



Title	Differential expression of MUC16 in human oral mucosal epithelium and cultivated epithelial sheets
Author(s)	堀, 裕一
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49840
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

【68】			
氏 名	堀 裕一	ほり ゆう いち	
博士の専攻分野の名称	博士(医学)		
学位記番号	第 22595 号		
学位授与年月日	平成21年2月19日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
学位論文名	Differential expression of MUC16 in human oral mucosal epithelium and cultivated epithelial sheets (ヒト口腔粘膜および培養口腔粘膜上皮シートにおける膜型ムチンMUC16の発現についての検討)		
論文審査委員	(主査) 教授 田野 保雄 (副査) 教授 片山 一期 教授 不二門 尚		

論文内容の要旨

〔目的〕

スティーブンソン症候群や眼類天疱瘡、角膜化学外傷などの重症オキュラーサーフェス疾患においては、角膜上皮の幹細胞が障害され、正常な角膜上皮で眼表面を覆うことができないため、著しい視力低下をきたす。近年これらの疾患に対し、自己の口腔粘膜上皮を培養し、上皮シートを作成して移植を行う治療法が開発され、有効な治療法として注目されている。しかしながら、本来異なる組織由来である培養口腔粘膜シートがどのようにしてオキュラーサーフェスに必要な機能を代償しているのかは不明である。

ムチンは高分子の親水性の糖タンパクであり、体内の粘膜上皮に発現し、重要な役割を担っている。オキュラーサーフェスを

構成するものとして、涙液、角膜上皮、結膜上皮が挙げられるが、これらすべてにおいてムチンが発現しており、眼表面の潤滑性の保持、外界からの感染防御などオキュラーサーフェスの恒常性の維持に深くかかわっている。

今回の研究の目的は、培養口腔粘膜上皮シートがいかにしてオキュラーサーフェス機能を代償しているかをムチン発現の面から検討することである。

〔方 法〕

正常ボランティア3名より5x5mmの口腔粘膜（頬粘膜）を採取し、口腔粘膜上皮は温度応答型培養皿（セルシード、東京）上で培養し、重層上皮シートを作成した。シート作成にはマイトイシンC処理を行った3T3フィーダー細胞を共培養し、3:1 DMEM/F12(10%FBS)を用いて約2週間培養を行った。

培養口腔粘膜シート、口腔粘膜組織において、光学顕微鏡および走査型電子顕微鏡にて組織学的検討を行った。作成した培養口腔粘膜上皮シートからトータルRNAを抽出し、逆転写酵素にてcDNAを作成した。リアルタイムPCR法をもじいて膜型ムチンMUC16mRNAの発現を検討した。また、抗ヒトMUC16抗体をもじいて培養口腔粘膜シート、口腔粘膜組織におけるMUC16の発現を検討した。

〔成 績〕

ヒト口腔粘膜組織は10-20層の上皮層があることが確認された。口腔粘膜上皮を培養し、約2週間で3から5層に重層化した培養口腔粘膜シートが作成された。このシートは角膜上皮細胞をもじいて同様に作成した培養角膜上皮シートと類似した形態であった。口腔粘膜組織および培養口腔粘膜シートは豊富な微絨毛(microvilli/microplicae)で覆われていることが走査型電子顕微鏡で明らかになった。

次に膜型ムチンMUC16の発現であるが、リアルタイムPCR法を用いた検討では、培養角膜上皮シートでは高い発現が認められたのに対し、口腔粘膜組織での発現は低かった。培養口腔粘膜上皮シートにおいては口腔粘膜組織にくらべてMUC16mRNAの発現が有意に上昇していた。免疫組織学的検討にてタンパクレベルでも同様の結果が得られ、口腔粘膜組織ではMUC16の発現がほとんど見られないのに対し、培養して重層化した口腔粘膜上皮シートを作成すると、MUC16は重層化した上皮の最表層に発現していることが明らかになった。

〔総 括〕

培養口腔粘膜上皮シートは、培養角膜上皮シートと形態学的に類似しており、両者は同様の膜型ムチンの発現パターンを呈することが明らかになった。このことは、もともと角膜とは異なる組織である口腔粘膜を培養して角膜に移植しても、長期にわたって健常な眼表面を維持でき、重症オキュラーサーフェス疾患に対する培養口腔粘膜シート移植が有効であることの理由の一つに挙げられると思われる。

また、本研究では口腔粘膜組織ではMUC16の発現がみられず、培養してシートを作成するとMUC16の発現が上昇することが明らかになった。従って、培養口腔粘膜上皮シートはムチン発現の面からも角膜上皮の性格を獲得していると考えられ、これも治療が有効である理由であると考えられる。培養により本来発現していないムチン発現が上昇する理由として、1) 培養過程における何らかの因子が口腔粘膜上皮のMUC16発現を賦活化し発現を増加させた、2) 通常の口腔組織においては何らかの因子がMUC16の発現を抑制しており、in vitroの状態にすると抑制が解除されて発現が増加した、といった可能性が考えられる。本研究は、眼表面におけるMUC16の発現を調節する因子を解明するためのヒントになるとと思われ、今後の検討課題にしたいと考える。

論文審査の結果の要旨

角膜上皮の幹細胞が障害される角膜幹細胞疲弊症に対して、近年、自己口腔粘膜上皮シート移植

が有効であるといわれているが、本来異なる組織由来である培養口腔粘膜シートがどのようにし

て眼表面に生着しているのかは不明である。本研究では、眼表面（角膜・結膜）のバリア機能に関

連が深い膜型ムチン、特にMUC16に注目して、口腔粘膜上皮シートに発現する膜型ムチンの発現パ

ターンを検討した。

口腔粘膜上皮を培養すると、3-5層の重層化した口腔粘膜上皮シートが形成され、その最表層は、豊富な微絨毛で覆われていることが明らかになった。口腔粘膜上皮シートの最表層には、MUC16が発現していたが、その発現量は角膜上皮シートや正常角膜上皮と比べて少ない量であった。また興味深いことに、口腔粘膜組織においては、その上皮においてMUC16は発現しておらず、通常では発現していないMUC16が、培養過程においてMUC16の発現が賦活化された可能性がある。このことは、MUC16の発現の制御にかかる興味深い現象であり、眼表面でのMUC16の発現を制御する因子を解明するための糸口になると考えられ、本研究の業績は、学位の授与に値すると考えられる。