



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

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

酒井 学

大阪大学歯学部附属病院検査部

緒 言

唾液は口腔の健康を維持する上で重要な、消化、抗菌、潤滑、ミネラルの補給などの機能を有しており、唾液腺は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¹。しかしながら、頭頸部のがん治療やシェーグレン症候群に伴う重篤な唾液分泌障害は、齲蝕、歯周病をはじめとする様々な口腔機能障害を引き起こし、QOLの低下をもたらす。世界規模のデータにおいて、頭頸部がんは悪性腫瘍全体の約5%を占めており、上から6番目に多いがんとされ、世界全体の頭頸部がん患者50万人の5年生存率は約50%である^{2,3}。頭頸部がんに対し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⁴⁻⁶、口腔乾燥症、摂食嚥下障害、会話困難、味覚障害、組織壊死、口腔細菌叢の変化、口腔粘膜炎などの唾液腺障害による症状が引き起こされる⁴。これらの放射線障害を防ぐための防護剤については多くの報告があるが、副作用を伴ったり高価であることから、副作用が少なく安価な防護剤の開発が望まれている⁷。

ラクトトランスフェリン、すなわちラクトフェリン (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関与している⁸⁻¹⁵。LF の受容体には、LDL 受容体関連タンパク質 LRP¹⁶、小腸上皮に存在するインテレクチン¹⁷、RNA 結合タンパク質ヌクレオリン¹⁸ などがあり、その中でも LDL 受容体関連タンパク質 LRP の機能についてはこれまでに多くの報告がある¹⁶。特に LRP のサブタイプの 1 つであり全身に発現が認められる LRP-1 についてはシグナル伝達を担う受容体として機能していることが報告されており、様々なリガンドを介して多くの機能を発揮する^{19,20}。

近年、放射線医学研究所の西村らは LF が放射線防護作用を有することを示した²¹。マウスに対する X 線を 1 回全身照射し、照射後 30 日間の生存率を観察すると、コントロール群が 62%であったのに対し、LF 含有飼料を用いた群では 85%であった。更に、経口投与ではなく腹腔内投与にすると、照射 30 日後の生存率はコントロール群が約 50%であったのに対し、LF 投与群では 90%以上の高い生存率を示した。そこで本検討では、放射線による唾液腺障害を防ぐ物質の開発を目指すべく、これまでに LF の放射線防護作用が唾液腺において検討されていないこと、更にはその作用メカニズムが解明されていないことに注目し、胎仔唾液腺の器官培養と成体マウスを使用して LF が唾液腺に与える影響と放射線を照射した唾液腺に対する LF の効果を検討した。

材料と方法

本研究は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の審査を受け、承認を得た上で行われた（承認番号：動歯-25-004-0）。

1. 実験動物

ICR 系の妊娠マウス（日本 SLC 株式会社）の胎仔を使用し、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の規定に基づいて実験を行った。

2. 唾液腺の採取、唾液腺の器官培養

胎生 12.5 日齢（以下、E12.5）の胎仔マウスを摘出し、実体顕微鏡 Stemi2000-CS (Carl Zeiss) を使用して胎仔の下顎を摘出した。更に、下顎から舌を摘出し、舌の辺縁にある 2 つの唾液腺を採取した。唾液腺を Nucleopore membranes (1 μ m pore size) 上で、150 μ g/ml ビタミン C (Sigma-Aldrich) と 50 μ g/ml トランスフェリン (Sigma-Aldrich) を含んだ 200 μ l の DMEM/F12 培地 (Life Technologies) で 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。培養 1 日後、0.1-1.0 mg/ml のウシ Lactoferrin (LF) (Morinaga Milk Industry : 総タンパク質中の LF 含有が 90% 以上) が入った培地に交換し 48 時間器官培養した。

3. 増殖細胞の検出

E12.5 の唾液腺を摘出し、LF 添加群とコントロール群に分けて器官培養した。培養 48 時間後の唾液腺を使用し、EdU 法によって増殖細胞を検出した。EdU 法は、Click-iT Plus EdU Alexa 647 Fluor Imaging Kit (Life Technologies) を用いて EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) 標識し、3.7%ホルムアルデヒド (Thermo Scientific) で15分固定後、3%BSA (MPBiomedicals) でブロッキングした。続いて0.5%Triton-Xに浸漬した後EdU反応液に浸漬した。その後、唾液腺をM.O.M. (Mouse Ig Blocking Reagent, Vector Laboratories)にてブロッキングし、抗E-Cadherin抗体(R&D Systems)で上皮細胞を、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Thermo Scientific)で核を染色し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 SP8 (Leica) により観察した。ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda)を用いて唾液腺全体のEdUの蛍光を定量した。

4. アポトーシス細胞の検出

In Situ Cell Death Detection Kit TMR-red (Roche Applied Science) を使用した TUNEL 法により、アポトーシス細胞を検出した。唾液腺を 2%PFA にて 1 時間固定し、洗浄後浸透化液 (0.1%クエン酸ナトリウム、0.1%Triton-X) に

浸漬した後、TUNEL 反応液を加えて 1 時間反応させた。その後、DAPI (Thermo Scientific) にて共染色し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 SP8 (Leica) を使用して観察した。

5. ウェスタンブロッティング

唾液腺を PBS (BIO-RAD) にて洗浄し、RIPA lysis buffer (Nacalai) で溶解した。溶解液を 15,000 rpm、10 分間、4°C で遠心分離し、上清を回収した。上清に 2×Laemmli sample buffer (BIO-RAD) を添加した後、更に 5% 2-Mercaptoethanol (BIO-RAD) を加えてサンプルとした。ミニプロテイン Tetra レディーゲルセル (BIO-RAD) を用いて電気泳動し、トランスブロット Turbo 転写システム (BIO-RAD) にて PVDF メンブレン (BIO-RAD) に転写した。転写したメンブレンを 0.05% Tween を含む PBS (PBST) で洗浄した後、スキムミルクでブロッキングした。一次抗体反応は抗 AKT 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗リン酸化 AKT 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 ERK1/2 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗リン酸化 ERK1/2 抗体 (Cell Signaling Technology)、抗 PCNA 抗体 (BD)、抗サイクリン D1 抗体 (abcam)、抗 LRP-1 抗体 (abcam)、抗 GAPDH 抗体 (Cell Signaling Technology) を使用した。反応後、PBST で洗浄し、二次抗体の反応には HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を使用した。Clarity Western ECL

Substrate (BIO-RAD) でメンブレンの発光反応を行い、シグナルを Versa doc イメージングシステム (BIO-RAD) にて検出した。

6. 蛍光免疫組織染色

唾液腺を 4% パラホルムアルデヒド (PFA; Paraformaldehyde) (Alfa Aesar) と 5% スクロース (Wako Pure Chemical) で固定し、パラフィン切片を作成した。パラフィン切片はパラフィン溶解後、抗原賦活化液 H (三菱化学メディエンス) を使用して抗原賦活化処理を行った。リン酸緩衝液 (Cambrex Corporation) にて洗浄後、VECTOR® M. O. M. immunodetection Kit (VECTOR Laboratories Inc.) でブロッッキングした。一次抗体には、抗 E-Cadherin 抗体 (BD Biosciences)、抗 LRP-1 抗体 (abcam)、抗 AQP5 抗体 (Alomone) を使用し、室温で 3 時間反応させた。Cy2、Cy3、Cy5 (Jackson) と結合している二次抗体を反応させ、DAPI (Thermo Scientific) で共染色を行い、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 SP8 (Leica) を使用して観察した。

7. 阻害剤実験

シグナル経路の阻害剤 (Cell Signaling Technology) を DMSO で溶解し、既定の濃度になるように培地に加えた。ウェスタンブロット用の唾液腺は、LF を投

入する 1 時間前から阻害剤で処理し、LF を培地へ添加後 10 分と 60 分で回収した。また、形態変化を観察するため、阻害剤投与後 0 時間と 48 時間で SLR カメラ (Fuji FinePix) を使用して撮影した。

8. Quantitative real time RT-PCR による定量的遺伝子発現解析

唾液腺から Pure Link® RNA Mini Kit (Life Technologies) を使用して全 RNA を抽出し、DNase 処理を行った。Genomic DNA の混入を防ぐため、DNase I (Roche) を用いた。Prime Script® RT reagent Kit (Takara Bio Inc.) を用いて mRNA と特異的な cDNA の合成を行った。遺伝子発現の定量は MyiQ™ single-color real-time PCR Detection System (BIORAD) を用いて SYBR Green PCR protocol に従った。目的遺伝子の発現量はハウスキーピング遺伝子である Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 遺伝子を内部標準物質として補正した。用いたプライマーは下記に示す通りである。

