

Development of a novel ex vivo organ culture system to improve preservation methods of regenerative tissues

湯田, 智美

<https://hdl.handle.net/2324/7157311>

出版情報 : Kyushu University, 2023, 博士 (歯学), 課程博士
バージョン :
権利関係 : Creative Commons Attribution 4.0 International

氏 名 : 湯田 智美

論 文 名 : Development of a novel ex vivo organ culture system to improve preservation methods of regenerative tissues
(再生組織保存法の開発を目的とした新規生体外器官培養システムの検討)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

近年、再生技術の進歩により、多能性幹細胞や組織工学技術を用いて、肝臓や心臓および毛など様々な器官の再生が現実のものとなりつつある。しかしながら、再生臓器が移植に適した大きさおよび発生段階に達するまでには長い時間を要する。患者に再生臓器を安定的に供給するためには、再生臓器を移植に適した状態で保存する技術の開発が必要である。組織保存期間を延長する方法として、移植前ドナー臓器の低温保存や細胞凍結保存などが行われており、温度管理は保存期間に影響を与える大きな要因の一つであることがわかっている。現在のところ、生殖細胞や血液、歯髄幹細胞などの細胞の長期凍結保存は臨床応用されているが、一方で試料の厚みがあるドナー臓器や再生臓器に対する効率的な長期保存方法は未だ確立されていない。組織長期保存を目指すべく至適保存温度を検討するためには、まずそのスクリーニング方法を確立する必要がある。これまでの研究で、発生途中の歯胚を用いた生体外器官培養法を確立し、発生器官にさまざまな影響を与える因子のスクリーニングを行ってきた。この方法が培養温度などの環境因子の変化が発生途中の歯胚にもたらす変化を検討するのに有用だと考え、本研究ではマウス歯胚器官培養法を用いて、組織の長期保存に必要な温度条件を検討し、温度依存的に組織発生を制御する方法の確立を目的として研究を行った。

胎生14日齢 (E14)マウス歯胚を用いて器官培養を行い、4℃および25℃の低温条件で7日間保存したところ、歯胚発生の停止および遅延が認められた。その後、通常の培養温度である37℃に変更し、器官培養を行ったところ、歯胚の発生が再開し、正常な歯胚形成が認められた。この現象は歯胚のみならずE13マウス顎下腺でも同様に確認された。さらに、低温での保存期間を延長したところ、4℃低温保存した歯胚は保存期間21日を超えるとその後の37℃での歯胚発生率が低下した。さらに、28日間低温保存したところ、4℃保存群ではその後の37℃での歯胚発生がみられなかったのに対し、25℃保存群では低温保存した歯胚のうち40%で37℃での歯胚発生再開が見られた。また、37℃で再発生させた歯胚をエナメル上皮分化マーカーである抗Epiprofin (EPFN) 抗体で免疫染色したところ、4℃で21日以上低温保存した歯胚では歯胚構造を認めず、EPFNの発現が見られなかったのに対し、25℃保存群では28日間低温保存した歯胚においても歯胚構造及び歯胚上皮部分へのEPFN発現が見られた。以上の結果から、4℃での長期保存では歯胚の発生再開が阻害され、歯胚長期低温保存には25℃の方が有利である可能性が示唆された。

さらに、培養温度が歯胚の形態形成に与える影響を確認するため、それぞれ37℃、33℃、29℃、25℃および4℃で10日間低温培養した歯胚の形態解析を行ったところ、37℃から4℃

