



Title	唾液腺培養細胞の腺房細胞への分化における細胞内シグナル伝達に関する研究
Author(s)	田中, 徳昭
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42460
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。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

氏名	田中徳昭
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第16133号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学位論文名	唾液腺培養細胞の腺房細胞への分化における細胞内シグナル伝達に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 松矢 篤三
	(副査) 教授 上崎 善規 助教授 西村 理行 講師 中澤 光博

論文内容の要旨

[緒言]

唾液腺は原始口腔上皮が下層の間質に侵入することによって形成される。この侵入は胎生6週頃におこることが知られており、その形態は原始口腔上皮の一部から未分化な上皮細胞が2列になって下層の間質に増殖しながら侵入し、先端が樹枝状に枝分かれし、その終末で房状に分化し終末部を形成する。また、Grobsteinによりマウス顎下腺を上皮と間充織に分離し培養する器官培養法が確立され、この系を用いた実験により上皮だけでは唾液腺の形態形成を行えず、間充織が上皮の形態および機能の決定に非常に重要な役割を担っていることが明らかにされた。この結果より、唾液腺の形態形成や分化機構には唾液腺周囲の細胞外マトリックスが非常に重要な役割を果たしていると考えられる。

当教室にて樹立したヒト顎下腺由来腺癌細胞株HSGは多分化能を有する細胞であり培養条件の変化や分化誘導剤により筋上皮様細胞や腺房様細胞など種々の細胞に分化することが示されている。さらにHSG細胞が細胞外マトリックス成分であるマトリゲル上で培養すると腺房細胞へ分化することが報告されている。そこで、マトリゲルを用い、培養唾液腺細胞特にHSG細胞が腺房細胞へ分化する際の細胞内シグナル伝達経路について検討を行った。

[方法と結果]

ヒト顎下腺由来腺癌細胞株HSGおよびヒト顎下腺正常細胞をプラスチックシャーレ上で培養すると α -アミラーゼおよびシスタチンの発現は認められない。HSG細胞を細胞外マトリックスであるマトリゲル上で培養するとプラスチックシャーレ上培養の場合とは異なり、HSG細胞は球状のコロニー形態をとり、細胞質は肥大した。切片をHE染色で観察すると、細胞は核の局在化を認め、唾液腺組織における腺房細胞様を示した。免疫染色では α -アミラーゼおよびシスタチンの発現を認め、同様のことが培養顎下腺正常細胞でも認められた。

さらにWestern blotting法により α -アミラーゼをHSG細胞が分泌していることを認め、スターチザイモグラフィーによりHSG細胞が分泌している α -アミラーゼが酵素活性を持っていることが確認され、形態的にも蛋白発現からもHSG細胞は腺房細胞へと分化した。

HSG細胞の腺房細胞分化はHerbimycin-Aでブロックされ、WortmanninおよびH-7ではブロックされなかった。マウスcSrc(c-Src)とその変異体である酵素活性部位のATP結合ドメインを点置換することにより酵素活性を失活させたcDNA(K297M)であるSrc mutantを導入したHSG細胞のうち酵素活性を失活させたK297Mを導入したHSG細胞ではマトリゲル上培養による腺房細胞分化、すなわち α -アミラーゼのmRNAおよび蛋白発現を

認めなかった。一方、遺伝子を導入しなかった HSG 細胞と c-Src を導入した細胞では α -アミラーゼの mRNA および蛋白発現を認めた。これらのことより、唾液腺培養細胞の腺房細胞分化には Src family tyrosine kinase が重要な役割を担っていることが示唆された。

Src family tyrosine kinase のネガティブレギュレーターである Csk の C 末端にフォーカルアドヒージョンをターゲットする蛋白質 (FAK の FAT およびパキシリソの LIM ドメイン (cPxn)) をコードする cDNA を結合させた Csk mutant を作製した (以下、フォーカルアドヒージョン Csk (FA-Csk) とする)。さらに Csk の酵素活性部位の ATP 結合ドメインを点置換することにより Csk の酵素活性を失活させたものもあわせて作製した。また、Csk mutant の局在を調べるために green fluorescent protein (GFP) 遺伝子もあわせて挿入した。これら FA-Csk を HSG 細胞に導入するとキメラ蛋白はフォーカルアドヒージョンにターゲットされた。さらに、酵素活性のある Csk mutant を導入した HSG 細胞はマトリゲル上で培養を行うと球状の形態を示すコロニーは減少し、細胞質の肥大を認める細胞数も減少した。酵素活性のある Csk mutant を導入した HSG 細胞は α -アミラーゼの発現を認めなかつたが、酵素活性のない Csk mutant が導入された細胞および遺伝子導入がされなかった細胞では α -アミラーゼの発現が認められた。

これらのことより、唾液腺培養細胞の腺房細胞分化においてフォーカルアドヒージョンにおける Src family tyrosine kinase が必要であることが示唆された。

〔結論〕

唾液腺細胞の腺房細胞分化はフォーカルアドヒージョンにおける Src を介するシグナル伝達経路によりコントロールされていることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文は、唾液腺細胞の腺房細胞分化におけるシグナル伝達経路を解析することを目的として、細胞外マトリックス成分を含むマトリゲル上で培養された唾液腺細胞が腺房細胞へと分化する過程で、各種阻害剤の付与や遺伝子導入を行い、唾液腺細胞の形態、蛋白発現について評価を行い、この分化のシグナル伝達経路の検討を行ったものである。この結果、唾液腺細胞の腺房細胞分化には focal adhesion における Src family tyrosine kinase の関与が強く示唆された。以上の成果は唾液腺の発生・分化の解明に重要な知見を与えるとともに、さらに唾液腺癌の分化誘導療法にひとつの示唆を与えると考えられることから価値のある業績と認められる。

従って、本研究者は博士（歯学）の学位を得る資格があるものと認める。