AQP5: forward 5' -GAGGACTGGAAGATCATAGAGAGG-3' and reverse
5' -CAAACCTCTTCGTCTTCCTTTTCTCC-3'

Gapdh: forward 5' -CCATCACCATCTTCCAGGAG-3' and reverse 5' -

GCATGGACTGTGGTCATGAG-3'

LRP-1: forward 5' -GTGCTTCAATGGTGGTAGTTGTTTC-3' and reverse

5' - AGCTCACACTTATCGCCTGTGTAAC-3'

9. 組織学的解析

パラフィン包埋した唾液腺を脱パラフィンした後、組織切片を 4 μ m の厚さで薄切し、ヘマトキシリンおよびエオジンで染色した。細胞間隙および腺房細胞の面積を ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda) によって測定した。

10. 放射線照射実験

放射線照射実験では X 線照射機である MX-80Labo (MediXtech) を使用した。MX-80Labo の仕様は X 線管電圧 (40 kV~80 kV)、管電流 (0.15 mA~1.25 mA)、焦点寸法 (1.5 mm)、管構造 (密封型)、照射角 (25 度)、照射面積 (試料テーブル上で直径 110 mm) である。胎仔唾液腺への照射は、装置内にある電動化回転テーブル上に培養デッシュをのせ、上部から 2 から 10 Gy の範囲で X 線照射した。ICR 雄性マウスへの照射は電動化回転テーブル上にマウスを拘束し、上部から全身に 9 Gy で X 線照射した。

11. マウスへの処理

6 週齢の ICR 雄性マウス（日本 SLC）を清浄な条件下で飼育し、市販のペレットである MF（Oriental Yeast Co. Ltd）および水を与えた。ウシ LF を 0.3 ml の生理食塩水に溶解して 1 匹あたり 4.0 mg の濃度で導入するように調製した。放射線照射のためにマウスを拘束し、MX-80Labo（MediXtech）を用いて 9 Gy で全身に照射した。照射直後に LF を含む生理食塩水をマウスに腹腔内投与した。対照群として、LF を含まない生理食塩水をマウスに腹腔内投与した。照射後、両方の群を MF で維持して 1 週間後にマウスから唾液腺を摘出した。

12. アミラーゼ活性の測定

マウス 1 kg 当りにペントバルビタールナトリウム 50 mg を用いて麻酔した。唾液産生のため、マウス 1 kg 当りにピロカルピン 0.1 mg によって刺激した。唾液分泌は 20 秒以内に起こり、吸引装置 Ringcaps（Hirschmann Laborgera GmbH&Co. KG）を用いて唾液を 1 分間隔で計 30 分間集めた。分泌された唾液のアミラーゼ活性は、2-クロロ-4-ニトロフェニル 6⁵-アジド-6⁵-デオキシ- β -マルトペンタオシド（N3-G5- β -CNP）を基質とする α -アミラーゼアッセイキット（キ

ッコーマン社) を用いて測定した。2-クロロ-4-ニトロフェノール (CNP) の生成量は、Nano Drop 2000C (Thermo Scientific) を使用して測定した。1 単位の α -アミラーゼ活性は 1 分以内の 1 μmol の 2-クロロ-4-ニトロフェノールの放出として決定した。

13. 飲水量測定

9 Gy の放射線照射後、LF 導入マウスと LF 非導入マウスを別々にプラスチックケージに収容し、食物と水を自由に摂取させた。5 日間連日の飲水量測定のために給水ボトル (信濃製作所) を用いて水の消費量を測定し、1 日当たりのマウスの平均飲水量を計算した。

14. 統計分析

実験結果は平均 \pm 標準誤差 (S.E.M) で表し、t 検定を用いた 2 群間の比較と Bonferroni 検定を用いた多重比較検定を行った。

結 果

1. LF による胎仔唾液腺の形態学的変化

唾液腺が活発に分枝形成をする初期発生段階において、シグナル伝達を担う LF 受容体 LRP-1 の発現が高いことから（図 1a-c）、我々は LF が初期発生段階期の唾液腺の発達に影響を及ぼすと仮定した。LF は唾液、涙などに見られ、特に乳汁中に高濃度で存在する（マウス：0.2-2.0 mg/ml、ヒト：1.0-2.0 mg/ml）^{22, 23}。したがって、毒性反応を回避するための薬理学的濃度として、我々は胎仔唾液腺研究に 0.1-1.0 mg/ml の範囲の外因性 LF を使用した。他の研究においても *in vitro* で 0.1-1.0 mg/ml の LF が使用されている^{24, 25}。通常培地による胎生 12.5 日 (E12.5) 唾液腺の培養 24 時間後に 1.0 mg/ml の LF 入り培地に交換した（図 2a-f）。LF を添加してから 0 時間、24 時間、および 48 時間後に分枝形態形成の尺度として測定される唾液腺の腺房数を計数した（図 2g）^{26, 27}。その結果、1.0 mg/ml の LF の添加が唾液腺の腺房数を有意に増加させたことを示した。

2. LF による胎仔唾液腺の細胞増殖能の変化

我々は、LF が唾液腺の分枝形態形成を調節し、腺房数を有意に増加させることを見出した。次に唾液腺上皮細胞の増殖に対する LF の効果を調べるために、培養 24 時間後に E12.5 唾液腺の器官培養培地に LF を添加した。48 時間後、細胞増殖活性を解析するための 5-エチニル-2'-デオキシウリジン (EdU) の免疫組織化学を行った (図 2p)。その結果、LF (1.0 mg/ml) は、唾液腺中の EdU の蛍光強度を増加させた (図 2h, i, p)。これらの結果は、LF が唾液腺の分枝形態形成中に細胞増殖を誘導することを示した。

3. LF による胎仔唾液腺のサイクリン D1 の発現変化

以前の研究でサイクリン D1 が細胞増殖の G1 期の細胞周期調節において重要な役割を果たしていることが示されている²⁸。G1 期は細胞外刺激に反応することができる唯一の段階であり、細胞周期における細胞の運命を決定する。したがって、我々は LF がサイクリン D1 を介した細胞周期の調節に関連しているかどうかを調べた。24 時間の唾液腺培養後に LF を添加し、その 48 時間後にサイクリン D1 の発現をウエスタンブロットにより解析した。その結果、LF 添加後サイクリン D1 の発現が増加していることを明らかにした (図 2q)。これ

らの結果は、*ex vivo* の唾液腺の器官培養において LF がサイクリン D1 の調節する細胞周期の進行に影響を与えていることを示した。

4. LF による胎仔唾液腺のリン酸化 ERK1/2 および AKT の発現変化

LRP-1 は LF を含む多様なタンパク質の受容体である^{16, 19, 20}。LRP-1 は唾液腺において様々な発生段階で発現しており（図 1a-c）、E13 の発現は、E15、E17、P1、および P42 などの後期発生段階での発現よりも有意に高い。ERK1/2 および AKT シグナル伝達経路は、唾液腺の分枝形態形成に大きく関与している^{27, 29, 30}。以前の研究では、LRP-1 が ERK1/2 および AKT の活性化に関連していること^{19, 20, 31}、更にリン酸化した ERK1/2 および AKT がサイクリン D1 の活性化を制御し、細胞増殖および細胞周期の進行を調節することを示している³²⁻³⁴。しかしながら、唾液腺でこれらの分子に関連する LRP-1 の機能は解明されていないため、我々は E12.5 の唾液腺を 72 時間培養後、LF を添加してリン酸化 ERK1/2 および AKT の発現をウェスタンブロットにて解析した。その結果、リン酸化 ERK1/2 および AKT の発現は、LF の添加 10 分後に増加し、次いで添加 60 分後に減少した（図 3）。また、LF の添加が無い状態であってもリン酸化 ERK1/2 および AKT の弱い

発現は観察された（図 3）。更に、リン酸化 ERK1/2 と AKT の発現が LF の用量依存的に変化するかを調べた。漸増濃度の LF (0.1, 1.0 mg/ml) を用いて唾液腺を刺激すると、リン酸化 ERK1/2 および AKT の発現は LF の用量依存的に増加した（図 4）。これらの結果は、LF が *ex vivo* の器官培養において ERK1/2 および AKT シグナル伝達経路を介した細胞増殖やサイクリン D1 によって調節される細胞周期の進行に影響を与える可能性を示唆した。

5. ERK1/2 経路と AKT 経路の阻害剤による LF 誘導分枝形態形成の変化

ERK1/2 および AKT シグナル伝達経路が LF 誘導性分枝形態形成に必要であるかどうかを更に検証するために、阻害剤を使用して解析した。シグナル伝達阻害剤（U0126; MEK1/2（ERK1/2 の上流因子）阻害剤：20 μ M と LY294002; PI3K（AKT の上流因子）阻害剤：20 μ M）を培地に添加し、DMSO 処理した対照唾液腺と比較して唾液腺の分枝形態形成を評価した（図 5a-h）。その結果、U0126 で処理した唾液腺では、中程度に分岐した細長い上皮の伸長を示した（図 5f）。この形態は、DMSO 処理した対照唾液腺に見られる高度に分岐した上皮とは著しく異なり、腺房数も少なかった（図 5j）。LY294002 で処置した唾

