コラーゲンゲルマトリックスを用いたマウス 正常顎下腺上皮細胞の初代培養

米 田 俊 之   今 本   公   作   田 正 義

大阪大学歯学部口腔外科第二講座

〔受付：昭和60年10月25日〕

Primary culture of mouse submandibular gland epithelial cells Embedded in collagen gel matrix

Toshiyuki Yoneda, Akira Imamoto and Masayoshi Sakuda

*Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Faculty of Dentistry,
Osaka University, 1-8 Yamadaoka, Suita, Osaka*

〔Accepted publication : October 25, 1985〕

Key words: Submandibular epithelial cells / primary culture / collagen gel matrix / growth / differentiation

Abstract: Salivary epithelial cells were isolated by collagenase digestion of male mouse (C57BL/6N) submandibular gland. Isolated cells (MSG cells) were embedded in the collagen (Type I) gel matrix. MSG cells demonstrated three-dimensional outgrowth with duct-like structures extending into the matrix. Growth of the cells reached 30-fold of that at plating after 3 weeks in culture, whereas fibroblasts did not grow in the matrix. In addition, MSG cells showed significant activity of amylase secretion into the culture medium even after 3 weeks in culture. Thus, MSG cells retained not only growth but differentiation when cultured in the collagen gel matrix. It is suggested that culture of MSG cells in the collagen gel matrix is a useful technique to study the effects of a variety of hormones and growth factors on the growth and differentiation of MSG cells.

緒 言

唾液腺は、口腔領域に属する臓器の中で最も代謝活性が高く、さまざまな機能を有していることはよく知られている。中でも近年顎下腺（特にマウスの）が非常に強い生物学的活性を有する種々のポリペプチドを産出していること、そしてその産出が各種のホルモン、例えばアンドロゲン、甲状腺ホルモン、あるいはステロイドホルモン等によって強く影響を受けるということから、特に注目されている^{1,2)}。これらの点をより詳細にかつ系統的に検索するための手段の一つとして顎下腺細胞の培養は極めて有益であると考えられる。そのためこれまで色々な培養法が試みられてきた。し

かしながら、いずれの場合においても分離された顎下腺細胞は増殖能が非常に弱く、培養期間が長期にわたるにつれて細胞の活性及び分化機能が失われ、さらには分離の際に混入したと思われる線維芽細胞の過増殖が見られるようになり、唾液腺上皮細胞としての機能を長期間保持させ続けることは困難であった³⁾。1980年に Yang らは正常乳腺細胞をコラーゲンゲル内に包埋した状態で培養すると、細胞はかなりの期間、分化機能を保持しながら旺盛な増殖を示すことを報告した⁴⁾。そして彼等は同じ方法を用いて、マウス正常顎下腺上皮細胞の培養を試みた結果、乳腺細胞の場合と同様に、顎下腺細胞を三次元的に、時には管腔構造を示しながら増殖をさせることに成功した⁵⁾。また、この培養法のもう一つの大きな利点はコラーゲンゲル内では線維芽細胞は殆んど増殖し得ない

ということである。そこで、著者等も彼等の方法に準じてマウス正常顎下腺上皮細胞の培養を試みた。

実験方法

1. マウス顎下腺上皮細胞 (MSG 細胞) の分離。

生後6~8週齢の雄 C57 BL/6N マウスより周囲の結合組織を可及的に除去した両側顎下腺を採取 (湿重量1g 前後) し、細切後10ml/g 組織の割合で0.1%コラゲナーゼ (クラスII, Cooper Bio-medical, Hank の平衡塩類溶液に溶解) 中で、ゆっくり攪拌しながら室温にて12時間⁶⁾消化した。得られた細胞懸濁液を孔径200 μ m のナイロンメッシュを通過させることによりゴミを除去し、よく洗滌した後コラーゲングル内で培養をおこなった⁵⁾。ある実験においては細胞懸濁液を30ml の42% Percoll (Pharmacia, 12.6ml Percoll, 1.4ml 10倍量 Waymouth 培地, 16ml Saline A) 中で密度勾配遠心法をおこなうことにより上皮細胞を分離した⁴⁾。

