

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10193

研究課題名(和文)胎生唾液腺原基の培養評価系を用いた器官の凍結保存技術の開発

研究課題名(英文)Development of organ cryopreservation techniques using culture system for embryonic submandibular gland rudiments

研究代表者

柏俣 正典(Kashimata, Masanori)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：30152630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：胎仔マウスの顎下腺原基を用いて器官の凍結保存について検討した。胎生顎下腺原基を凍結保護薬に浸漬して凍結保存した。一部の原基はMr. Frostyを用いて緩徐凍結してその効果を調べた。解凍後の顎下腺原基はDMEM/F12培養液に浮かべた膜上で器官培養を行い、形成される分枝数を計測して分枝形態形成能を調べた。また、凍結後の培養顎下腺原基にEGFを作用させ、誘導されるERK1/2とAKTのリン酸化状態について解析した。その結果、凍結保護薬は顎下腺原基の凍結保護作用を示し、Mr. Frostyはその保護効果を増強した。凍結保護薬は生理機能を保持した顎下腺原基の凍結保存に有効であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

株化細胞の凍結保存は基礎研究分野で日常的に使用されている。しかし、生体の器官や臓器の凍結技術は確立されていない。胎生期のマウス顎下腺原基は、およそ300micrometer径の大きさの未成熟な器官で、体外へ取り出してフィルター上で器官培養することで上皮の分枝形態形成が観察できる。本研究では、株化細胞用の凍結保護薬が器官凍結の際にも保護効果を有することを明らかにした。顎下腺原基は小さい器官であり、凍結保護薬の浸透速度が適切であるため、器官凍結の保護効果を発揮すると推察された。今後さらに凍結保護薬に工夫をすることで、より大きな器官あるいは臓器を凍結保存可能であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the conditions for organ cryopreservation using the submandibular gland rudiments of embryonic mice. Cryoprotective agents were added to submandibular gland rudiments on the day 13 of gestation and cryopreserved. Some of the rudiments were also slow-frozen using Mr. Frosty to examine their effects. After thawing the submandibular gland rudiments, organ culture was performed on membranes floating in DMEM/F12 medium, and the number of branches formed was measured to examine branching morphogenesis ability. The status of phosphorylated ERK1/2 and phosphorylated AKT induced by EGF on cultured submandibular gland rudiments was also examined. The results showed that several cryoprotectants showed protection against freeze damage, and Mr. Frosty slightly enhanced the protective effect. The results suggest that cryoprotectants are effective for cryopreservation of submandibular gland primordia that retain biological activity.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：顎下腺原基 分枝形態形成 凍結保護薬 上皮成長因子 ERK1/2 AKT リン酸化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの生物系研究室では、遺伝的な変化を最小限に抑えるため、老化や形質転換を抑えるため、およびコンタミネーションを抑えるために凍結保存した株化細胞を日常的に利用している。株化細胞の凍結保存のためには細胞懸濁液に凍結保護薬を加えて凍結する必要がある。凍結保護薬は、凍結時の細胞構造の破壊を抑制する薬物であり、その主な成分は dimethyl sulfoxide (DMSO)、グリセロール、ショ糖、ポリエチレングリコール、およびその混合液とされる。現在では調製済みの細胞保護試薬 (CELLBANKER®や TC Protector®など) が市販されており、多くの研究室で使用されている。

器官や臓器は、単一細胞とは異なり、多種の細胞や細胞外の成分などで構成される 3次元構造物である。このような理由から生理機能を保持した器官や臓器の凍結保存は困難と考えられており、凍結保存に関する報告はほとんどない。他方、器官や臓器の凍結保存は今後さらなる進歩が見込まれる再生医療に対して有益な技術となり得るのではないかと想定されている。