液腺の腺房数は U0126 で処置した唾液腺よりわずかに多く（図 5j）、DMSO 処理した対照唾液腺と比較して腺房の形態は類似していたが全体の大きさは小さかった（図 5g）。U0126 と LY294002 の両方の組み合わせは、分枝形態形成に対してより強い効果を示し（図 5h）、腺房数は各阻害剤単独より少なかった（図 5j）。更に、阻害剤の有無における LF 添加後のリン酸化 ERK1/2 および AKT の発現をウェスタンブロットにて解析した。リン酸化 ERK1/2 および AKT の発現は、阻害剤の存在下において LF 添加後 10 分で減少した（図 5i）。これらの結果は、LF が ERK1/2 および AKT シグナル伝達経路を介して唾液腺の分枝形態形成に影響を及ぼすことを示した。

6. 放射線照射による胎仔唾液腺の変化

以前の研究において LF は放射線防護作用を有することが示されている²¹。唾液腺における LF の放射線防護作用を解析するため、器官培養をしている唾液腺に放射線を照射した。放射線（2-10 Gy）の照射後 72 時間培養した E12.5 の唾液腺は、照射線量に依存して萎縮が大きくなっていた（図 6）。本研究では唾液腺の形態変化を検出するのに最も適していた 4 Gy の放射線量を使用した。また、照射後 48 時

間培養した唾液腺は細胞間隙を増加させた（図 7a, b）。更に、細胞の DNA 合成に必須であり、細胞の増殖と相関している増殖細胞核抗原（PCNA）^{35, 36} の発現は放射線の線量依存的に減少した（図 7c）。この結果は、放射線照射が唾液腺の DNA 合成や細胞増殖に影響を与えることを示した。放射線照射された唾液腺では、アポトーシス、壊死、および自食作用を含む 3 つの細胞死のプロセスすべてが起こる可能性があり、成体マウス、胎仔唾液腺の発達段階、照射環境、マウスの種などの違いが細胞死のプロセスに影響を及ぼす^{5, 37-39}。我々の実験における細胞死の過程を明らかにするために、放射線照射後の唾液腺を使用して DNA 断片化を検出するためのターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ dUTP ニックエンドラベル（TUNEL）染色⁴⁰ および活性化カスパーゼ 3 の発現⁴¹ をウェスタンブロットにて解析した。その結果、放射線照射された唾液腺はアポトーシスによる細胞死の徴候を示さなかった（図 7d, e）。放射線照射による細胞死の種類を正確に判断することは困難とされているが、この結果は唾液腺の細胞死が壊死または自食作用の可能性が高いことを示した。

7. 放射線照射後の LF 導入による胎仔唾液腺の変化

LF が放射線防護作用をもつことが示されているが²¹、この効果の詳細なメカニズムは不明である。我々は LF の放射線防護作用を解析するために E12.5 の唾液腺を 24 時間培養した後、0.1 mg/ml の LF を 48 時間培養液に添加した (図 8a-d)。一方、E12.5 の唾液腺を 24 時間培養した後、唾液腺に対し 4 Gy で X 線照射し、次いで培養液に 0.1 mg/ml の LF を添加して 48 時間培養した (図 8e-h)。その結果、放射線照射をせずに LF を導入した唾液腺は図 2g の結果と同様に腺房数の増加を示した (図 8i)。一方、放射線照射後 LF を導入した唾液腺は LF 非導入唾液腺とは対照的に形態や腺房数を維持した (図 8f, h, j)。更に、放射線照射前の LF の前処理が防護作用をより高めることができるかどうかを解析するため、放射線照射の 3 時間前に LF の前処理を行った。しかしながら、照射前と照射後の LF の導入による防護作用に違いはなかった。次に、放射線照射後の LF 導入、非導入の唾液腺において、細胞間隙および AQP5 (腺房細胞マーカー) の発現を評価した。以前の研究では、AQP5 が唾液腺における腺房細胞構造および機能マーカーとして使用していることを示している^{36, 42, 43}。その結果、LF を導入した唾液腺は、LF 非導入の唾液腺と比較して細胞間隙が小さく (図 8k-s)、AQP5 の発現が高かった (図 8t)。

これらの結果は、LF が唾液腺の腺房細胞構造を維持し、*ex vivo* の唾液腺器官培養において放射線防護作用を有することを示した。

8. 放射線照射後の LF 導入による成体唾液腺の変化

近年の LF を使用した放射線研究では、1 匹のマウスあたり 4.0 mg の LF（血中最終濃度：1.7 mg/ml）が放射線防護のために使用された²¹。LF は雌マウスにおいてエストロゲンサイクルにより誘導されるタンパク質であるため、本研究では ICR 雄マウスを用いることにより内在性の LF の用量が変化する可能性を除外した⁴⁴。以前に報告された線量²¹を参考にして、マウス（6 週）を 9 Gy の線量で全身 X 線照射し、続いて LF（4.0 mg/動物）を含んだ生理食塩水、一方は対象として生理食塩水のみを腹腔内投与した。照射の 1 週間後、マウスから唾液腺を採取した。参考にした以前の照射設定条件では、照射から約 10 日後にマウスが死亡することから、本研究では 1 週間を評価期間として設定した²¹。検討の結果、唾液腺において顕著な形態学的変化が観察され、照射された唾液腺において腺房細胞の間隙の減少が見られた（図 9a-e）。以前の研究では唾液腺への放射線照射後の急性反応において、腺房細胞の消失が見られることが示

されている⁵。 *ex vivo* の器官培養で見られるように、LF 導入マウスの唾液腺は細胞間隙を減少させ（図 9e）、腺房細胞の面積を維持した（図 9f-h）。また、放射線照射後の DAB 染色を用いた検討では照射によって AQP5 が局在を変えると報告されているが⁴⁵、本研究の蛍光共焦点画像における AQP5 の局在は、LF 導入マウスと LF 非導入マウスの両方において類似していた（図 9j, k）。次に、AQP5 の発現を mRNA と以前示された蛍光強度を測定する方法^{46, 47} で検討した結果、LF 導入唾液腺の AQP5 の mRNA 発現（図 9i）および蛍光強度（図 9l）が、LF 非導入唾液腺よりも高いことを明らかにした。この結果は、LF が AQP5 の発現に影響を及ぼし、局在には影響を及ぼさないことを示した。

次に照射後の LF 導入唾液腺の機能を評価するため、照射後の LF 非導入マウスおよび LF 導入マウスのアミラーゼ活性を調べた。その結果、アミラーゼ活性に有意差はなかった（図 9m）。これまでの報告から唾液腺において漿液性腺房が粘液性腺房よりも放射線の感受性が高いと考えられているが⁴⁸、本研究における放射線照射後の急性効果では、両群の漿液性腺房を完全には破壊しなかったため、アミラーゼ活性に有意な差がないと示唆された。また、照射後のア

ミラーゼ濃度には日々の変動が見られることから⁴⁸、アミラーゼ活性を正確に測定することが難しい可能性も示唆された。

次に、放射線照射後のマウスの飲水量を解析した。これまでに唾液量の減少と口腔乾燥は、放射線照射の急性副作用として観察されている^{37, 48}。照射された LF 非導入マウスは、LF 導入マウスよりも多くの水分を摂取していた（図 9n）。この結果は放射線照射により LF 非導入マウスに唾液量の減少と口腔乾燥が強く起こり、マウスが水分をより欲したために水分の摂取量を増加させたこと、更には LF の導入が放射線による副作用を抑制した可能性を示唆している。これらの結果は、LF が *in vivo* における唾液腺に対して放射線防護作用を有することを示した（図 9a-1, n）。

