

| | |
|--------------|---|
| Title | 唾液腺上皮分岐形態形成および機能的分化における Wnt/ β -カテニンシグナルの役割の解明 |
| Author(s) | 栗本, 聖之 |
| Citation | 大阪大学, 2015, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://doi.org/10.18910/52347 |
| rights | |
| Note | |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (栗本 聖之)

論文題名

唾液腺上皮分岐形態形成および機能的分化における *Wnt*/ β -カテニンシグナルの役割の
解明

論文内容の要旨

代表的な外分泌腺の一つである唾液腺は胎生期において、上皮組織が活発に分岐と伸長を繰り返すことで分岐管腔構造を形成するとともに、腺房および導管上皮へと機能的に分化することで唾液の分泌能を獲得する。このような形態形成と機能的分化は、発生過程において時空間的に協調して進行するが、その制御機構の詳細は不明である。一方で、*Wnt*は分子量約4万の分泌性糖タンパク質で、細胞膜上の受容体に結合することで細胞内シグナル伝達経路を活性化し、初期発生や器官形成、出生後の細胞の増殖・分化・運動など多彩な細胞機能を制御する。しかし、唾液腺上皮の発生における*Wnt*シグナルの生理的意義は明らかにされていない。そこで本研究では、マウス胎児唾液腺原基を用いて、唾液腺上皮の分岐をともなう形態形成と腺房および導管への機能的分化における*Wnt*シグナルの役割について明らかにすることを目的に研究を行った。

唾液腺の発生に*Wnt*シグナルが関与するか否かを明らかにするため、*Wnt*シグナル阻害剤*IWP2*(以下*IWP2*)存在下で唾液腺原基の器官培養を行った。その結果、唾液腺上皮全体のサイズが減少するとともに、終末部上皮の分岐不全にともなう*End bud*(将来腺房に分化する構造、終蕾とも呼ばれる)数の減少を認めた。*Wnt*シグナルには遺伝子発現を介して細胞増殖・分化を制御する β -カテニン経路と、細胞骨格や細胞運動を制御する β -カテニン非依存性経路が存在する。 β -カテニン非依存性経路の代表的リガンドである*Wnt 5a*のノックアウトマウスにおいて、唾液腺の形成に異常が認められなかったことから、 β -カテニン経路に着目して形態形成と機能的分化における役割について解析した。

発生過程の唾液腺上皮において β -カテニン経路が活性化している領域を明らかにするため、胎生13日目の唾液腺原基から間質を除去して上皮を単離した。さらに、上皮を*End bud*部と導管部に分離し、リアルタイムPCR法で β -カテニン経路の標的遺伝子である*Axin2*の遺伝子発現を検討したところ、*Axin2*は間質および導管部上皮において強く発現していることが明らかになった。そこで導管部上皮の形態形成における β -カテニン経路の意義を明らかにするため、*IWP2*もしくは選択的に β -カテニン経路を活性化する*GSK3*阻害剤*CHR99021*(以下*CHR*)存在下で、*FGF1*を用いた上皮単独器官培養を行った。その結果、*IWP2*で導管の長さおよび太さの減少を認め、*CHR*で導管の長さおよび太さの増加を認めた。胎生期唾液腺上皮の導管部には*Cytokeratin (KRT) 5*および*KRT14*陽性の多能性唾液腺上皮前駆細胞が局在することが知られている。そこで、*Wnt*シグナルが*KRT5*および*KRT14*陽性前駆細胞に与える影響を検討した。*IWP2*もしくは*CHR*存在下で原基器官培養を行い、リアルタイムPCR法で*Krt5*および*Krt14*の遺伝子発現を検討したところ、*IWP2*で*Krt5*および*Krt14*の遺伝子発現が減少し、*CHR*でそれらの遺伝子発現が上昇した。また上皮単独器官培養において*KRT5*陽性細胞の局在を免疫組織学的に検討したところ、*IWP2*で導管部における*KRT5*陽性細胞数が減少した。さらに、*Ki 67*との多重染色により、*IWP2*および*CHR*は*KRT5*陽性細胞の増殖をそれぞれ抑制および活性化した。これらの結果から、 β -カテニン経路は唾液腺上皮導管部で強く活性化し、上皮前駆細胞の増殖を促進することで導管部上皮の伸長を制御することが明らかになった。