2. 研究の目的

胎生期の顎下腺原基は未熟な上皮細胞と間葉細胞で構成される小さな器官である。顎下腺原基は分枝形態形成とよばれる発達様式によって腺体が形成されることが知られている。分枝形態形成は、顎下腺原基を無血清培養液中で器官培養した場合でも、観察することが可能である。すなわち顎下腺原基には分枝形態形成を調節する機構が含まれていると考えられる。しかし、顎下腺原基を酵素処理して間葉を除いてしまうと上皮の分枝形態形成は観られない。このように分枝形態形成は上皮と間葉のクロストークシステム (上皮間葉相互作用) によって制御されていると考えられる。上皮細胞成長因子 (EGF) や線維芽細胞成長因子を顎下腺原基に添加して培養を行うと器官の形成を促進させることから、細胞成長因子は上皮間葉相互作用を調節している分子群であると考えられており、これらの分子群の受容体下流の ERK1/2 や AKT カスケードが分枝形態形成の促進反応を伝達することが明らかになっている。本研究では各種の凍結保護薬中で凍結保存したマウス顎下腺原基の分枝形態形成と EGF 添加に対する ERK1/2 と AKT の活性化 (リン酸化) 状態を指標にして、有益な凍結保護薬を実証的に見出し、器官の凍結保存を可能にすることを旨とした。

3. 研究の方法

(1) マウス顎下腺原基の凍結と解凍

胎生 13 日目のマウスから顎下腺原基を取り出して実験に使用した。顎下腺原基は 4 種類の異なる媒体 DMEM/F12 培養液、10% DMSO 含有 DMEM/F12 (10% DMSO)、TC Protector® (TC)、CELLBANKER1® (CB) に浸漬し、-80 で 24 時間凍結した。凍結時には 2 つの異なる方法を用いた [サンプルボックスを用いて保存 (急速凍結)、Mr. Frosty®: -1 /min を用いて保存 (緩徐凍結)]、また、Control 群は DMEM/F12 中で 4、24 時間保存した凍結させない顎下腺原基を用いた。凍結後の顎下腺原基は、保存チューブ内に 37 で温めた DMEM/F12 を加えてピペッティングにより攪拌することで急速に解凍した。その後、顎下腺原基は、シャーレに移し、十分量の DMEM/F12 にて洗浄することで凍結保護薬を除去して実験に用いた。

(2) 顎下腺原基の器官培養

解凍した顎下腺原基は DMEM/F12 に浮かべたフィルター (Nuclepore membrane、0.1 μm pore size) 上に静置して培養した。培養顎下腺原基は、培養後 0、24、48 および 72 時間に実体顕微

鏡で観察した。培養 72 時間後の培養顎下腺上皮の分枝数(bud numbers)を計測して統計処理した。

(3) Western Blot による ERK1/2 と AKT のリン酸化状態の解析

胎生 13 日のマウス顎下腺原基を取り出し、2 つの異なる群に分けた。一方は DMEM/F12 中で 4℃、もう一方は CB 中で緩徐凍結で -80℃、24 時間保存した。凍結した顎下腺原基は、前述のように解凍と洗浄を行い、24 時間器官培養を行った。培養後、20 ng/ml EGF で 0、10、および 30 分間刺激したのち、顎下腺原基を回収して Western Blot の試料とした。PVDF 膜に転写した試料は 1 次抗体 (抗 phospho-ERK1/2 抗体、抗 total-ERK1/2 抗体、抗 phospho-AKT 抗体および抗 total-AKT 抗体) で反応させたのち、ECL Western Blotting Detection Reagent で蛍光発光した。

4. 研究成果

(1) 凍結後の培養顎下腺原基の形態観察

実体顕微鏡化での観察

胎生マウス顎下腺原基を DMEM/F12 中で 4℃、24 時間保存した後に器官培養を行った場合、正常な分枝形態形成が認められた (図 1、Control)。一方、顎下腺原基を DMEM/F12 中 (凍結保護薬未含有) で -80℃ 冷凍保存すると、解凍後の培養顎下腺原基は 0 時間から 72 時間まで形態に変化は認めず、また上皮と間葉の識別も困難な状態であった。凍結時の冷却速度の違いもほとんど認めなく、分枝形態形成も全く認められなかった (図 1、DMEM/F12 急速凍結: Quick と緩徐凍結: Slow)。

