



Title	唾液腺発生と再生における線維芽細胞へパラン硫酸鎖の役割
Author(s)	寺本, 朱里
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/101541
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 （ 寺 本 朱 里 ）

論文題名

唾液腺発生と再生における線維芽細胞へパラン硫酸鎖の役割

論文内容の要旨

【背景】

唾液腺の発生過程で見られる分枝形態形成には、上皮細胞と間葉系細胞の各々が発現する様々な成長因子とその受容体が関与している。唾液腺の発生に重要な役割を果たす成長因子として、線維芽細胞成長因子（FGF）、トランスフォーミング増殖因子（TGF β ）、上皮成長因子（EGF）などが同定されているが、これらの成長因子に共通する特徴の一つとして、ヘパラン硫酸プロテオグリカン（Heparan sulfate proteoglycan, HSPG）のヘパラン硫酸鎖（HS鎖）への結合能が知られている。HSPGはコアタンパク質とHS鎖からなり、前述した成長因子とHS鎖との結合は、成長因子の安定性と組織における成長因子の濃度勾配に関与しているが、HS鎖が唾液腺の分枝形態形成においてどのように働いているか、その詳細は明らかにされていない。また、唾液腺分枝形態形成に重要なFGF7やFGF10などは線維芽細胞により産生され、上皮細胞の受容体に結合して作用する。そのため、線維芽細胞が産生した成長因子は線維芽細胞が有するHS鎖を介して上皮細胞に作用すると考えられるが、線維芽細胞のHS鎖が上皮の分化や増殖にどのように働いているかも、その詳細は不明である。

本研究では、線維芽細胞特異的にHS鎖の形成・伸長に重要なexostosin糖転移酵素をコードする*Ext1*を欠失させることのできる遺伝子組み換えマウスを用いて、唾液腺上皮を取り囲む線維芽細胞のHS鎖欠失が唾液腺の発生・再生過程にどのように影響を及ぼすかを明らかにすることを試みた。

【材料と方法】

1. 実験動物

タモキシフェン（TX）投与により緑色蛍光で標識された線維芽細胞特異的に*Ext1*遺伝子機能を欠失するCol1CreER $^{+/-}$; ZsG $^{+/-}$; Ext1fl/fl（Ext1 KO）マウスを実験に用いた。本実験は、大阪大学遺伝子組換え実験安全委員会（遺4906）及び大阪大学歯学研究科動物実験委員会（動歯R-05-004）の承認下で実施した。

2. 胎生期顎下腺採取

妊娠が体重変化として最も早く確認でき、また、顎下腺（SMG）において*Ext1*発現が高くなる時期に近いため、胎生13.5日齢（唾液腺遺伝子発現データベースより、以下、E13.5）にTXを投与した。

まず、Col1CreER $^{+/-}$; Ext1fl/flマウスとZsG $^{+/-}$; Ext1fl/flマウスの交配によりE13.5胎仔を有する妊娠母マウスにイソフルラン吸入麻酔下でTXを投与し、その後、三種混合麻酔薬にて母マウスを安楽死させてE16.5とE18.5の胎仔を娩出した。直ちに、胎仔より実体顕微鏡下で左右のSMGを採取し、4%パラホルムアルデヒド（PFA）で固定した。Controlとして同腹仔のCol1CreER $^{-/-}$; ZsG $^{+/-}$; Ext1fl/flマウスを使用した。

3. 胎仔顎下腺の器官培養とbud数の計測

Col1CreER $^{+/-}$; Ext1fl/flマウスとZsG $^{+/-}$; Ext1fl/flマウスの交配によりE13.5胎仔を有する妊娠母マウスにイソフルラン吸入麻酔下でTXを投与した。その後、E14.5に、三種混合麻酔薬を投与し母マウスを安楽死させ胎仔を娩出した。直ちに、胎仔より実体顕微鏡下で左右のSMGを採取し、器官培養を行った。コントロールとして同腹仔のCol1CreER $^{-/-}$; ZsG $^{+/-}$; Ext1fl/flマウス（Control）を使用した。SMGの分枝形態形成を評価するために、培養後 Day 1、Day 2、Day 3、Day 4に形成されたbudの数を器官培養されたSMGの実体顕微鏡像より計測した。その後、Day 4で器官培養したSMGを4% PFAで固定した。