考 察

細胞内にはサイトカインおよび成長因子の受容体によって活性化される多くのシグナル伝達経路があり、それらのリガンドは唾液腺の分枝形態形成に関与することが知られている^{29,30}。本研究で我々は LRP-1 を介して細胞内シグナル伝達を引き起こすことが知られている LF の役割を調べた。これまでに LF が関与するシグナル伝達経路が胎仔唾液腺の分枝形態形成に関与するかどうかは調べられていない。本研究において、我々は LF が細胞増殖を伴う唾液腺の分枝形態形成を誘導することを見出した。更に、ERK1/2 と AKT シグナル伝達経路が LF の誘導する唾液腺の分枝形態形成に関与することを明らかにした。ERK1/2 と AKT シグナル伝達経路に対する阻害剤を使用した検討では、ERK1/2 シグナル伝達が主に腺房の形成に関連しており、AKT シグナル伝達が細胞増殖の過程に影響を及ぼすことを明らかにした。また、LF による ERK1/2 および AKT のリン酸化は、LF の単回投与後の分枝形態形成の誘導が少なくとも 48 時間続いていたのにも関わらず、投与後 24 時間および 48 時間においては検出することができなかった。しかしながら、本研究では、単回投与の LF が複数回投与による継続的な ERK1/2 および AKT のリン酸化を必要とせずに唾液腺の分枝形態形成に大きな影響を及ぼしていた。LF の複数回投与を評価した場合、24 時間と 48 時間でも ERK1/2 およ

び AKT のリン酸化を検出できる可能性が示唆される。

細胞周期系の構成要素であるサイクリン D1 は、細胞周期を調節する因子として、また転写を調節する因子として機能している。我々は、サイクリン D1 の発現が LF 添加後 48 時間で増加することを示した。サイクリン D1 の発現は ERK1/2 および AKT シグナル伝達経路に依存されていることから³²⁻³⁴、サイクリン D1 が関わる細胞周期の調節は、唾液腺の分枝形態形成において ERK1/2 および AKT シグナル伝達経路によって調節される可能性が示唆される。リン酸化した ERK1/2 および AKT は、LF を添加した後わずか 10 分で増加したが、サイクリン D1 の発現が増加したのはそれよりも後であった。実際は LF 添加後に唾液腺が分枝形態形成を促進していることから、細胞周期の進行も LF を添加した直後に始まると考えられる。*ex vivo* による唾液腺の器官培養は、器官本来の生物学的な生理反応を検出する点においては *in vitro* での細胞株培養よりも有用なシステムであると考えられるが、この培養システムは非常に複雑である。従って、細胞株よりも複雑なシグナルメカニズムを有する *ex vivo* の器官培養法が原因でサイクリン D1 の発現の増加に遅れが生じた可能性が示唆される。しかしながら、本研究ではリン酸化した ERK1/2 および AKT の発現の増加から、サイクリン D1 の発現の増加までに時間差がある明確な理由を明らかにすることはできなかった。

最近の研究において LF が放射線防護作用を持つことが示されたが²¹、そのメカニズムは明らかにされていなかった。本研究で我々は唾液腺に焦点を当てた *in vivo* と *ex vivo* の検討において、LF が放射線防護作用を有することを初めて示した。放射線照射後に腺房細胞の損傷および形態学的変化が観察されたが、LF を導入すると腺房構造が維持されていた。以前の研究で ERK1/2 および AKT シグナル伝達経路が放射線作用に関与していることが報告されている^{7,49}。また成長因子の 1 つである FGF-20 は ERK1/2 および AKT シグナル伝達経路を介して放射線防護に関与している⁵⁰。我々は分枝形態形成や細胞増殖を促進する LF がこれらのシグナル伝達経路の活性化を誘導することを示したことから、LF の放射線防護作用が ERK1/2 および AKT シグナル伝達経路を介したメカニズムによるものであると考えられた。更に、我々は放射線防護作用が他のメカニズムからも誘導されている可能性も考えている。放射線照射による曝露は細胞周期の遅れをもたらす⁵¹。G1 期は細胞外刺激を受け入れることができる唯一の段階であり、この重要な段階は細胞周期における細胞の運命を決定する。そして、サイクリン D1 は G1 期を通じて細胞周期の進行を制御する上で重要な役割を果たしている²⁸。本研究では、LF の誘導によるサイクリン D1 の発現増加が、ERK1/2 と AKT シグナル伝達経路により調節されている可能性を示した。成長因子は細胞周期が遅延している細胞に対して、G0/G1 から S 期への移行を促進して細胞増殖を促し

ていることから²⁸、LF も ERK1/2 と AKT シグナル伝達経路を介してサイクリン D1 が媒介する細胞周期を促進させて放射線防護機能を獲得していると考えられる。

LF はヒドロキシルラジカルの消去活性を有することが報告されている^{21, 52}。

放射線照射は水分子を生細胞内で分裂させ反応性フリーラジカル（ヒドロキシルラジカル：OH など）を生成し、生物にとって必要不可欠な成分である DNA、タンパク質、およびアミノ酸に深刻なダメージを与える⁵³。酸化ストレスが弱い場合、細胞はそれ自身の修復機能によって生き残ることができるが、より深刻なストレスの場合には細胞は死んでしまう。以前の研究では、LF が鉄をキレート化することによってフェントン反応を抑制して酸化反応を防ぐこと²¹、または活性酸素種のためのラジカルスカベンジャーとして働くことを示している⁵²。これらのヒドロキシルラジカルの消去活性は、我々がこの研究で明らかにした LF の放射線防護機能と相互作用していると考えられる。

これまでに報告されている多くの放射線防護剤は被曝前の投与で予防的な効果を示すと言われているが、唾液腺を使用した本検討では放射線被曝後に LF を投与しても有効な効果を示した。この結果から、我々は将来に向けて LF がもつ 2 つの機能の可能性を提案する。第 1 に、LF は放射線照射後の唾液腺損傷を抑制するための放射線防護剤になり得ること、第 2 に、LF は放射線照射後の唾液腺損傷の回復促進剤になり得ることである。本研究で明らかになった LF の機能

は、将来的に LF が放射線の防護剤や治療薬として臨床応用につながる可能性を示している。臨床応用のためには LF の投与方法や投与後の血中濃度を高く維持するための方法などの検討も必要であるが、LF は安全性が高く健康補助食品としても流通しており、経口剤や注射剤などとして利用できる。更には安価でもあることから、有益な薬剤となるための利点が多くある。本研究で得られた知見をもとにした更なるメカニズムの解析により、LF は放射線による唾液腺障害に対する新たな治療戦略としての応用が期待される。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただきご鞭撻を賜りました大阪大学歯学研究科 高次脳口腔機能学講座 阪井丘芳教授ならびに顎口腔病因病態制御学講座 古郷幹彦教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究に対し多大なるご協力を頂きました高次脳口腔機能学講座 顎口腔機能治療学教室の皆様には厚く御礼申し上げます。

図説明

図 1. 唾液腺における LRP-1 の発現と局在

qPCR (a) およびウエスタンブロッティング (b) による E13 唾液腺における LRP-1 の発現。E13、E15、E17、P1 および P42 の唾液腺における LRP-1 の mRNA 発現 (a)。発現量は E13 唾液腺を 1.0 として標準化。E13 唾液腺における LRP-1 のタンパク質発現 (b)。E13 唾液腺における LRP-1、E-カドヘリン、DAPI、およびそれらの重ね合わせの免疫蛍光画像 (c)。スケールバー:10 μm 。バーは平均値 \pm SEM を表す。

図 2. LF は *ex vivo* の器官培養において顎下唾液腺分枝形態形成を誘導する

1.0 mg/ml の LF 添加後、0 時間、24 時間、48 時間の唾液腺における位相差顕微鏡画像 (a-f)。スケールバー:500 μm 。1.0 mg/ml の LF 添加後、0 時間、24 時間、48 時間の腺房数 (g)。1.0 mg/ml の LF 添加後、48 時間後の唾液腺における細胞増殖のマーカである EdU の蛍光染色画像 (h, i)。細胞骨格である E-カドヘリンの染色画像

(j, k)。細胞核マーカーである DAPI の染色画像 (l, m)。(n) :
(h) の画像を (j) と (l) に結合したもの。(o) : (i) の画像を (k)
と (m) に結合したもの。スケールバー: 500 μm 。EdU の蛍光強度の
比較 (p)。EdU の蛍光強度は E-カドヘリンで正規化。0.1 mg/ml の
LF 添加後、48 時間の唾液腺におけるサイクリン D1 の発現 (q)。
バーは平均値 \pm SEM を表す。 ** $p < 0.01$ vs control

図 3. *ex vivo* の器官培養において LF はリン酸化 ERK1/2 と AKT の
発現量を増加させる

0.1 mg/ml の LF を添加後、0 分、10 分、60 分におけるリン酸化し
た ERK1/2 および AKT の発現量。

図 4. *ex vivo* の器官培養におけるリン酸化した ERK1/2 および AKT
の発現量は LF の用量に依存する

0、0.1、1.0 mg/ml の LF を添加後、0 分、10 分、60 分におけるリ
ン酸化した ERK1/2 および AKT の発現量。

図 5. ERK1/2 経路阻害剤 U0126 と AKT 経路阻害剤 LY294002 は唾液

腺の分枝形態形成と LF 導入後に増加するリン酸化 ERK1/2 と AKT の発現量を抑制する

0.1 mg/ml の LF と共に U0126 または LY294002 を添加後、0 時間、48 時間の唾液腺の位相差顕微鏡画像 (a-h)。スケールバー：500 μm 。0.1 mg/ml の LF と共に U0126 または LY294002 を添加後、10 分、60 分におけるリン酸化した ERK1/2 および AKT の発現量 (i)。0.1 mg/ml の LF と共に U0126 または LY294002 を添加後、48 時間の腺房数の割合 (j)。腺房数は DMSO を 1.0 として標準化。バーは平均値 \pm SEM を表す。** $p < 0.01$ vs control

