

Title	胎生期マウス唾液腺におけるメラトニンの役割
Author(s)	尾花, 綾
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34356
rights	© 2015 Obana-Koshino et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (尾花 綾)

論文題名

胎生期マウス唾液腺におけるメラトニンの役割

論文内容の要旨

【研究目的】

メラトニンは松果体から分泌されるホルモンであり、サーカディアンリズムの同調、抗酸化、抗腫瘍活性など多彩な作用を有している。メラトニンは松果体から分泌され血流を介して全身の器官に運ばれると考えられていたが、近年、腸管や網膜のような末梢組織からも分泌されることが明らかになった。また、成体唾液腺にメラトニンが発現しており、口腔粘膜上皮や歯胚にメラトニン受容体が発現していることから、メラトニンは唾液腺から分泌され口腔内に何等かの生理作用を有している可能性が報告された。さらに、骨、精巣、副腎などの器官形成にも関与していることから、メラトニンは唾液腺の発生にも必要である可能性が推察される。疾患の新たな治療や再生医療を行うためには器官形成の解明が重要となるが、唾液腺の分枝形態形成の詳細な分子機構は解明されていない。そこで本研究では、メラトニンの分枝形態形成への作用を解明することを目的とした。

【材料と方法】

1.胎生期マウスにおけるメラトニン合成酵素の遺伝子発現とメラトニンの発現解析

発生時期ごとの遺伝子発現を明らかにするために、ICR系妊娠マウスの胎仔から、胎生13日齢（以下、E13）、E14、E15、E16、生後1日齢（以下、P1）、P12の唾液腺を摘出した。さらに、胎生期の臓器ごとの遺伝子発現を明らかにするために、E13の唾液腺、肺、腎臓、脳、胃、肝臓を摘出した。摘出した各臓器におけるメラトニン合成酵素（AANAT、HIOMT）のmRNA発現をリアルタイムPCRにて定量した。また、胎生期唾液腺を48時間器官培養した培地中へのメラトニンの分泌量、E13と成体マウスの唾液腺中のメラトニンの発現量を高速液体クロマトグラフィーにて測定した。

2.胎生期マウスにおけるメラトニン受容体の遺伝子発現とその局在解析

1と同様にマウス胎仔から各日齢（E13、E14、E15、E16、P1、P12）の唾液腺、E13の各臓器（唾液腺、肺、腎臓、脳、胃、肝臓）におけるメラトニン受容体（MT1）のmRNA発現をリアルタイムPCRにて定量した。また、12時間器官培養した胎生期唾液腺の蛍光免疫染色により、胎生期唾液腺におけるMT1の局在を解析した。

3.唾液腺分枝形態形成におけるメラトニンの作用

メラトニンの器官形成への作用を調べるために、メラトニン（1 μM 、100 μM ）を添加した培地で、胎生期唾液腺の器官培養を行った。唾液腺の分枝形態形成と上皮の大きさを評価するために、培養後48時間、60時間に枝分かれした腺房の数（以下、分枝数）と上皮組織の大きさ（組織像により二次元的に面積で評価）を測定した。

4.分枝形態形成における抑制作用のメカニズム解析

メラトニンによる細胞増殖、アポトーシスへの影響を検討するために、メラトニンを添加した培地で48時間器官培

養した胎生期唾液腺をEdU法、およびTUNEL法により蛍光免疫染色し、陽性細胞数をImageJソフトを用いて定量した。さらに、電子顕微鏡にてメラトニン添加群とコントロール群の唾液腺上皮細胞の微細構造を解析した。隣接細胞との接着領域を定量化するために、細胞周長あたりの細胞接着部分の長さをadhesion ratioとし算出した。メラトニン添加群とコントロール群において細胞接着分子の一つであるE-cadherinのmRNA発現をリアルタイムPCRにて定量した。

【結果】

1.胎生期マウスにおけるメラトニン合成酵素の遺伝子発現とメラトニンの発現解析

マウスの胎生期から生後にかけて唾液腺でメラトニン合成酵素（AANAT、HIOMT）のmRNA発現が認められた。特に胎生初期のE13で発現が高く、唾液腺の形成に伴ってその発現は減少し、生後にはその発現が再び増加した。E13の各臓器からも松果体の存在する脳と同様にメラトニン合成酵素のmRNA発現が認められた。E13と成体マウスの唾液腺組織中のメラトニン発現量、培地中へのメラトニンの分泌量を測定すると、すべての組織、培地中にメラトニンが検出された。さらに、成体唾液腺組織中よりE13の唾液腺組織中の方が高いメラトニン濃度を示した。

2.胎生期マウスにおけるメラトニン受容体の遺伝子発現とその局在解析

胎生期から生後にかけて唾液腺にMT1のmRNA発現が認められ、特に胎生初期に高い発現が認められた。また、E13の各臓器からもMT1のmRNA発現が認められた。蛍光免疫染色ではMT1は唾液腺上皮に発現し、特に腺房上皮に高い発現が認められた。さらに、強拡大像では細胞膜に局在していることが示された。

3. 唾液腺分枝形態形成におけるメラトニンの作用

胎生期唾液腺の器官培養にメラトニンを添加し、分枝形態形成を観察し評価した。コントロール群に比べメラトニン添加群では有意な分枝数の減少と上皮組織の縮小が認められ、分枝形態形成が抑制された。

4. 唾液腺分枝形態形成におけるメラトニンの抑制作用のメカニズム解析

メラトニン添加群とコントロール群を比較すると、EdU陽性細胞数に有意な差はなく、どちらの群もTUNEL陽性細胞は腺房上皮には認められなかった。これらよりメラトニンによる唾液腺分枝形態形成の抑制作用は、細胞増殖の抑制、アポトーシスの誘導によるものではないことが示唆された。そこで、電子顕微鏡にてメラトニン添加による微細構造の変化を解析すると、メラトニン添加群では腺房の上皮細胞の辺縁形態が不規則になり小突起の減少が認められた。さらに、腺房の上皮細胞が密に接している様子が観察されたので、腺房部の細胞間接着の割合（adhesion ratio）を算出し定量的に評価すると、コントロール群と比較してメラトニン添加群では、adhesion ratioが増加した。また、メラトニン添加によりE-cadherinのmRNA発現の有意な増加が認められた。

【結論および考察】

メラトニンは胎生期唾液腺から合成・分泌され、オートクライン的に腺房上皮に作用し、分枝形態形成を調整することが示唆された。そのメカニズムとして、細胞増殖やアポトーシスには影響を与えず、上皮細胞の辺縁形態や細胞間接着の変化を介して唾液腺の発達を調整している可能性が示唆された。再生医療において、器官形成のメカニズムを明らかにすることは重要であり、器官の大きさを決定する新しいメカニズムとして期待されると考えられる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (尾 花 綾)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	阪井 丘芳
	副 査	教授	野田 健司
	副 査	准教授	大倉 正也
	副 査	講師	中澤 光博
論文審査の結果の要旨			
<p>本研究は、唾液腺の形態形成機構を明らかにするために、メラトニンの器官形成への関与を解析したものである。</p> <p>その結果、胎生期マウス唾液腺にメラトニンとメラトニン受容体が発現しており、メラトニンは細胞接着を誘導し、細胞形態を変化させることで唾液腺の分枝形態形成に関与していることが示唆された。</p> <p>これらの知見は、今後の器官形成・再生研究に対し、有用な情報を提供するものであり博士(歯学)の学位授与に値するものである。</p>			