2. コラーゲングル内培養法。

方法は Richards⁷⁾らに準じておこなった。まず4°C にて Cellmatrix I (新田ゼラチン)、5倍濃度のダルベコー変法 MEM 培地 (DMEM 日本製薬) 及び再構成用緩衝液 (10ml 0.05N NaOH, 220mg NaHCO₃, 477mg HEPES) を7:2:1の割合で混合しコラーゲングルを調製した。0.25ml のコラーゲングルをプラスチックシャーレ (Linbro, 16mm) 上加え (Base Layer), 37°C, 10分間放置しゲル化させた。次に1 $\times 10^5$ /ml の MSG 細胞を含んだコラーゲングル0.5ml を重層し (Top Layer) 37°C 10分間放置し、ゲル化させた。そして最後に1ml の DMEM 培地 (4.5g/l グルコース, 110mg/l ピルビン酸ナトリウム, 100単位/ml ペニシリンG, 100 μ g/ml ストレプトマイシン, 20mM HEPES, 1.1g NaHCO₃ 及び10%牛胎児血清を含む) を添加した。培養液は3日毎に交換した。

3. 細胞数の算定。

MSG 細胞を包埋したコラーゲングルを含んだプラスチックシャーレ (16mm) に1ml の0.1%コ

Fig. 1 Dispersed nuclei of MSG cells stained with 0.1% crystal violet in 0.1M citric acid. Number of stained nuclei was counted on a hemocytometer ($\times 100$).

ラーゲナーゼ溶液を加え37°C 1時間消化後、得られた細胞を0.1%クリスタル紫 (和光純薬) と0.1M クエン酸の混合液中 (1:1V/V) で超音波処理により破壊した。そして染色された核の数を血球計算板上で算定した (Fig. 1)⁶⁾。

4. アミラーゼ活性の測定

細胞から培養液中に放出されたアミラーゼ活性を Caraway 法⁸⁾に準じて測定した。尚実際の測定には和光純薬工業社製のアミラーゼテストワコーを用いた。

5. 細胞の染色

プラスチックシャーレの側壁内面に沿ってメスにより MSG 細胞を含んだコラーゲングルを切り取り、10%中性ホルマリン中で固定後、通常の方法で組織切片を作製し、ヘマトキシリン-エオシン染色を施した。

結 果

1. MSG 細胞の分離及び培養

前述の方法を用いることにより、一匹のマウスの両側顎下腺より2~3 $\times 10^6$ 個の MSG 細胞を得ることができた。また、我々の方法ではコラゲナーゼの作用時間が12時間と長いため Yang ら⁴⁾がおこなっているようにプロナーゼを用いなくても、細胞を十分に分散させることが可能であった。Percoll の使用に関しては顎下腺の摘出の際に注意深く周囲の結合組織を取り除けば、必ずしも Percoll による比重遠心をおこなわなくても線

Fig. 2 Phase contrast micrography of MSG cells cultured in the collagen gel matrix for A; 3 days B; 7 days C; 11 days D; Fibroblasts cultured in the gel for 11 days. Note that MSG cells proliferate by extending 'star-like' projections into the collagen gel, resulting in three-dimensional outgrowth. Fibroblasts in the gel showed characteristic morphology and were easily distinguishable from MSG cells.

Fig. 3 Light micrograph of MSG cells embedded in the collagen gel for 30 days (H-E stain, $\times 100$).

維芽細胞の混入を防ぐことができた。Yang らも同様の結果を報告している⁵⁾。培養日数の経過に伴うコラーゲンゲルマトリックス内におけるMSG細胞の形態の変化をFig. 2に示した。培養3日目頃まではMSG細胞はコロニーを形成しながら増殖したが(Fig. 2A), それ以降はFig. 2B及びCに示すように、非常に特徴的な樹枝状形態を呈しながら、そして三次元的に旺盛に増殖した。この間、線維芽細胞はFig. 2DのようにMSG細胞とは明らかに異なる形態を示し、容易に区別することができ、また培養日数の経過と共に死滅した。Fig. 2Cの状態のMSG細胞を含んだコラーゲンゲルより組織切片を作製し、H-E染色をおこなった結果、MSG細胞が一部管状構造を形成している像が認められた(Fig. 3)。

Fig. 4 Growth of and release of amylase by MSG cells cultured in the collagen gel.