図 6. *ex vivo* の器官培養において唾液腺は放射線量の線量に依存して形態変化する

放射線 (2-10 Gy) 照射後、0 時間、48 時間の唾液腺における位相差顕微鏡画像。スケールバー：500 μm 。

図 7. *ex vivo* の器官培養において放射線照射が唾液腺の細胞増殖能とアポトーシスに与える影響

放射線 (4 Gy) 照射後、48 時間の唾液腺におけるヘマトキシリン

-エオジン染色像 (a)。上段の写真：スケールバー：100 μm 。下段
の写真：スケールバー：200 μm 。下の 2 つの写真はそれぞれ上の
写真にある赤枠の高倍率。1 視野 (100 μm^2 /視野) 当たりの細胞間
隙の面積の割合 (b)。放射線 (2-4 Gy) 照射後、48 時間の唾液腺に
おける PCNA (増殖細胞核抗原：細胞増殖マーカー) の発現 (c)。
放射線 (2-4 Gy) 照射後、0 時間、48 時間の唾液腺における TUNEL 染
色画像。DAPI による細胞核の染色画像 (d)。下の 9 枚の写真は、
それぞれ上の 9 枚の写真の高倍率。スケールバー：150 μm 。放射
線 (2-4 Gy) 照射後、48 時間の唾液腺における活性カスパーゼ-3 (細
胞アポトーシスマーカー) の発現 (e)。** $p < 0.01$ vs control

図 8. *ex vivo* における放射線照射された唾液腺に対する LF の効
果

0.1 mg/ml の LF 添加後、0 時間、48 時間の唾液腺における位相差
顕微鏡画像 (a-d)。放射線照射 (4 Gy) した唾液腺へ 0.1 mg/ml の
LF 添加後、0 時間、48 時間の唾液腺における位相差顕微鏡画像 (e-
h)。スケールバー：500 μm 。0.1 mg/ml の LF 添加後、24 時間、48
時間の腺房数 (i) および放射線照射した唾液腺に 0.1 mg/ml の LF

添加後、24 時間、48 時間の腺房数 (j)。放射線照射 (4 Gy) した唾液腺に 0.1 mg/ml の LF 添加後、48 時間の唾液腺におけるヘマトキシリン-エオジン染色画像 (k-p)。スケールバー：50 μm 。(m) および (n) は、それぞれ (k) および (l) の高倍率。(o) および (p) は、それぞれ (m) および (n) の高倍率。(q) および (r) の黒い領域は、(o) および (p) の細胞間隙。1 視野 (50 μm^2 /視野) 当たりの細胞間隙の面積の割合 (s)。放射線照射 (4 Gy) した唾液腺へ 0.1 mg/ml の LF 添加後、48 時間の唾液腺における AQP5 mRNA の発現 (t)。バーは平均値 \pm SEM を表す。** $p < 0.01$ vs control

図 9. *in vivo*における放射線照射された唾液腺に対する LF の効果

放射線 (9 Gy) 照射後 4.0 mg/動物の LF を腹腔内投与し、1 週間後に摘出したマウス唾液腺におけるヘマトキシリン-エオジン染色画像 (n = 6) (a-d)。スケールバー：100 μm 。(c) および (d) は、それぞれ (a) および (b) のより高倍率。(f) および (g) は、それぞれ (c) および (d) のより高倍率。1 視野当たりの細胞間隙および腺房細胞によって占められる面積 (250 μm^2 /視野) の割合

(e) および (h) ($n = 3$)。放射線 (9 Gy) 照射後 4.0 mg/動物の LF を投与し、1 週間後に摘出したマウス唾液腺における AQP5 の mRNA 発現 ($n = 9$) (i)。放射線 (9 Gy) 照射後 4.0 mg/動物の LF を投与し、1 週間後に摘出したマウス唾液腺の AQP5、E-カドヘリン、および DAPI を重ね合わせた蛍光染色画像。($n = 4$) (j, k)。スケールバー：50 μm 。AQP5 の蛍光強度の比較 (l)。AQP5 の蛍光強度は E-カドヘリンで正規化。放射線 (9 Gy) 照射後 4.0 mg/動物の LF を投与し、1 週間後に測定したマウス唾液腺のアミラーゼ活性 ($n = 3$) (m)。放射線 (9 Gy) 照射後 4.0 mg/動物の LF を投与し、1 日後に測定した総摂水量。($n = 12$) (n)。バーは平均値 \pm SEM を表す。 ** $p < 0.01$ vs control

引用文献

- 1 Humphrey, S. P. & Williamson, R. T. A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent* **85**, 162-169, doi:10.1067/mpr.2001.113778 (2001).
- 2 Bose, P., Brockton, N. T. & Dort, J. C. Head and neck cancer: from anatomy to biology. *Int J Cancer* **133**, 2013-2023, doi:10.1002/ijc.28112 (2013).
- 3 Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* **67**, 7-30, doi:10.3322/caac.21387 (2017).
- 4 Jensen, S. B. *et al.* A systematic review of salivary gland hypofunction and xerostomia induced by cancer therapies: prevalence, severity and impact on quality of life. *Support Care Cancer* **18**, 1039-1060, doi:10.1007/s00520-010-0827-8 (2010).
- 5 Grundmann, O., Mitchell, G. C. & Limesand, K. H. Sensitivity of salivary glands to radiation: from animal models to therapies. *J Dent Res* **88**, 894-903, doi:10.1177/0022034509343143 (2009).
- 6 Stone, H. B., Coleman, C. N., Anscher, M. S. & McBride, W. H. Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *Lancet Oncol* **4**, 529-536 (2003).
- 7 Koukourakis, M. I. Radiation damage and radioprotectants: new concepts in the era of molecular medicine. *Br J Radiol* **85**, 313-330, doi:10.1259/bjr/16386034 (2012).
- 8 Legrand, D., Ellass, E., Pierce, A. & Mazurier, J. Lactoferrin and host defence: an overview of its immuno-modulating and anti-inflammatory properties. *Biometals* **17**, 225-229 (2004).
- 9 Gifford, J. L., Hunter, H. N. & Vogel, H. J. Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cell Mol Life Sci* **62**, 2588-2598, doi:10.1007/s00018-005-5373-z (2005).
- 10 Ward, P. P., Paz, E. & Conneely, O. M. Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview. *Cell Mol Life Sci* **62**, 2540-2548, doi:10.1007/s00018-005-5369-8 (2005).
- 11 Hashizume, S., Kuroda, K. & Murakami, H. Identification of lactoferrin as an essential growth factor for human lymphocytic cell lines in serum-free medium. *Biochim Biophys Acta* **763**, 377-382 (1983).