4. 顎下腺導管結紮・開放による唾液腺の再生実験

生後42日齢（以下、P42）のExt1 KOマウスを実験群、Col1CreER $^{+/-}$; ZsG $^{+/-}$; Ext1 $^{-/-}$ マウスをControl群としてTXを投与し、1週間後にSMGの導管結紮を施行した。まず、吸入麻酔でSMGの導管を剖出して、SMG導管基部を3-0絹糸にて結紮した。結紮2週間後にSMG導管結紮部を露出させ、絹糸を抜糸後、閉創した。結紮解除後2週間に三種混合麻酔薬の腹腔内注射により安楽死後、左右の再生SMGを採取し4% PFAで固定した。

5. 再生顎下腺組織切片の作製

採取した再生SMGは、PFA固定後、通法に従いパラフィン包埋し、パラフィン切片を作製した。パラフィン切片は通法に従い、脱パラフィン、親水処理後、HE染色、免疫組織化学的染色（免疫染色）や蛍光免疫染色に用いた。HE染色と免疫染色後の切片は脱水、透徹処理後、封入剤にて封入した。

6. 免疫組織化学的染色（免疫染色）および蛍光免疫染色

免疫染色は、一次抗体として、抗Ki67抗体、抗Laminin抗体を用いて行った。蛍光免疫染色には、一次抗体として、抗Heparan Sulfate抗体（clone 10E4）を単独で使用、また抗E-cadherin抗体と抗Occludin抗体、抗

Cytokeratin 7抗体と抗E-cadherin抗体、抗Aquaporin 5抗体と抗E-cadherin抗体を組み合わせ用いた。

7. 唾液採取と分泌唾液量の測定

唾液採取用スワブを用いて唾液を採取し、その量を測定した。安静時唾液は吸入麻酔下で、唾液採取用スワブを口腔内に挿入・維持し、唾液を吸収させた。15分後、口腔内から唾液採取用スワブを取り出し、唾液重量を測定した。安静時唾液採取は導管結紮前、導管結紮解除前、導管結紮解除後2週間の屠殺前に行った。刺激時唾液は吸入麻酔下でpilocarpine hydrochlorideを腹腔内投与し、2分経過後、口腔内に唾液採取用スワブを挿入した。15分経過後、口腔内から唾液採取用スワブを取り出し、唾液重量を測定した。刺激時唾液の採取は導管結紮解除後2週間の屠殺前に行った。

8. 統計解析

ControlとExt1 KOマウスの実験結果の検定にはMann-Whitney検定を用いて2群間の比較を行なった。

【結果】

1. Ext1 KOマウスの胎仔期顎下腺におけるend budの分化発生過程について

SMG発生における線維芽細胞特異的な*Ext1*欠損の影響を解析するため、E13.5の胎仔の母体にTXを投与し、E16.5およびE18.5の胎仔を採取した。腺房の原基となる充実性の上皮塊であるend budに注目し、SMGの単位面積あたりのend bud数を検討した結果、E18.5のSMGでは、Controlマウスに比べてExt1 KOマウスのend bud数が有意に少なかった($P < 0.0001$)。また、end budから腺腔が形成されたterminal budへの分化を検討するため、腺腔形成の指標としてタイトジャンクション構成タンパク質であるOccludin (ocln) の免疫染色を行った結果、E16.5のSMGでは、Controlマウスに比べてExt1 KOマウスでocln陽性の腺腔が少ないことが示された($P < 0.003$)。このように、Ext1 KOマウスでは、分枝形態形成と腺腔形成の抑制によりend budからterminal budへの分化過程が障害されることが示唆された。

2. Ext1 KOマウスの胎仔期顎下腺におけるend budの細胞増殖活性について

ControlマウスとExt1 KOマウスのSMGにおける上皮細胞増殖活性を検討するため、Ki67の免疫染色を行った結果、E16.5とE18.5のいずれの胎児期SMGにおいてもExt1 KOマウスではControlマウスに比べて上皮細胞の増殖活性が低下していることが示された。

3. Ext1 KOマウスの胎仔期顎下腺の器官培養におけるend budの分化発生過程について

SMGの器官培養では、その発生過程を三次元的に観察できる。器官培養後1日(Day 1)から4日目(Day 4)まで毎日観察してSMGにおけるbud数を解析したところ、3、4日目ではControlマウスに比べてExt1 KOマウスではbud数が少ないことが示された(Day 3 $P = 0.0267$ 、Day 4 $P = 0.0011$)。次に、器官培養したSMG(Day 4)をホールマウントでE-cadherinの免疫染色を行い3次的に観察した。その結果、ControlマウスではE-cadherin陽性細胞から構成されるbudの中心部にE-cadherin陰性の腔が認められるが、Ext1 KOマウスではbud内は充実性でE-cadherin陽性細胞によって占められていた。器官培養したSMG(Day 4)の組織切片では、Controlマウスでbud内にocln陽性の腺腔が認められるのに対して、Ext1 KOマウスではocln陽性の腺腔は認められず、生体での変化と同様に、Ext1 KOマウスでは、end budからterminal budへの分化に異常があることが示された。