2. MSG 細胞の増殖。

コラーゲンゲル内に 5×10^4 個の MSG 細胞を播種し、細胞数の増加を検討したところ、細胞の増殖は培養20日前後で、ほぼ定常状態となりその数は約 1.5×10^6 個と播種時の30倍に達した (Fig. 4)。

3. MSG 細胞の機能。

顎下腺細胞の機能の一つであるアミラーゼ活性は培養3~7日の MSG 細胞において最も高く、その後活性は徐々に低下したが、培養10日頃より大きな変化はなく、20日頃まで有意の活性が認められた (Fig. 4)。

考 察

1961年に Selye ら⁹⁾がイソプロテノール投与によりラットの唾液腺が著明に増殖することを報告して以来、*in vivo*における DNA 合成の開始を調節する因子を解析するための実験系として唾液腺がよく利用されている^{10,11)}。また顎下唾液腺が産出するポリペプチドの一つである Epidermal Growth Factor (EGF) の合成がアンドロゲン依存性であることから、ホルモンによる細胞の分化機能の調節を検討するための実験系としても唾液腺が *in vivo* における興味の対象となっている^{12,13)}。にもかかわらず *in vivo* において顎下唾液腺細胞の増殖及び分化をより詳細に検討するための最も

有効な手段である細胞培養は未だ確立されていないのが現状である。顎下腺の器官培養を用いた実験が報告されているが、殆んどの場合、組織は時間の経過と共に変性に陥り、十分な実験をおこなうことができなかった¹⁴⁻¹⁶⁾。最近、井上らはシリコン処理したレンズペーパー上で分化能を保持した状態の耳下腺の器官培養をおこなうことに成功し、各種ホルモンに対する応答性について検討している¹⁷⁾。この培養法は、組織中の各種の細胞の相互作用の結果あらわれる反応を見ることができるといって生理的状态をより反映していると考えられるが、やはりその現象を解析する際に異種の細胞つまり間葉系細胞と上皮系細胞とが混在していることによる複雑性が問題になると予想される。過去において試みられた唾液腺細胞の培養は、分離された上皮性細胞が十分な増殖を示さないという大きな欠点があり、さらに培養が長期に及ぶにつれて混入した間葉系細胞の旺盛な増殖のために上皮性細胞は少数となり、もはや唾液腺細胞として扱うことができなくなる場合が殆んどであった¹⁸⁻²¹⁾。1976年になって Wigley と Frank は、explant 培養法を用いてマウス顎下腺細胞の培養をおこない、インシュリンとヒドロコルチゾンの存在下で細胞の DNA 合成が促進され、また少なくとも2週間は、顆粒管細胞の分泌機能の指標の一つであるプロテアーゼ活性を保持させることができたと報告している²²⁾。Quissell と Redman はコラーゲナーゼとヒアルロニダーゼを用いてラットの顎下腺細胞を分離し、この細胞が各種の神経作働薬に対して強い反応性を示すことを見出した²³⁾。その後これらの細胞を用いて、アミラーゼ分泌に対するカルシウムあるいはサイクリック AMP の役割について実験を行なっている^{24,25)}。しかし、彼等が実験に用いた細胞は分離直後のものであり、長期間培養した場合でもこの細胞が各種ホルモンあるいは薬剤に対して応答するか否かは不明である。さらに Oliver は同様に酵素処理により分離した耳下腺腺房細胞をイソプロテノール存在下で培養することにより、4週間以上分化機能を保持した状態で培養することができたと報告している²⁶⁾。しかしこれらの細胞は増殖能が極めて弱いという点で問題がある。我が