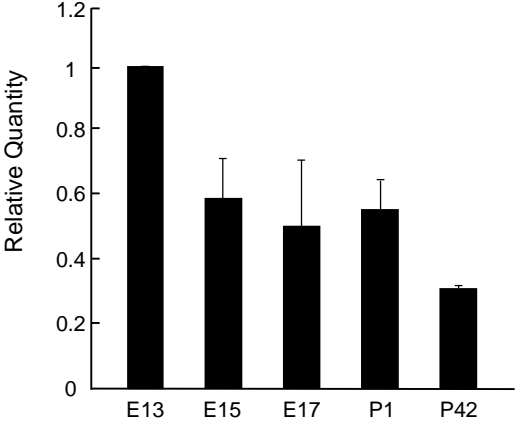
- 12 Cornish, J. *et al.* Lactoferrin is a potent regulator of bone cell activity and increases bone formation in vivo. *Endocrinology* **145**, 4366-4374, doi:10.1210/en.2003-1307 (2004).
- 13 Ward, P. P. *et al.* Restricted spatiotemporal expression of lactoferrin during murine embryonic development. *Endocrinology* **140**, 1852-1860, doi:10.1210/endo.140.4.6671 (1999).
- 14 Zimecki, M., Artym, J. & Kocieba, M. Endogenous steroids are responsible for lactoferrin-induced myelopoiesis in mice. *Pharmacol Rep* **61**, 705-710 (2009).
- 15 Baveye, S. *et al.* Human lactoferrin interacts with soluble CD14 and inhibits expression of endothelial adhesion molecules, E-selectin and ICAM-1, induced by the CD14-lipopolysaccharide complex. *Infect Immun* **68**, 6519-6525 (2000).
- 16 Herz, J. & Strickland, D. K. LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest* **108**, 779-784, doi:10.1172/JCI13992 (2001).
- 17 Akiyama, Y. *et al.* A lactoferrin-receptor, intelectin 1, affects uptake, sub-cellular localization and release of immunochemically detectable lactoferrin by intestinal epithelial Caco-2 cells. *J Biochem* **154**, 437-448, doi:10.1093/jb/mvt073 (2013).
- 18 Legrand, D. *et al.* Surface nucleolin participates in both the binding and endocytosis of lactoferrin in target cells. *Eur J Biochem* **271**, 303-317, doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03929.x (2004).
- 19 Lillis, A. P., Van Duyn, L. B., Murphy-Ullrich, J. E. & Strickland, D. K. LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev* **88**, 887-918, doi:10.1152/physrev.00033.2007 (2008).
- 20 Lin, L. & Hu, K. LRP-1: functions, signaling and implications in kidney and other diseases. *Int J Mol Sci* **15**, 22887-22901, doi:10.3390/ijms151222887 (2014).
- 21 Nishimura, Y., Homma-Takeda, S., Kim, H. S. & Kakuta, I. Radioprotection of mice by lactoferrin against irradiation with sublethal X-rays. *J Radiat Res* **55**, 277-282, doi:10.1093/jrr/rrt117 (2014).
- 22 Levay, P. F. & Viljoen, M. Lactoferrin: a general review. *Haematologica* **80**, 252-267 (1995).
- 23 Vorland, L. H. Lactoferrin: A multifunctional glycoprotein. *Apmis* **107**, 971-981 (1999).
- 24 Grey, A., Zhu, Q., Watson, M., Callon, K. & Cornish, J. Lactoferrin potently inhibits osteoblast apoptosis, via an LRP1-independent pathway. *Mol Cell Endocrinol* **251**, 96-102, doi:10.1016/j.mce.2006.03.002 (2006).

- 25 Ikoma-Seki, K. *et al.* Role of LRP1 and ERK and cAMP Signaling Pathways in Lactoferrin-Induced Lipolysis in Mature Rat Adipocytes. *PLoS One* **10**, e0141378, doi:10.1371/journal.pone.0141378 (2015).
- 26 Onodera, T. *et al.* Btbd7 regulates epithelial cell dynamics and branching morphogenesis. *Science* **329**, 562-565, doi:10.1126/science.1191880 (2010).
- 27 Steinberg, Z. *et al.* FGFR2b signaling regulates ex vivo submandibular gland epithelial cell proliferation and branching morphogenesis. *Development* **132**, 1223-1234, doi:10.1242/dev.01690 (2005).
- 28 Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M. J., Pagano, M. & Draetta, G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. *Genes Dev* **7**, 812-821 (1993).
- 29 Kashimata, M. *et al.* The ERK-1/2 signaling pathway is involved in the stimulation of branching morphogenesis of fetal mouse submandibular glands by EGF. *Dev Biol* **220**, 183-196, doi:10.1006/dbio.2000.9639 (2000).
- 30 Larsen, M. *et al.* Role of PI 3-kinase and PIP3 in submandibular gland branching morphogenesis. *Dev Biol* **255**, 178-191 (2003).
- 31 Mantuano, E., Mukandala, G., Li, X., Campana, W. M. & Gonias, S. L. Molecular dissection of the human alpha2-macroglobulin subunit reveals domains with antagonistic activities in cell signaling. *J Biol Chem* **283**, 19904-19911, doi:10.1074/jbc.M801762200 (2008).
- 32 Meloche, S. & Pouysségur, J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* **26**, 3227-3239, doi:10.1038/sj.onc.1210414 (2007).
- 33 Muise-Helmericks, R. C. *et al.* Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J Biol Chem* **273**, 29864-29872 (1998).
- 34 Liang, J. & Slingerland, J. M. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* **2**, 339-345 (2003).
- 35 Medina, V. A. *et al.* Histamine prevents functional and morphological alterations of submandibular glands induced by ionising radiation. *Int J Radiat Biol* **87**, 284-292, doi:10.3109/09553002.2010.533247 (2011).
- 36 Fang, D. *et al.* Identification of the active components in Bone Marrow Soup: a mitigator against irradiation-injury to salivary glands. *Sci Rep* **5**, 16017, doi:10.1038/srep16017 (2015).
- 37 Morgan-Bathke, M. *et al.* Autophagy correlates with maintenance of salivary gland function following radiation. *Sci Rep* **4**, 5206, doi:10.1038/srep05206

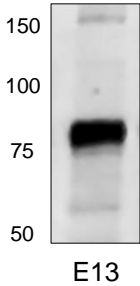
- (2014).
- 38 Stephens, L. C. *et al.* Unique radiosensitivity of serous cells in rhesus monkey submandibular glands. *Am J Pathol* **124**, 479-487 (1986).
 - 39 Knox, S. M. *et al.* Parasympathetic stimulation improves epithelial organ regeneration. *Nat Commun* **4**, 1494, doi:10.1038/ncomms2493 (2013).
 - 40 Obana-Koshino, A. *et al.* Melatonin inhibits embryonic salivary gland branching morphogenesis by regulating both epithelial cell adhesion and morphology. *PLoS One* **10**, e0119960, doi:10.1371/journal.pone.0119960 (2015).
 - 41 Krysko, D. V., Vanden Berghe, T., D'Herde, K. & Vandenabeele, P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods* **44**, 205-221, doi:10.1016/j.ymeth.2007.12.001 (2008).
 - 42 An, H. Y. *et al.* Adipose Mesenchymal Stem Cell Secretome Modulated in Hypoxia for Remodeling of Radiation-Induced Salivary Gland Damage. *PLoS One* **10**, e0141862, doi:10.1371/journal.pone.0141862 (2015).
 - 43 Ogawa, M. *et al.* Functional salivary gland regeneration by transplantation of a bioengineered organ germ. *Nat Commun* **4**, 2498, doi:10.1038/ncomms3498 (2013).
 - 44 Teng, C. T. Lactoferrin gene expression and regulation: an overview. *Biochem Cell Biol* **80**, 7-16 (2002).
 - 45 Martinel Lamas, D. J. *et al.* Protection of radiation-induced damage to the hematopoietic system, small intestine and salivary glands in rats by JNJ7777120 compound, a histamine H4 ligand. *PLoS One* **8**, e69106, doi:10.1371/journal.pone.0069106 (2013).
 - 46 Hoffman, M. P. *et al.* Gene expression profiles of mouse submandibular gland development: FGFR1 regulates branching morphogenesis in vitro through BMP- and FGF-dependent mechanisms. *Development* **129**, 5767-5778 (2002).
 - 47 Ambesi, A. & McKeown-Longo, P. J. Conformational remodeling of the fibronectin matrix selectively regulates VEGF signaling. *J Cell Sci* **127**, 3805-3816, doi:10.1242/jcs.150458 (2014).
 - 48 Vissink, A., 's-Gravenmade, E. J., Ligeon, E. E. & Konings, W. T. A functional and chemical study of radiation effects on rat parotid and submandibular/sublingual glands. *Radiat Res* **124**, 259-265 (1990).
 - 49 Begg, A. C., Stewart, F. A. & Vens, C. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nat Rev Cancer* **11**, 239-253, doi:10.1038/nrc3007 (2011).
 - 50 Maclachlan, T. *et al.* Human fibroblast growth factor 20 (FGF-20; CG53135-05): a novel cytoprotectant with radioprotective potential. *Int J Radiat Biol* **81**,

- 567-579, doi:10.1080/09553000500211091 (2005).
- 51 Maity, A., McKenna, W. G. & Muschel, R. J. The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: a review. *Radiother Oncol* **31**, 1-13 (1994).
- 52 Ogasawara, Y., Imase, M., Oda, H., Wakabayashi, H. & Ishii, K. Lactoferrin directly scavenges hydroxyl radicals and undergoes oxidative self-degradation: a possible role in protection against oxidative DNA damage. *Int J Mol Sci* **15**, 1003-1013, doi:10.3390/ijms15011003 (2014).
- 53 Carochi, M. & Ferreira, I. C. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol* **51**, 15-25, doi:10.1016/j.fct.2012.09.021 (2013).