へ培養温度が低下するにつれ、段階的に歯胚の形態形成が遅延し、4℃保存した歯胚では形態変化が認められなかった。また、低温培養が歯胚の分化に与える影響について解析するため、歯胚分化マーカーである Efn、AmeloD、ameloblastin および dentin sialophosphoprotein の発現を RT-qPCR 解析で確認したところ、分化マーカーの発現も培養温度が下がるにつれて発現が低下することが確認された。また、4℃あるいは25℃で10日間低温保存した歯胚における幹細胞マーカー sex-determining region Y-box 2 および歯の発生初期のマーカー paired like homeodomain 2、paired boxed 9 および msh homeobox 1 の発現を RT-qPCR 解析にて確認したところ、4℃保存群と比較して25℃保存群では歯の幹細胞マーカーや初期分化マーカーの発現が維持されており、低温保存後の37℃における歯胚発生率に影響している可能性が示唆された。また、25℃の低温保存した歯胚の RT-qPCR 解析では、cold-inducible RNA-binding protein、RNA-binding motif protein 3 および serine and arginine rich splicing factor 5 などの低温ショックプロテイン (CSP) の発現の上昇がみられる一方で、4℃保存した歯胚では CSP の発現を認めなかった。この CSP の発現の有無が幹細胞性の維持に影響を与え、低温による長期保存に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

また、一般的に細胞や臓器を培養するには、培養液の pH を安定させるために、CO₂ 濃度 5% に調整した CO₂ インキュベーターが必要であるが、今後大量な組織保存を CO₂ 管理下で行うとすると大規模な装置を要する。したがって、この25℃組織低温長期保存にて CO₂ 濃度管理が必要かを確認するため、CO₂ 濃度 5% 群と大気中と同じ CO₂ 濃度 0.03% 群に分けてそれぞれ25℃で28日間歯胚を保存しその後37℃で培養し歯胚を発生させたところ、両群間で37℃での歯胚発生率及びその歯胚形態に大きな差は認められず、25℃低温保存では CO₂ 濃度管理が必須ではない可能性が示唆された。

以上の結果より、発生途中の組織を従来の培養温度より低い温度で培養することで簡便に組織発生段階を制御し、組織長期保存を可能とする可能性が示唆された。また、本研究で検討した低温下での歯胚生体外器官培養法は、組織保存至適保存温度を検討するための簡便なスクリーニング方法として有用であり、またその至適温度が25℃である可能性が示された。この25℃という温度が長期組織保存に有用である理由を検討するため、今後は CSP が組織発生過程でもたらす作用についてさらなる研究が必要である。また、本研究では歯や唾液腺などの上皮間葉相互作用により発生する組織に限局して研究を行っており、血管を有する他臓器などについてもこの現象が適応できるのか検討する必要がある。

本研究は、歯の器官培養をモデルとした培養組織保存法における簡便なスクリーニング法を提供した。この方法は簡便に組織発生の程度を直接目で確認することが可能であり、今後は組織のさらなる長期保存を目指し培養液や薬剤を検討する際のスクリーニング方法としても有用であると考えられる。培養温度を制御することにより組織発生段階を調整し再生臓器の長期保存ができれば、必要に応じてタイムリーに臓器提供を行うことが可能となる (図1)。本研究で得られた知見は、今後の臓器移植技術や再生医療の進展に寄与するものである。

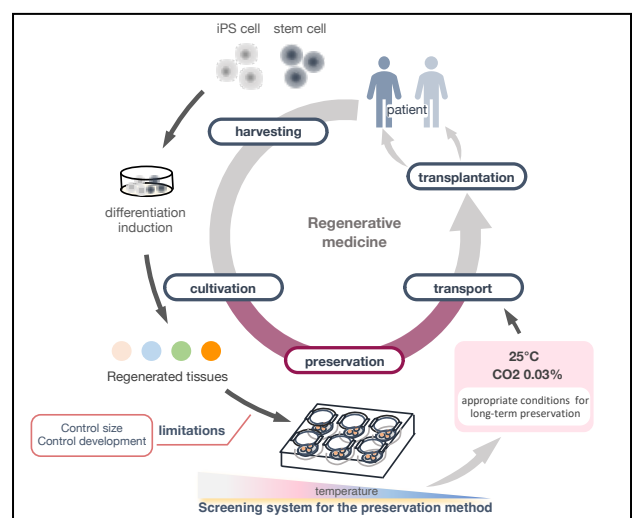


図1 本研究で検討した組織保存条件概略図