国においても Takemura と Ohshika が Quissell らと同様の方法を用いてラット耳下腺細胞を分離しアミラーゼ分泌に対する各種薬剤の効果を検討しているが、彼等の場合も分離直後の細胞を用いて実験をおこなっている²⁷⁾。正常唾液腺細胞の増殖能が非常に低いという問題を腫瘍化した唾液腺細胞を利用することにより克服しようとする試みも数多くなされている。Wigley²⁸⁾および Knowles と Frank²⁹⁾は explant 培養により遊離増殖してきた唾液腺上皮細胞を dimethylbenz (a) anthracene (DMBA) で処理することにより癌化した細胞を確立した。そしてこれらの細胞を *in vivo* に戻すと腺癌を形成することを示した。しかしながら、この癌化した唾液腺上皮細胞の機能に関しては未だ明らかにされていない。機能を有することが明らかにされている癌化した顎下腺細胞としては、Barka らがマウス顎下腺に DMBA を注射することにより誘発させた腫瘍より分離、確立した細胞がある。この細胞は、顎下腺顆粒管細胞の機能である EGF、レニン及びペプチターゼの産出能を有していることが証明されており³⁰⁾、今後非常に有益な実験モデルになると考えられる。一方我が国においても、Shirasuna らが、照射を受けたヒト唾液腺より癌細胞の分離に成功しており³¹⁾、最近、この細胞が EGF と transforming growth factor- β を産出していることが明らかにされた³²⁾。このように癌化した唾液腺細胞を利用することにより正常唾液腺細胞では不可能であった増殖と分化について研究を進めることが可能である。しかし、この場合も腫瘍細胞において見られた現象をどの程度まで正常唾液腺細胞の機能と関連づけてよいのかという点で常に不安がつきまとう。

上皮性細胞の増殖および分化は間葉系細胞との相互作用の上に成り立っていることはよく知られ

ている³³⁾。特に間葉系細胞が合成分泌する細胞外基質が重要な役割を果たしていると考えられている³⁴⁾。唾液腺上皮細胞のみを分離して単層培養をおこなった場合には、支持組織としての基質が存在しないために細胞は増殖および分化能を保持できないと想像される。そこで、今回我々は Yang らの方法³⁾に準じて、タイプ I コラーゲンを支持組織として使用し、その中にマウス正常顎下腺細胞 (MSG 細胞) を包埋した状態で培養をおこなった。その結果 MSG 細胞は特徴的な樹枝状を呈しながら三次元的に旺盛に増殖した。培養 3 週間後には細胞数が約 30 倍に達したのみならず線維芽細胞の増殖は殆んど見られず、また多少活性は低下するものの、有意のアミラーゼ分泌活性を示した。さらにこの時期の細胞を組織学的に検索した結果、管腔形成が認められた。つまりコラーゲンゲル内で培養することによりこれまでの細胞培養において問題となっていた点をほぼ解決でき、しかも *in vivo* に非常に近い状態で MSG 細胞の増殖および分化を観察し得ることが明らかとなった。また Yang らは既に、この方法で培養された MSG 細胞は種々のホルモンあるいは成長因子に対して応答性を示すこと³⁵⁾そして高い EGF 産生能を有していることを報告している^{5,35)}。さらに、オートラジオグラフィによる DNA 合成の検討³⁶⁾や電顕による MSG 細胞の観察も容易におこなうことができる^{5,35)}。今後この培養法を用いることにより唾液腺細胞の機能と、それを調節する因子等についてより詳細に、系統的にそして生化学的に検討を加えていきたい。またこの細胞を化学物質あるいはウイルス等によりトランスホームさせることにより発癌過程における多様な変化を追求し、唾液腺腫瘍の病態の把握に役立てたいと考えている。