a



b



c

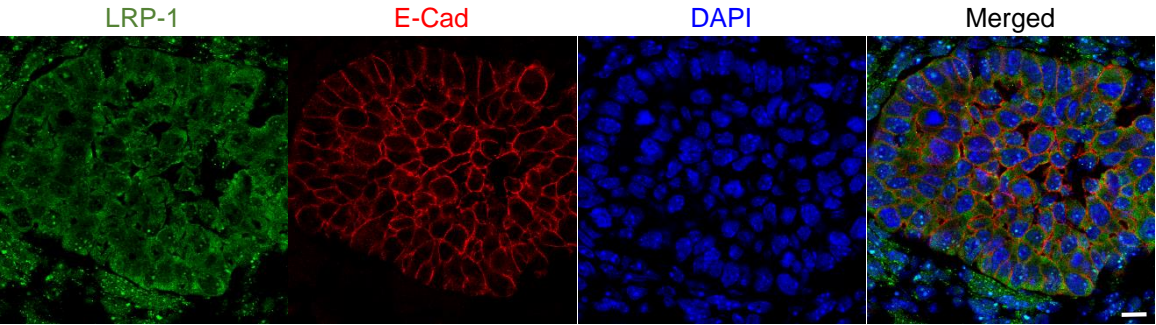


图 1

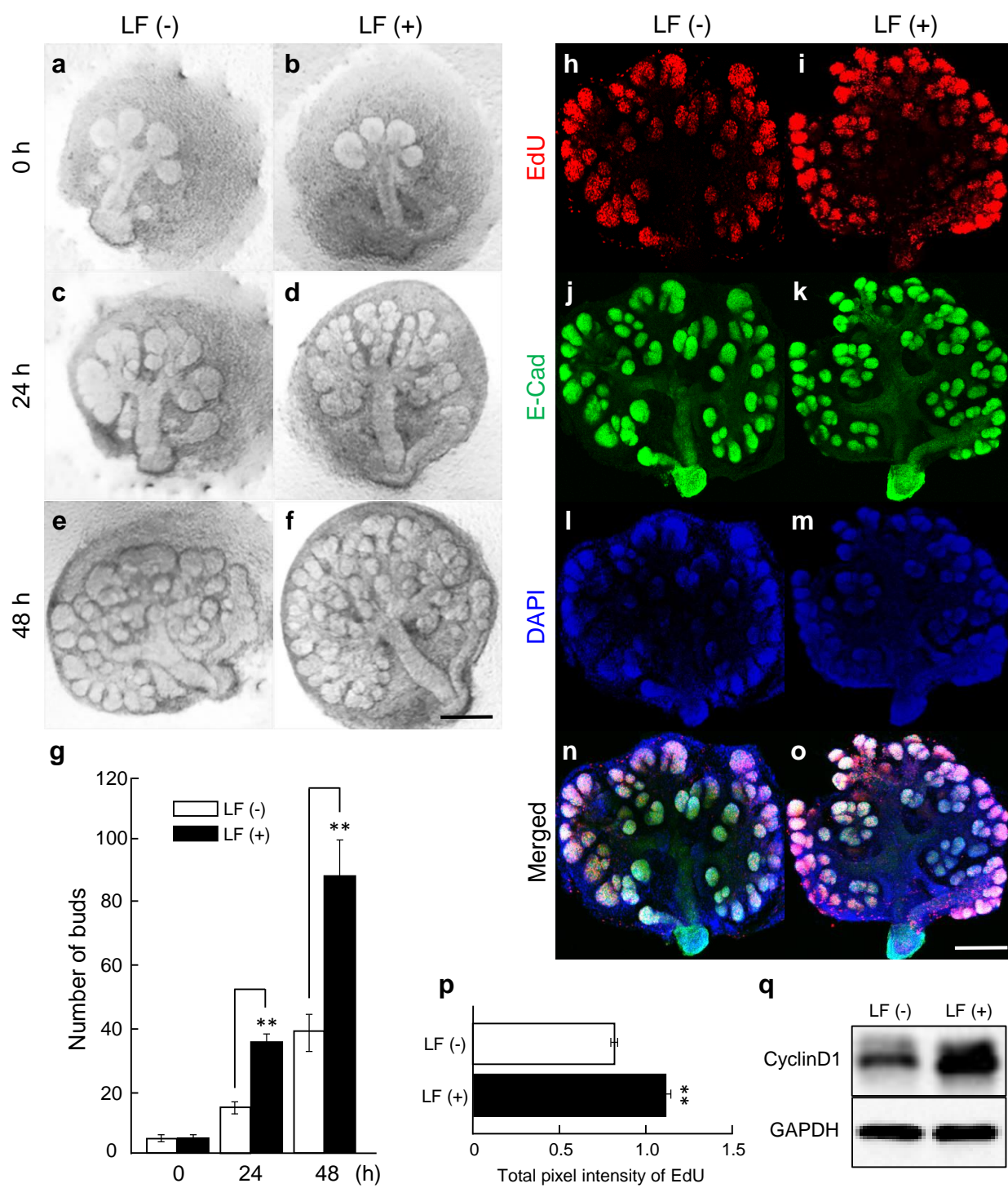


图 2

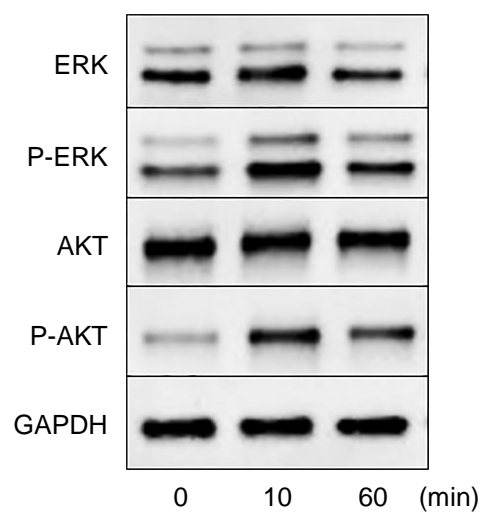


图 3

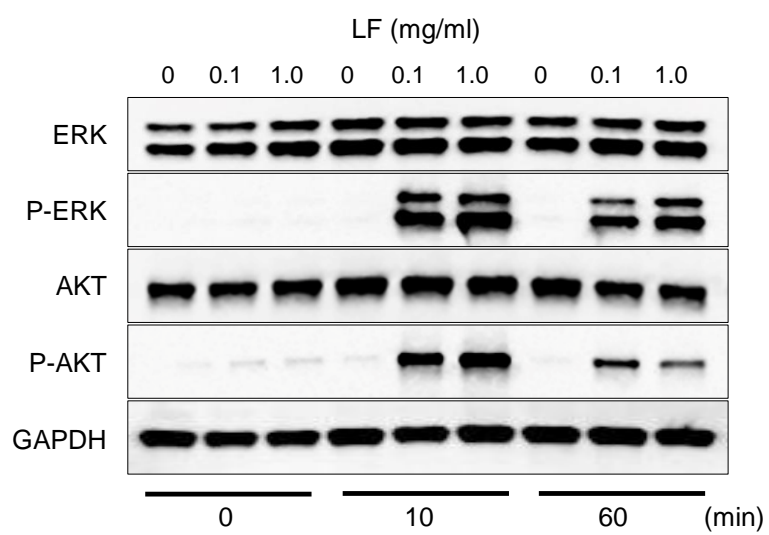


图 4