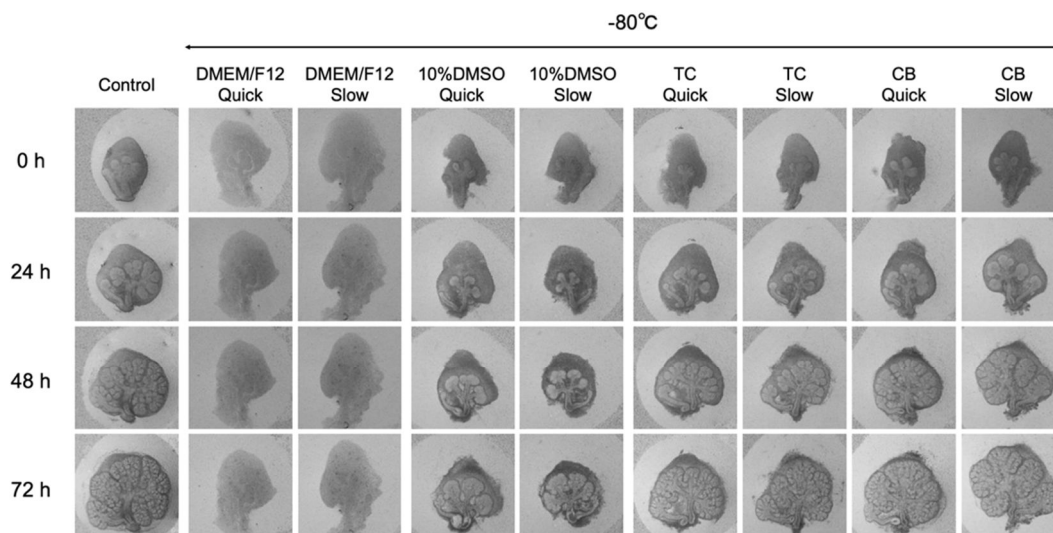


図 1. 凍結保護薬中で凍結保存した顎下腺原基の培養後の実体顕微鏡像

DMEM/F12 培養液中で 4℃、24 時間保存した顎下腺原基を Control とした。DMEM/F12 は凍結保護薬を含まない培養液中で凍結させた顎下腺原基、また、10%DMSO、TC および CB はそれぞれの凍結保護薬中で凍結させた顎下腺原基の結果を示した。

(Adachi et al. *In Vivo* より引用改変)

10%DMSO 中で -80℃ 保存した顎下腺原基では、急速凍結と緩徐凍結とも分枝形態形成が認められた。なお、一部の顎下腺上皮では個々の小葉が肥大化するような形態が観察された (図 1、急速凍結)。形成された顎下腺上皮の小葉の発育は、対照群と比較して急速凍結と緩徐凍結ともに大きく抑制された (図 1、10%DMSO 急速凍結と緩徐凍結)。したがって、10%DMSO は顎下腺原基の凍結保護効果を有することがわかった。しかし、その効果は非常に限定的であり、正常な顎下腺原基を保護を可能にするものではなかった。観察された上皮小葉の肥大化は増殖する上皮細胞に対して分枝の切れ込み反応が阻害された結果、観察されたのではないかと考えられた。

TC 中で - 80 ℃ 凍結保存した顎下腺原基は急速凍結と緩徐凍結ともに、10% DMSO で凍結した群より活発な分枝形態形成が認められた。また、培養後 0 時間では対照群と比較すると上皮の識別はやや困難であったが、24 時間以降から上皮は識別が容易となり 10% DMSO 群でみられた上皮の肥大化も認められなかった（図 1、TC 急速凍結と緩徐凍結）。

CB 中で - 80 ℃ 凍結保存した顎下腺原基は Quick と Slow とともに、10% DMSO 群や TC 群よりもより活発な分枝形態形成の進行が認められた。培養後 0 時間では上皮の識別は 10% DMSO 群や TC 群と比べると比較的容易であり、上皮の発育も対照群とほぼ同等であった（図 1、CB 急速凍結と緩徐凍結）。TC と CB を比較すると CB の方が顎下腺原基の凍結保護薬として適していると判断できた。これら 2 種の詳細な組成が不明なことから、凍結保護効果の違いについては解明できなかったが、本研究で使用した CB には血清が含まれていることから何らかの血清タンパク質がより有効に機能したことも考えられる。さらに、緩徐凍結の方が凍結保護効果を若干高めることがわかった。