抄録：マウス正常顎下腺細胞 (MSG 細胞) の分離及び培養を試みた。顎下腺を細切後、コラーゲナーゼで消化し、分離された細胞をコラーゲンゲル内に包埋し培養をおこなった。MSG 細胞は樹枝状形態を示しながら三次元的に旺盛に増殖するのみならず *in vivo* に類似した管腔形成を示した。一方線維芽細胞の増殖は全く認められなかった。さらに、MSG 細胞は培養 3 週間前後有意のアミラーゼ分泌活性を保持していた。つまり MSG 細胞をコラーゲンゲル内で培養することにより高い増殖能と分泌機能を保持した状態で維持することが可能であることが明らかとなった。今後この培養を用いて、種々の薬剤あるいはホルモン及び成長因子の顎下腺細胞に対する影響を検討していきたい。

文 献

- 1) Barka, T. : Biologically active polypeptides in submandibular glands. *J. Histochem. Cytochem.* **28** : 836-859, 1980.
- 2) Gresik, E. W. : Postnatal developmental changes in submandibular glands of rats and mice. *J. Histochem. Cytochem.* **28** : 860-870, 1980.
- 3) 田隈泰信, 市田篤郎, 久米川正好 : 唾液腺の培養. *齒科ジャーナル* **16** : 561-567, 1982.
- 4) Yang, J., Richards, J., Guzman, R., Imagawa, W. and Nandi, S. : Sustained growth in primary culture of normal mammary epithelial cells embedded in collagen gels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77** : 2088-2092, 1980.
- 5) Yang, J., Flynn, D., Larson, L. and Hamamoto, S. : Growth in primary culture of mouse submandibular epithelial cells embedded in collagen gels. *In Vitro* **18** : 435-442, 1982.
- 6) Ehmann, U. K., Peterson, W. D. and Misfeld, D. S. : To grow mouse mammary epithelial cells in culture. *J. Cell Biol.* **98** : 1026-1032, 1984.
- 7) Richards, J., Larson, L., Yang, J., Guzman, R., Tomooka, Y., Osborn, R., Imagawa, W. and Nandi, S. : Method for culturing mammary epithelial cells in a rat tail collagen gel matrix. *J. Tissue Cult. Method* **8** : 31-36, 1984.
- 8) Caraway, W. T. : A stable starch substrate for the determination of amylase in serum and other body fluids. *Am. J. Clin. Path.* **32** : 67-99, 1959.
- 9) Selye, H., Veilleux, R. and Cantin, M. : Excessive stimulation of salivary gland growth by isoproterenol. *Science* **133** : 44-45, 1961.
- 10) Barka, T. : Stimulation of DNA synthesis by isoproterenol in the salivary gland. *Exp. Cell Res.* **39** : 355-364, 1965.
- 11) Hand, A. R. and Ho, B. : Mitosis and hypertrophy of intercalated duct cells and endothelial cells in the isoproterenol-treated rat parotid gland. *J. Dent. Res.* **64** : 1031-1038, 1985.
- 12) Carpenter, G. and Cohen, S. : Epidermal growth factor. *Ann. Rev. Biochem.* **48** : 193-216, 1979.
- 13) Gresik, E. W., Schenkein, I., Noen, H. and Barka, T. : Hormonal regulation of epidermal growth factor and protease in the submandibular gland of the adult mouse. *Endocrinology* **109** : 924-929, 1981.
- 14) Trowell, O. A. : The culture of mature organs in a synthetic medium. *Exp. Cell Res.* **16** : 118-147, 1959.
- 15) Tapp, R. L. : An attempt to maintain cultures from the submandibular gland of the adult rat *in vitro*. *Exp. Cell Res.* **47** : 536-544, 1967.
- 16) Lucas, D. R., Perkman, E. M. and Smith, C. : The effect of insulin, steroid and other hormones on the survival of the rat salivary glands in organ culture. *Exp. Cell Res.* **60** : 262-268, 1970.
- 17) 井上秀夫, 小西洋太郎, 滝川啓子, 上野明道, 竹田義明 : 培養ラット耳下腺のホルモン応答性に関する研究. *歯基礎誌* **24** : 370-378, 1982.
- 18) Kreider, J. : Stimulation of DNA synthesis of rat salivary gland cells in monolayer cultures by isoproterenol. *Cancer Res.* **30** : 980-983, 1970.
- 19) Marcante, L. : On the *in vitro* behavior of mouse submaxillary gland cells. *J. Cell Sci.* **13** : 441-445, 1973.
- 20) Brown, A. M. : *In vitro* transformation of submandibular gland epithelial cells and fibroblasts of adult rats by methylcholanthrene. *Cancer Res.* **33** : 2779-2789, 1973.
- 21) Kanamura, S. and Barka, T. : Short term culture of dissociated rat submandibular gland cells. *Lab. Invest.* **32** : 366-372, 1975.
- 22) Wigley, C. B. and Franks, L. M. : Salivary epithelial cells in primary culture : Characterization of their growth and functional properties. *J. Cell Sci.* **20** : 149-165, 1976.
- 23) Quissell, D. O. and Redman, R. S. : Functional characteristics of dispersed rat submandibular cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76** : 2789-2793, 1979.
- 24) Quissell, D. O., Lafferty, J. L. and Barzen, K. A. : Dispersed rat parotid cells : Role of calcium and cAMP in the regulation of amylase secretion. *J. Dent. Res.* **62** : 131-134, 1983.
- 25) Quissell, D. O., Deisher, L. M. and Barzen, K. A. : The rate-determining step in cAMP-mediated exocytosis in the rat parotid and submandibular glands appear to involve analogous 26-KDa integral membrane phosphoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82** : 3237-3241, 1985.
- 26) Oliver, C. : Isolation and maintenance of differentiated exocrine gland acinar cells *in vitro*. *In vitro* **16** : 297-305, 1980.
- 27) Takemura, H. and Ohsika, H. : Contribution of extracellular and intracellular calcium to the enhanced effect of an α -adrenergic agonist on amylase release from dispersed rat

