増殖を促進する働きが知られており、初代培養にコレラトキシンを用いることでより効率よく唾液腺上皮細胞を培養することができた。また25継代目付近ではヘイフリック限界を認め、より増殖能が高い細胞群を選別するために限界希釈法を行い、単細胞の状態から増殖してくる群を抽出し同様の方法を3回繰り返した。初代培養では紡錘形や類円形の細胞が混在していたが、40、80継代と進むにつれて敷石状の上皮細胞に統一された。またコロニー形成率を初代培養と80継代目の細胞で比較したところ後者で有意に高い増殖能を維持していた。浮遊培養ではコロニー形成は認めず腫瘍化は否定的であった。免疫組織化学染色の結果ではkeratin-14、keratin-18、p63陽性であり唾液腺導管上皮基底細胞と同様の表現型を呈することが認められた。リアルタイムPCRによる遺伝子発現量の比較では、keratin-14およびp63は顎下腺組織と比較して培養細胞では有意に発現量は増加しており、培養が進むにつれてα-SMAの発現は著減した。またkeratin-18は初代培養ではやや増加傾向を示していたが、継代が進むにつれてその発現量は減少傾向にあり基底細胞上皮としての表現型が強くなることが確認できた。さらに初代培養と87継代目の細胞で細胞接着と細胞増殖におけるコレラトキシンの作用を比較検討したところ、初代培養においてコレラトキシンを使用することで有意に高い細胞接着および細胞増殖が得られることが確認できた。なお本研究では0.1%ゼラチンコートによる接着基質の確保、低カルシウム・無血清培地での未分化状態の維持により長期間の安定した培養が可能であったと考えられた。また縦列型反復配列 (short tandem repeat; STR) 解析による培養細胞株認証ではマウス由来細胞株であることの認証を得た。</p> <p>以上の結果より本研究で樹立した細胞株は同様の方法で再現性も確認できており、唾液腺組織再生に向けた研究において有用であると考えられた。</p>				