The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	唾液腺の再生を目指した転写因子p63の発現と制御機構の解析
Author(s)	井階, 一樹
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72246
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

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　井階　一樹　）	
論文題名	唾液腺の再生を目指した転写因子p63の発現と制御機構の解析

論文内容の要旨

【研究目的】

唾液腺は外分泌腺の1つであり、唾液を分泌することで口腔内はもとより全身の健康を維持している。頭頸部腫瘍や唾石による排泄主導管の閉塞、シェーグレン症候群、放射線照射により実質が損傷を受けると、唾液の分泌が減少し様々な障害が生じる。現在のところ、腺機能を回復させるための根本的な治療法はなく、唾液腺の再生治療が期待されている。

転写因子p63は、癌抑制因子p53のファミリーメンバーとして同定された。しかし、p53とは異なり、p63は上皮組織の発生や恒常性の維持において重要な機能を有する転写因子として考えられている。p63には2つのアイソフォームが存在し、TAp63は癌抑制作用を有する一方、ΔNp63は上皮組織の増殖・分化や幹細胞性の維持を担っている。さらに、p63は上皮組織の再生にも関与することが知られている。損傷した肺では、p63とKeratin5の両陽性の細胞が増殖し、組織の再生を誘導するために必須である。上皮組織を含む唾液腺では、Keratin5が前駆細胞マーカーとして知られており、p63も再生に関与することが推察される。しかし、唾液腺におけるp63の機能は解明されていない。本研究は、唾液腺の再生におけるp63の役割を明らかにすることを目的とした。導管結紮と放射線照射による唾液腺の損傷モデルを作製し、再生過程におけるp63の発現を解析した。さらに、唾液腺の器官培養を用い、p63の制御機構の解析と形態形成に対する影響を検討した。

【材料と方法】

1. 導管結紮モデルにおけるp63の発現解析

8週齢のICR系雌マウスの耳下腺主導管を絹糸で結紮し、7日後に開放した。結紮1日後、結紮3日後、開放0日後、開放7日後、開放14日後の耳下腺を摘出し、重さの計測とHE染色により組織学的変化を評価した。また、p63の発現と局在を免疫組織染色により確認し、さらにKeratin5との関係性を検討した。また、リアルタイムRT-PCRによりp63アイソフォームを解析した。

2. 放射線照射モデルにおけるp63の発現解析

8週齢のICR系雌マウスの耳下腺領域に、9 Gyの放射線を単回照射した。照射1日後、照射3日後、照射7日後、照射14日後、照射28日後の耳下腺を摘出し、重さの計測とHE染色により組織学的変化を評価した。また、p63の発現と局在を免疫組織染色により確認し、さらにKeratin5との関係性を検討した。また、リアルタイムRT-PCRによりp63アイソフォームを解析した。

3. 唾液腺の器官培養を用いたp63の制御機構の解析

胎生12.5日齢の胎仔唾液腺を摘出し、器官培養を行った。培地には、Keratinocyte Growth Factor（KGF）と、p38

Mitogen-Activated Protein Kinase（p38MAPK）のリン酸化阻害剤であるSB203580を添加した。培養6時間後の唾液腺を回収し、p63とリン酸化型p38MAPK（P-p38MAPK）の発現をウェスタンブロット法により解析した。また、培養48時間後に唾液腺の大きさと腺房数を計測し、形態形成への影響を検討した。

【結果】

1. 導管結紮モデルにおけるp63の発現解析

耳下腺の重さは結紮後に減少したが、開放後は増加し、開放14日後では未結紮群と同程度まで回復していた。開放0日後のHE染色像では、腺房細胞の萎縮、細胞間隙の増加など組織の損傷を認めたが、開放14日後では組織が回復し、未結紮群と同様の組織像を呈した。p63の発現は結紮後に増加したが、開放後は減少し、開放14日後では未結紮群と同程度であった。なお、p63陽性の細胞は、いずれの時期においても腺房と導管の基底側に局在していた。また、Keratin5の発現は結紮後に増加し、ほぼ全てのp63と共局在していた。さらに、開放0日後におけるp63アイソフォームの解析では、*ΔNp63*のmRNA発現量が増加し、*TAp63*のmRNA発現量は減少していた。これらの結果より、導管結紮により損傷した耳下腺では、ΔNp63とKeratin5の両陽性の細胞が増加し、組織の再生に関与することが明らかとなった。

2. 放射線照射モデルにおけるp63の発現解析

耳下腺の重さは照射後に減少したが、照射7日後以降では増加傾向にあった。照射7日後のHE染色像では、腺房細胞の減少、線維化組織への置換など組織の損傷を認めたが、照射28日後では損傷は軽度であった。p63の発現は照射7日後に増加したが、それ以降では徐々に減少し、照射28日後では未照射群と同程度であった。なお、p63陽性の細胞は、いずれの時期においても腺房と導管の基底側に局在していた。また、Keratin5の発現は照射7日後に増加し、ほぼ全てのp63と共局在していた。さらに、照射7日後におけるp63アイソフォームの解析では、*ΔNp63*のmRNA発現量は増加していたが、*TAp63*のmRNA発現量に変化は認められなかった。これらの結果より、放射線照射により損傷した耳下腺では、ΔNp63とKeratin5の両陽性の細胞が増加し、組織の再生に関与することが明らかとなった。

3. 唾液腺の器官培養を用いたp63制御機構の解析

KGF添加群では、ΔNp63とP-p38MAPKのタンパク発現量が濃度依存性に増加した。一方、SB203580添加群では、それぞれのタンパク発現量が減少した。KGFとSB203580の両者の添加群でも、ΔNp63とP-p38MAPKのタンパク発現量が減少していた。また、KGF添加群では唾液腺の腺房数が増加していたが、SB203580添加群、KGFとSB203580の両者の添加群では、大きさと腺房数ともに減少していた。これらの結果より、ΔNp63の発現はKGF刺激により誘導され、p38MAPKのリン酸化を介して制御されることが明らかとなった。また、ΔNp63の発現は、唾液腺の形態形成にも影響を及ぼすことが明らかとなった。

【結論および考察】

導管結紮や放射線照射により損傷した唾液腺では、ΔNp63とKeratin5の両陽性の細胞が増加し、組織の再生に寄与することが明らかとなった。また、唾液腺におけるΔNp63の発現は、KGF刺激により増加し、p38MAPKのリン酸化を介して制御されること、組織の形態形成にも影響を及ぼすことが明らかとなった。更なるメカニズムの解明により、p63の制御機構をターゲットとした薬剤や細胞・遺伝子導入の開発研究が進むと、将来的には唾液腺の再生医療へ発展し、唾液分泌障害に対する新たな治療戦略として応用されることが期待される。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　井階　一樹　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教授	阪井　丘芳
	副 査　教授	山城　隆
	副 査　准教授	前田　隆史
	副 査　講師	山下　元三

論文審査の結果の要旨

本研究は、唾液腺の損傷モデルを用い、組織の再生過程における転写因子 p63 の役割と、制御機構を検討したものである。

その結果、損傷した唾液腺ではΔNp63 と Keratin5 の両陽性の細胞が増加し、組織の再生に関与することが示唆された。また、ΔNp63 の発現は KGF により誘導され、p38MAPK を介して制御されること、唾液腺の形態形成にも影響を及ぼすことが示唆された。

これらの研究結果は、唾液腺の再生研究に対して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。