分枝数の計測

Control 群と凍結群の顎下腺原基の分枝形態形成能を評価するため、培養顎下腺原基の上皮が形成する分枝数を測定した（図 2）。

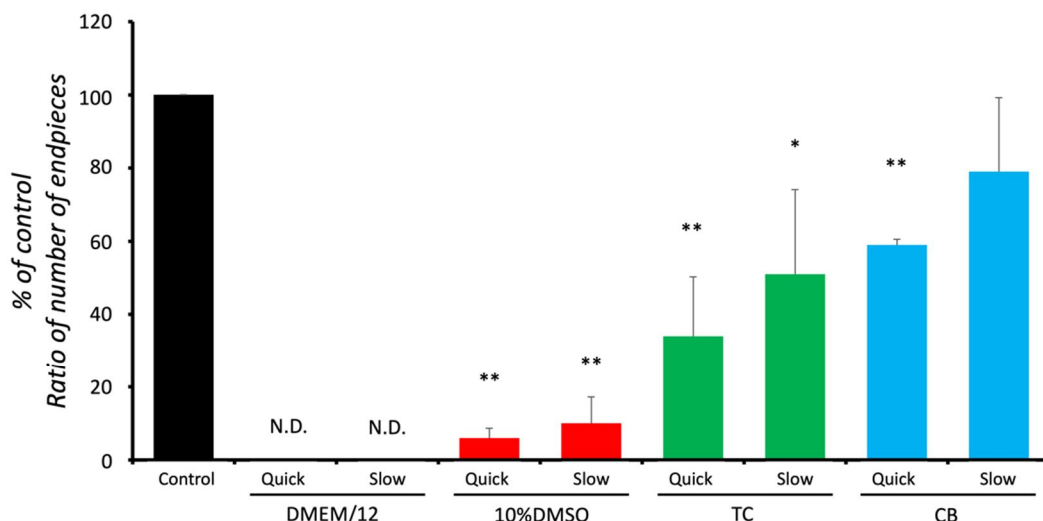


図 2. 凍結顎下腺原基の培養後の分枝形態形成におよぼす凍結保護薬の影響

DMEM/F12培養液中で 4 ℃、24時間保存した顎下腺原基の分枝形態形成（100% Control）に対する各種凍結保護薬（10%DMSO、TCおよびCB）を添加した場合の分枝数を示した。

DMEM/F12は、凍結保護薬を含まないで凍結した場合の培養顎下腺原基の分枝数を示す。本条件では不検出であった（N.D.）。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

（Adachi et al. *In Vivo*より引用改変）

DMEM/F12 中で凍結させた顎下腺原基の解凍後の器官培養の結果、上皮の識別が困難であり測定不可能であった（N.D.）。分枝数は、Control 群（100%）に対して、10%DMSO 群の急速凍結で 6%、緩徐凍結で 10%、TC 群の急速凍結で 34%、緩徐凍結で 51%、CB 群の急速凍結で 59%、緩徐凍結で 79%となった（図 2）。なお、分枝数は Control と比較して、10% DMSO 群（急速凍結、緩徐凍結）、TC 群（急速凍結、緩徐凍結）および CB 群（急速凍結）は対照群と比較して有意に減少していたが、CB 群（緩徐凍結）では有意差は認められず凍結しない顎下腺原基と同等の分枝形態形成能を示した。

(2)凍結後の培養顎下腺原基の EGF に対するシグナル応答性

DMEM/F12 中で 4℃、24 時間あるいは CB 中で -80℃ 緩徐凍結 (CB Slow)、24 時間の保存後、器官培養を行った顎下腺原基に EGF で刺激して ERK1/2 と AKT のリン酸化状態を検討した。