4. Ext1 KOマウスにおける顎下腺再生過程について

再生過程における線維芽細胞特異的*Ext1*欠失の影響を解析するため、SMG導管結紮・導管開放実験を行った。導管結紮解除後2週間目のSMGをControlとExt1 KOマウスで比較したところ、再生したSMGの形態構造に著変は認められないが、SMGの面積はControlマウスに比べExt1 KOマウスでは減少していた($P = 0.0159$)。免疫染色により可視化したLaminin陽性基底膜に囲まれた腺房の面積、E-cadherin陽性細胞膜に囲まれた腺房細胞の面積を測定した結果、Ext1 KOマウスの腺房および腺房細胞は、Controlマウスに比較して、小型であることが示された(腺房 $P = 0.0095$ 、腺房細胞 $P = 0.016$)。以上より、線維芽細胞特異的*Ext1*欠失により、再生した腺房細胞サイズは小型化し、その結果、唾液分泌の機能単位である腺房も小型化するのではないかと考えた。

5. Ext1 KOマウスにおける再生した顎下腺の唾液分泌について

ControlマウスとExt1 KOマウスの再生SMGにおける唾液分泌能を検討した。SMG導管結紮前、導管結紮後2週間の導管結紮解除前、および結紮解除後2週間のマウスにおける安静時唾液分泌量を計測したところ、唾液腺結紮解除後2週間では、Controlマウスに比べてExt1 KOマウスの唾液分泌量が少ない傾向が見られた。次に、唾液腺のムスカリン受容体を刺激することで唾液分泌を刺激するピロカルピン投与後の刺激時唾液分泌能を計測したところ、Controlマウスに比べてExt1 KOマウスの唾液分泌量は低下していた($P = 0.0260$)。

以上の実験から、TX誘導性かつ線維芽細胞特異的に*Ext1*遺伝子発現を欠失するマウスSMG解析により、線維芽細胞のHS鎖の欠失は、(1) 唾液腺の発生においてend bud数の減少とend budの腺腔化を抑制すること、(2) 唾液腺の再生においては小型の腺房が再生され、唾液分泌量の減少を引き起こすことが示された。

【結語】

SMGに存在する線維芽細胞の有するHS鎖は、SMGの発生および再生において、腺房細胞の分化に重要であることが明らかとなった。本研究で得られた知見は、唾液腺再生技術の基礎情報に繋がるとと思われる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (寺本 朱里)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	豊 澤 悟
	副 査	教 授	阪 井 丘 芳
	副 査	准教授	前 田 隆 史
	副 査	講 師	犬 伏 俊 博
論文審査の結果の要旨			
<p>唾液腺発生の重要な過程である分枝形態形成には、上皮細胞と間葉系細胞の各々が発現する成長因子とその受容体を介した相互作用が関与している。これらの成長因子は、細胞表面や周囲に分布するヘパラン硫酸プロテオグリカンのヘパラン硫酸 (HS) 鎖に結合し、細胞周囲に保持されることにより、受容体に結合して機能する。このように唾液腺の分枝形態形成における成長因子の機能活性には細胞に保持される HS 鎖が重要であると考えられるが、その役割は明らかではない。</p> <p>本研究では、間葉系細胞の主体をなす線維芽細胞特異的に HS 鎖を欠失する遺伝子改変マウスを用いて、HS 鎖欠失が唾液腺の発生と再生に及ぼす影響を検討した。その結果、発生において、線維芽細胞の HS 鎖欠失は、将来の腺房となる end bud の増殖分化を抑制した。また、唾液腺導管結紮-開放実験による唾液腺再生において、線維芽細胞の HS 鎖欠失により小型の腺房が再生され、唾液分泌量が減少した。以上から、唾液腺の線維芽細胞が有する HS 鎖は、腺房細胞の発生と再生に重要な役割を有することが分かった。</p> <p>以上の結果は、唾液を分泌する腺房細胞の発生・再生機序解明に手掛かりを与え、唾液腺再生医療に重要な知見を与えるもので、博士（歯学）の学位を授与するに値するものと認める。</p>			