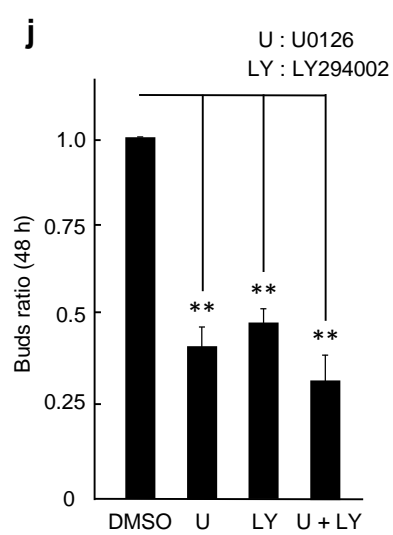
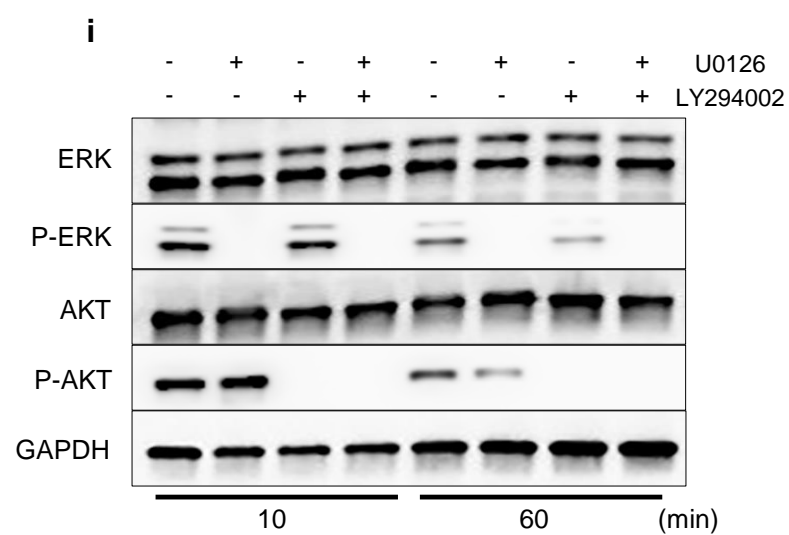
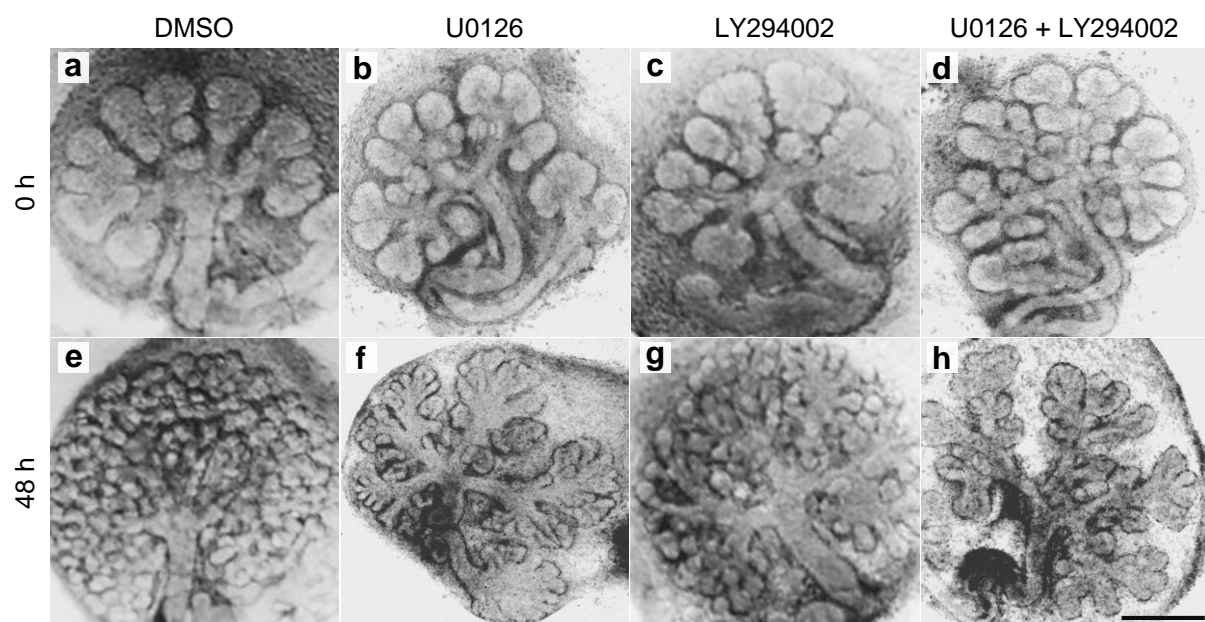


图 5

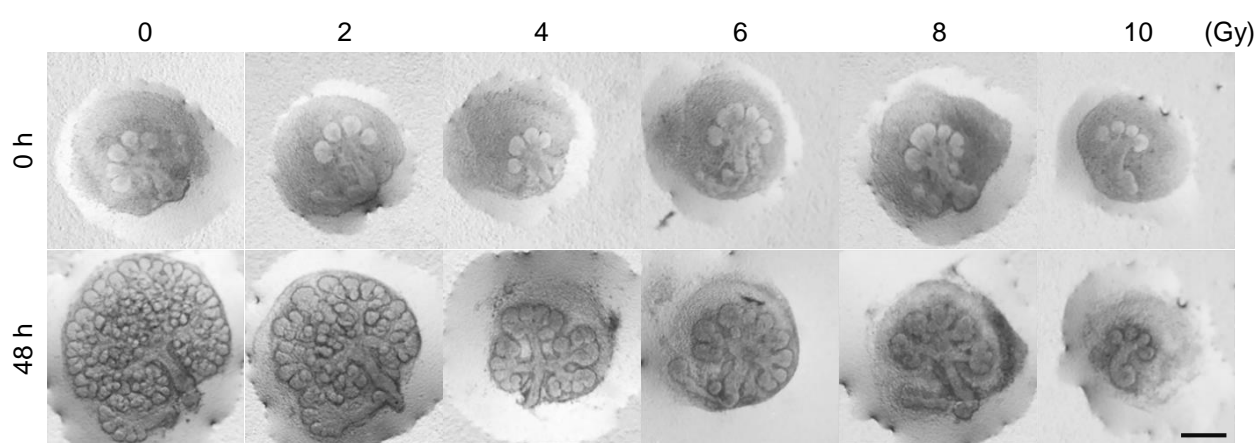


图 6

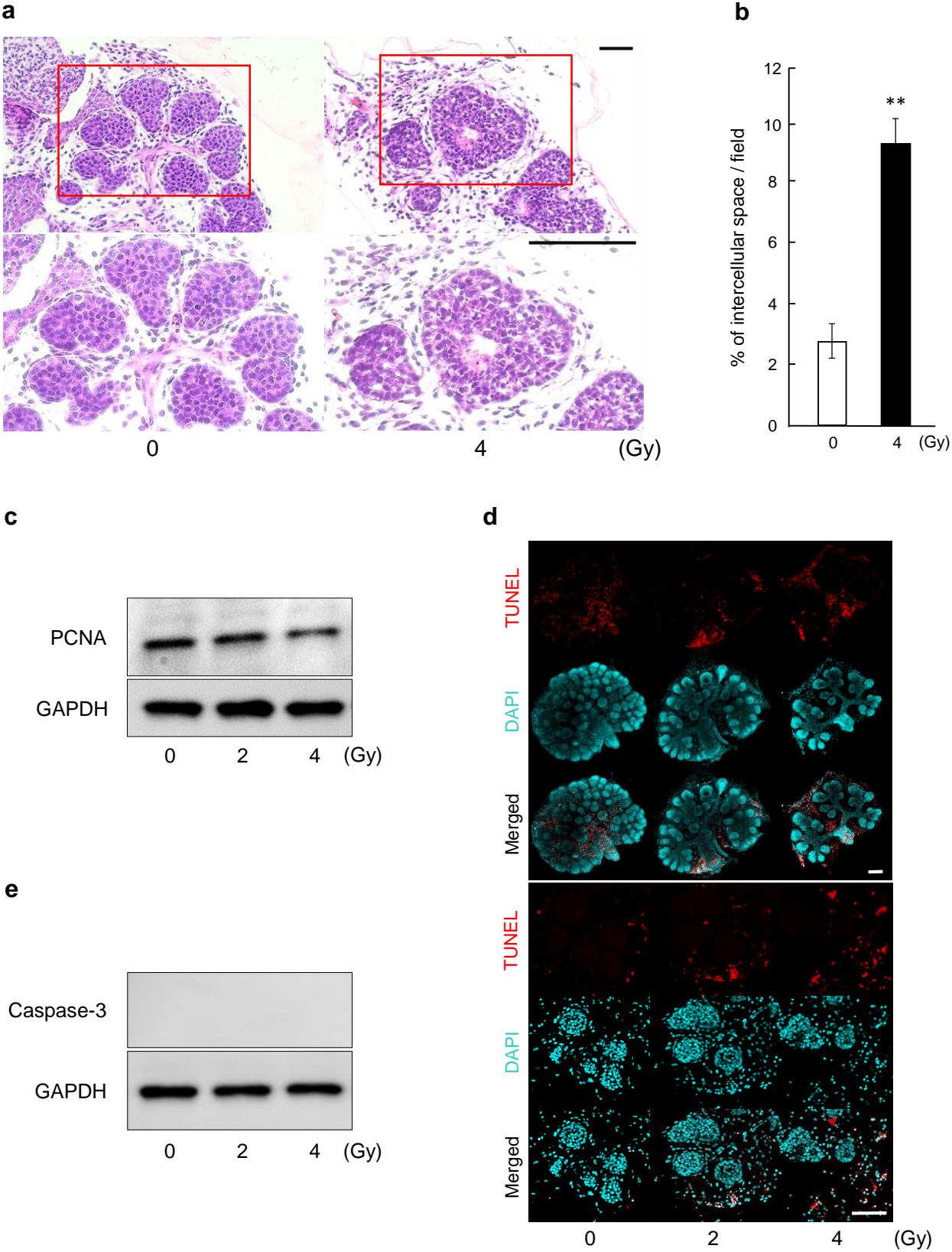


图 7