- parotid cells. J. Dent. Res. **64** : 881-885, 1985.
- 28) Wigley, C. B. : Transformation *in vitro* of adult mouse salivary gland epithelium ; a system for studies on mechanisms of initiation and promotion. Neoplastic transformation in differentiated epithelial cell system *in vitro*. edited by Franks, L. M. and Wigley, C. B., pp. 3-34, Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco, 1979.
- 29) Knowles, M. A. and Franks, L. M. : Stages in neoplastic transformation of adult epithelial cells by 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene *in vitro*. Cancer Res. **37**:3917-3924, 1977.
- 30) Barka, T., Noen, H., Michelakis, A. M. and Schenkein, I. : Epidermal growth factor, renin and peptidase in cultured tumor cells of submandibular gland origin. Lab. Invest. **42** : 656-662, 1980.
- 31) Shirasuna, K., Sato, M. and Miyazaki, T. : A neoplastic epithelial duct cell line established from an irradiated human salivary gland. Cancer **48** : 745-752, 1981.
- 32) 佐藤光信, 林 良夫, 吉田秀夫, 梁川哲雄 : ヒト唾液腺癌細胞の増殖と分化. 臨床科学 **21** : 1065-1072, 1985.
- 33) Levine, J. F. and Stockdale, F. E. : Cell-cell interactions promote mammary epithelial cell differentiation. J. Cell Biol. **100** : 1415-1422, 1985.
- 34) Wicha, M. S., Lowrie, G., Kahn, E., Bagavandoss, P. and Mahn, T. : Extracellular matrix promotes mammary epithelial growth and differentiation *in vitro*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79** : 3213-3217, 1982.
- 35) Yang, J., Larson, L. and Nandi, S. : Three-dimensional growth and morphogenesis of mouse submandibular epithelial cells in serum-free primary culture. Exp. Cell Res. **137** : 481-485, 1982.
- 36) Yang, J., Richards, J., Bowman, P., Guzman, R., Enami, J., McCormick, K., Hamamoto, S., Pitelka, D. and Nandi, S. : Sustained growth and three-dimensional organization of primary mammary tumor epithelial cells embedded in collagen gels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76** : 3401-3405, 1979.