興味深いことに、原基器官培養において*CHR*による β -カテニン経路の活性化は*KRT7*陽性の導管伸長を促進することに加えて、終末*End bud*部での*Aquaporin 5 (AQP5)*陽性の腺房上皮形成を抑制した。この結果から、 β -カテニン経路は導管上皮に加えて、腺房上皮の形成と分化に関与する可能性が示唆された。そこで、腺房形成と機能的分化における β -カテニン経路の生理的意義について明らかにするため、*IWP2*存在下で原基培養を行い、腺房の前期分化マーカーである*Aqp5*、後期分化マーカーである*Psp*および*Muc100*の遺伝子発現をリアルタイムPCR法と免疫染色により継時的に検討した。その結果、*IWP2*は後期腺房分化マーカーの発現を対照群よりも早い時期から強く上昇させた。一方で、*CHR*はこれら後期腺房分化マーカーの発現上昇を強く抑制した。これらの結果から、 β -カテニン経路は導管上皮に加えて、腺房上皮にも作用しており、腺房上皮の分化・成熟を抑制的に制御することが明らかになった。

唾液腺上皮は終末部*End bud*の上皮細胞間にクレフトと呼ばれる裂け目が繰り返し入ることで多数の分岐を形成し、表面積を拡大する。しかし、唾液腺上皮の機能的分化と分岐形成の関わりは不明である。そこで、終末部上皮の腺房

分化・成熟が分岐（クレフト）形成に与える影響を検討した。分岐（クレフト）を形成する際の終末部 **End bud** の上皮は未熟な多層・非極性化状態であるのに対し、腺房分化が後期（**PSP**陽性）まで進行すると上皮細胞は単層・極性化して多数の緻密な腺腔構造を形成する。上皮単独器官培養において、**FGF1**に加えて腺房上皮の分化・成熟を誘導する**FGF7**を添加したところ、**FGF7**非添加群（**FGF1**単独添加群）に比べて終末部上皮の腺房分化が誘導され、緻密な腺腔構造を形成するとともに、分岐が早期に停止した。これらの結果から腺房の機能的な分化・成熟は終末部の分岐（クレフト）形成を抑制する可能性が強く示唆された。

以上の結果から、唾液腺の発生において **Wnt/β**-カテニンシグナルは、導管部で強く活性化することで唾液腺上皮前駆細胞の増殖を介して導管伸長を促進している一方、終末 **End bud** 部ではその適切な活性化が腺房上皮の分化・成熟の時期を抑制的に調節することで分岐形成を制御していると考えられた。本研究により **Wnt** シグナルが形態形成と機能的分化の両過程を協調的に制御する新規の機構が明らかになった。

論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏 名 (栗 本 聖 之) | | | |
|--|-----|-----|-------|
| | (職) | 氏 名 | |
| 論文審査担当者 | 主 査 | 教授 | 古郷 幹彦 |
| | 副 査 | 教授 | 阪井 丘芳 |
| | 副 査 | 准教授 | 竹村 元秀 |
| | 副 査 | 講師 | 中澤 光博 |
| 論文審査の結果の要旨 | | | |
| <p>本研究は唾液腺の発生における Wnt シグナルの関与について明らかにする目的で行ったものである。唾液腺上皮を導管および腺房に分化誘導するユニークな in vitro の器官培養系を確立し、それを利用してマウス胎仔唾液腺上皮の発生過程において分岐形態形成と腺房・導管への機能的分化の両過程を Wnt/β-カテニンシグナルが協調的に制御する機構の存在を新たに示した。</p> <p>本研究結果は再生医療の実現に向けた研究への応用に有用と考えられる。</p> <p>よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与するのに十分値するものと認められる。</p> | | | |