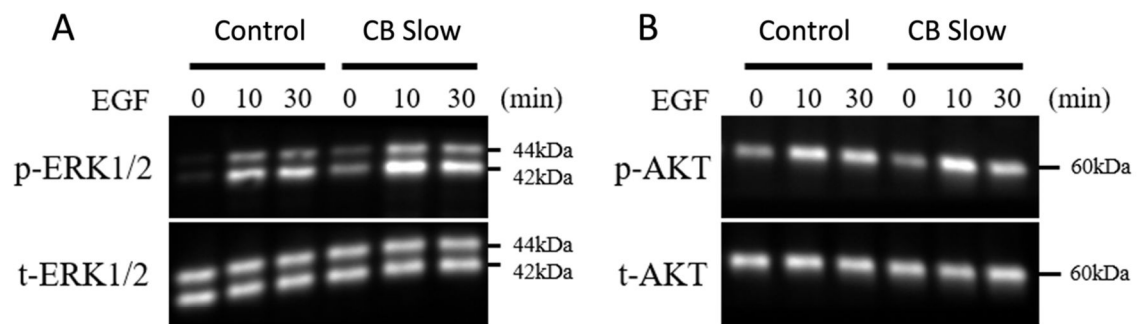


図 3. Western BlotによるEGFで誘導される解凍凍結後の培養顎下腺原基のERK1/2とAKTのリン酸化状態の解析

DMEM/F12中で4℃、24時間保存した顎下腺原基 (Control) あるいはCB中で緩徐凍結、24時間保存した顎下腺原基 (SB Slow) をそれぞれ器官培養し、EGF 添加後 0, 10, 30分のERK1/2とAKTのリン酸化状態を比較した。A: 上段がphospho-ERK1/2 (p-ERK1/2)を下段がtotal-ERK1/2 (t-ERK1/2)の結果を示した。B: 上段がphospho-AKT (p-AKT)を下段がtotal-AKT (t-AKT)の結果を示した。

(Adachi et al. *In Vivo*より引用改変)

ERK1/2 のリン酸化反応

凍結の有無に関わらず ERK1/2 の発現量に変化は認められなかった (t-ERK1/2)。Control 群では EGF 添加後 10 分で ERK1/2 のリン酸化反応が亢進し、30 分でわずかにリン酸化が低下した (図 3 A)。CB Slow 群の顎下腺原基に EGF を添加すると ERK1/2 のリン酸化は Control 群と同様に亢進した。この状態はおよそ 30 分まで継続した。

AKT のリン酸化反応

AKT の発現量は凍結の有無に関わらずに変化はなかった (t-AKT)。Control 群と CB Slow 群ともに EGF 刺激後 10 分で AKT のリン酸化が亢進し、30 分で若干低下した (図 3 B)。

以上の結果から、CB 中で緩徐凍結した顎下腺原基は、正常 (Control) にかなり近い状態の分枝形態形成が観察される状態で、-80℃、24 時間保存できた。また、CB Slow で凍結した培養顎下腺原基に EGF を添加することで分枝形態形成に関わる主要なシグナルの ERK1/2 と AKT が活性化されることが確認できた。したがって、胎仔マウス顎下腺原基を CB 中で緩徐凍結することで、ある程度の生理機能を保持したまま -80℃ で凍結保存が可能であると考えられた。顎下腺原基は未熟な細胞と細胞外成分で構成される三次元構造を持った小さい器官である。生理学的状態を保持できる凍結保護条件をさらに詳細に検討することで、より大きく、より複雑な構造の器官が凍結保存可能になると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 柏保正典	4. 巻 25
2. 論文標題 唾液腺の発生に関する研究	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 小児歯科臨床	6. 最初と最後の頁 24-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Adachi K, Ohio Y, Satoh K, Shitara A, Muramatsu Y, Kashimata M.	4. 巻 36
2. 論文標題 Cryopreservation of Biologically Functional Submandibular Gland Rudiments from Fetal Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 in vivo	6. 最初と最後の頁 3271-3277
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/invivo.12164	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 足立圭亮、村松 泰徳、住友 伸一郎、柏保 正典
2. 発表標題 胎仔マウス顎下腺原基の器官凍結保存
3. 学会等名 第73回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keisuke Adachi, Yuta Ohno, Keitaro Satoh, Akiko Shitara, Yasunori Muramatsu, Masanori Kashimata
2. 発表標題 Cryopreservation of biologically functional fetal mouse submandibular gland
3. 学会等名 Gordon Research Conference, Salivary Glands and Exocrine Biology（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 足立圭亮、柏俣正典
2. 発表標題 唾液腺原基の分枝形態形成におけるインテグリン 1 と細胞成長因子受容体シグナルのクロ ストーク
3. 学会等名 第56回日本口腔組織培養学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ等 http://scw.asahi-u.ac.jp/~pharmaco/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 慶太郎 (Sato Keitaro) (10549041)	明海大学・歯学部・准教授 (32404)	
研究分担者	設楽 彰子 (Shitara Akiko) (30508718)	朝日大学・歯学部・准教授 (33703)	
研究分担者	大野 雄太 (Ohno Yuta) (30796644)	朝日大学・歯学部・講師 (33703)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	足立 圭亮 (Adachi Keisuke)		
研究協力者	グレシック エドワード (Gresik Edward)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関