



Title	唾液腺の放射線障害に対するラクトフェリンの防御機能の解析
Author(s)	酒井, 学
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/73510
rights	This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名 (酒井 学)

論文題名 唾液腺の放射線障害に対するラクトフェリンの防御機能の解析

論文内容の要旨

【研究目的】

唾液腺は口腔の健康を維持する上で重要な機能を有しており、唾液を分泌することで消化、抗菌などの様々な機能をもつ。頭頸部がんにおいて審美性と機能温存の観点から放射線治療が行われるが、唾液腺が照射野に入ってしまうと不可逆的な唾液腺損傷が生じてしまい、口腔乾燥症、摂食嚥下障害などの唾液腺障害症状が引き起こされる。ラクトフェリン (LF) はトランスフェリンファミリーの1つであり、唾液腺や乳腺からの分泌物に含まれる80KDaの鉄結合性糖タンパク質である。LFは多彩な生物活性を有しており、抗酸化物質として宿主の保護に貢献し、細胞増殖と分化、骨形成、胚発生、細胞接着、サイトカイン産生にも関与している。近年、LFは放射線防護作用を有することが示されていたが、この活性のメカニズムは明らかにされていなかった。本研究では、胎仔唾液腺の器官培養と成体マウスを使用し、LFが唾液腺に与える影響とLFを導入した唾液腺の放射線照射後の変化を検討した。

【材料と方法】

1. LFの胎仔唾液腺に与える影響についての検討

ICR系妊娠マウスから胎生12.5日齢 (E12.5) 胎仔を摘出し、実体顕微鏡で確認しながら下顎から唾液腺を採取して唾液腺の器官培養を行った。通常培地で24時間培養した後にLF (1.0 mg/mL) を添加し、その48時間後の腺房数を計測して分枝形態形成を評価した。同時にEdU陽性細胞の蛍光強度を測定し、細胞増殖活性を解析した。LFが関与するシグナル伝達経路を明らかにするために、唾液腺の器官培養液にLFを添加後、10分、60分でWestern blotting法を用いてリン酸化したERK1/2とAKTの発現量を解析した。更なる詳細なシグナル経路の解析のため、ERK1/2、AKTの阻害剤としてU0126、LY294002を培養液に添加し、器官培養48時間後の唾液腺の分枝形態形成変化とリン酸化したERK1/2とAKTの経時的な発現量の変化を観察した。また、細胞周期に対するLFの作用を調べるため、CyclinD1の発現量の変化を解析した。

2. 胎仔唾液腺と成体唾液腺への放射線照射におけるLFの効果の検討

胎仔唾液腺と成体唾液腺に対する放射線の影響を解析するため、胎仔唾液腺に4Gy、成体唾液腺に9Gyの放射線を照射し、胎仔では48時間後、成体では1週間後に唾液腺組織をHE染色により解析した。唾液腺は障害を受け、上皮組織・間葉組織ともに細胞間隙が拡大し、腺房組織自体が著しい萎縮を示していた。近年、LFが成体マウスにおいて放射線防護作用を有することが示されたことから、放射線照射後の唾液腺への効果を解析した。放射線照射直後に胎仔唾液腺へは1.0 mg/mLのLFを培養液中に添加し、成体唾液腺へは4.0 mg/animalのLFを腹腔内注射した。胎仔唾液腺ではLF添加後48時間、成体唾液腺ではLF注射後1週間経過後に唾液腺を回収し、腺房数の計測、分枝形態形成の観察、HE染色による細胞間隙の面積測定、蛍光染色による腺房マーカーであるAQP5の蛍光強度の測定、RT-PCRによるAQP5の発現量を測定した。

【結果】

1. LFの胎仔唾液腺に与える影響についての検討

胎仔器官培養において、LFを添加した唾液腺は、対象群と比較して腺房数、EdU陽性細胞の蛍光強度、リン酸化したERK1/2とAKTの発現量、CyclinD1の発現量が増加していた。LFを添加した10分後には、リン酸化したERK1/2とAKTの発現量が著しく増加していた。また、U0126の添加により唾液腺の分枝形態形成が制御され、細長い導管形態を示した。この形態は、DMSOで処理した対象群の唾液腺と著しく異なっていた。LY294002で処置した唾液腺の腺房数は、U0126処置した唾液腺よりわずかに多く、コントロール唾液腺と比較するとサイズ自体は縮小していた。U0126とLY294002を組み合わせると、より強い抑制効果を有し、各阻害剤単独より分枝形態形成を抑制していた。更に、リン酸化し

たERK1/2とAKTの発現量を阻害剤の有無で確認したところ、阻害剤の存在下で10分後に阻害された。これらのデータは、LFが唾液腺の細胞増殖能を高め、細胞周期の進行を促進することを示唆し、その作用がERK1/2とAKTシグナル伝達経路を介している可能性を示した。

2. 胎仔唾液腺と成体唾液腺への放射線照射におけるLFの効果の検討

放射線照射後、LFを導入した胎仔唾液腺は、対象群と比較して腺房数の減少が軽微であり、腺房マーカーであるAQP5の発現は高かった。また、放射線照射による細胞間隙の面積は対象群と比較して小さかった。LFを導入した成体唾液腺においても、対象群と比較して放射線照射による細胞間隙の面積は小さく、面積当たりの腺房細胞の占める割合は大きかった。この結果は、LF導入マウスが放射線照射後においても細胞間隙が充実されたままに保存されており、腺房自体の萎縮が生じていないことを示唆している。更に、AQP5の発現はRT-PCRと蛍光染色による強度測定においても高かった。これらの結果から、LFが放射線障害に対する防護作用をもつ可能性が示された。

【結論および考察】

ラクトフェリンがERK1/2とAKTシグナル経路を介して胎仔唾液腺の細胞増殖と分枝形態形成を誘導し、サイクリンD1を介して細胞周期の進行を早めることを明らかにした。更に、放射線照射後のラクトフェリンの導入により、細胞間隙の面積の拡大を抑え、腺房マーカーであるAQP5の発現減少が抑制されていたことから、ラクトフェリンにより胎仔唾液腺と成体唾液腺の腺房構造が維持されていることを示した。これらの結果から、ラクトフェリンが放射線障害に対する有用な薬剤になる可能性が考えられた。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (酒 井 学)	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教授 阪井 丘芳
	副 査 教授 村上 秀明
	副 査 准教授 中澤 敬信
	副 査 講師 犬伏 俊博
論文審査の結果の要旨	
<p>本研究は、胎仔唾液腺の器官培養と成体マウスを使用し、ラクトフェリンが唾液腺に与える影響と放射線照射後の障害抑制効果を検討したものである。</p> <p>その結果、ラクトフェリンが ERK1/2 と AKT シグナル経路を介して胎仔唾液腺の細胞増殖と分枝形態形成を誘導し、サイクリン D1 を介して細胞周期の進行を早めることを明らかにした。更に、放射線照射後のラクトフェリンの導入により、胎仔唾液腺と成体唾液腺の腺房構造が維持されていることを示した。これらの結果から、ラクトフェリンが放射線障害に対する有用な薬剤になる可能性が示唆された。</p> <p>これらの研究結果は、唾液腺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。</p>	