

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19592320

研究課題名 (和文) ラット顎下腺再生過程における基礎的研究

研究課題名 (英文) The study during regeneration of rat submandibular gland

研究代表者

清水 治 (SHIMIZU OSAMU)

日本大学・歯学部・専任講師

研究者番号：40260971

研究成果の概要：唾液腺の再生医療を臨床実現するためには動物を用いた基礎的研究が重要である。本研究では、顎下腺が再生するモデルを実験的に作り出し、その過程にどのようなタンパクが関与しているのかを検索した。また、治療の一貫として利用可能と考えられる唾液腺への注入に関しても検討を加えた。その結果、成長因子や細胞外にある基質としてのタンパクが再生に関与しており、薬剤の逆行性注入が有用であることが判明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：再生医療学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：ラット、顎下腺、再生、FGF、細胞外基質、逆行性注入

## 1. 研究開始当初の背景

ラット顎下腺主導管を結紮すると腺房は萎縮する。その後の解除により腺房細胞の再生が始まり、正常な顎下腺が再生される。この実験系は、腺房細胞再生メカニズム解明のモデルとして有用であり広く用いられている。

FGF ファミリーは細胞の増殖因子としての働きがあり、唾液腺の発生や顆粒性導管の出現・増殖に関与しているといわれているが、FGF 及び FGF-Receptor が再生過程の腺房細胞や導管細胞の構造変化にどのような影響を与えるかは不明な点が多い(上田らのグループが、FGF2 が腺房細胞の増殖に関与して

いると報告。Ohuchi らは、FGF10 の null mouse では、顎下腺の形成不全が生じたと報告)。

一方、唾液腺再生過程における細胞外基質に関しては、ラミニンが関与しているとの報告はあるが、それ以外に関しては殆ど不明である。現在、腺房細胞再生に関与するタンパクのラインアップおよびその詳細な検索が待たれている。

## 2. 研究の目的

本研究では、ラット顎下腺主導管結紮解除後の腺房細胞や導管細胞の再生過程における FGF 及び FGF-Receptor あるいは細胞外基質の役割を検討するため、先ず、免疫組織化

学を利用して、その局在をほぼ網羅的に観察する。今回の唾液腺の再生過程における FGFs と FGFRs また細胞外基質の局在を詳細に検討することにより、唾液腺再生医療に貢献できると考えている。現在までの、唾液腺再生医療に関しては、粘膜・骨・軟骨といった口腔組織の再生医療の分野の中では遅れており、臨床的データは勿論のこと基礎的データが不足しているのが現状である。今回の結果により、in vivo あるいは in vitro に応用可能なデータが得られると思われる。

### 3. 研究の方法

8 週齢のラット腹腔内にネンブタール 25mg/kg を投与した後、顎下部に皮切を加え、チタン mini clip で左右の顎下腺主導管を腺体に近い部位で結紮した。結紮 4 日後に mini clip を除去した。結紮 2 日目、解除（結紮 4 日目）後、0, 3, 7, 11, 14, 21 日目に顎下腺を摘出した後、それを 2 分割し、一方をパラフィン切片とし、もう一方を、OCT コンパウンドに包埋後、凍結切片とし、これらの切片を組織化学および免疫組織化学に供した。なお、各実験群につき 10 匹のラットを、また、コントロールとして sham operation したラットを 2 匹ずつ用いた。

まず、組織化学としてパラフィン切片を用い、HE, periodic acid-schiff (PAS), alcian blue (AB) 染色を行い、腺房の萎縮および解除後の再生過程を形態学的に確認した。

次に、凍結切片を用いて免疫組織化学を行った。一次抗体は、Goat anti-human FGF1 ~11 抗体, Rabbit anti-human FGFR1 抗体および Rabbit anti-human FGFR 抗体（いずれも Santa Cruz 社）、fibronectin, Tenascin-C, type I, III, IV collagen 抗体を使用し HRP 標識の二次抗体を用い、DAB 発色にて観察した。

### 4. 研究成果

(1) ラット顎下腺主導管結紮モデルを用い顎下腺の萎縮・再生過程における FGF とその receptor の局在を免疫組織学的に解析した結果、以下の結論を得た。

①顎下腺再生過程における FGF ファミリーの局在は FGF1, 2, 8, 10 において陽性反応が認められた。特に、FGF2, 10 は萎縮過程ではそれらの発現はそれほど認められず、再生過程でのほぼ同様の時期（結紮解除後 3-7 日目）に小葉間の結合組織に強く観察された。

②FGF1 に関しては、萎縮過程において排泄導管の基底細胞のみ認められるが、再生過程においてはその発現は認められなかった。

③FGF8 は normal 顎下腺においては介在部導管に認められ、萎縮過程では導管様構造に強く反応が認められた。再生過程においては導管様構造に観察された強陽性が腺房再生に

伴って消退し、再生 14 日目には正常顎下腺同様、介在部導管のみに存在していた。

④FGF receptor に関しては R1 が正常腺房細胞から萎縮・再生過程にある腺房に局在していた。R3 に関しては導管様構造に強い反応を認めた。

以上のことから FGF1 萎縮過程に、FGF2, 10 は再生過程に、FGF8 は萎縮再生の両方に関与していることが判明した。

(2) 主導管結紮によるラット顎下腺の萎縮過程および結紮解除後の再生過程を組織学的小および免疫組織化学的に精査し、以下の結論を得た。

①導管結紮 2 日目には広範かつ著明な腺房萎縮が観察された。再生腺房細胞は、結紮解除後 3 日目までに、常態時には存在しない導管様構造と関連して出現し、11 日目までには、腺房構造は正常顎下腺と同様な組織像を呈するに至った。

②萎縮時および再生過程初期でみられる腺房と導管様構造では、基底膜の laminin 陽性反応の特異的な増強が観察され、これらの腺管構造は、顆粒管や線状部とは対照的に、筋上皮細胞で取り囲まれていた。また、萎縮腺房細胞あるいは導管様構造物から生じる未熟な腺房細胞に強い  $\alpha 6 \beta 1$  integrin 陽性反応が認められた。

③laminin と  $\alpha 6 \beta 1$  integrin の局在は、結紮解除後それぞれ 11 あるいは 7 日目までに正常顎下腺とほぼ同様になった。

以上の結果から腺房細胞の再生は、萎縮した残存腺房細胞の回復や導管様構造物からの腺房細胞分化・増殖によって生じ、その再生過程は、腺房および筋上皮細胞が共通基底膜に覆われていることによって促進・制御されると考えられた。

(3) 排出管閉塞性唾液腺疾患における腺実質の萎縮・再生について検討するために顎下腺主導管結紮モデルを用い、その組織変化や細胞外基質(fibronectin, tenascin-c, type III, IV collagen)との関連性を検討した。

①D0 では、顕著な腺房萎縮を認めた。D3 では導管末端部は膨隆し、未熟な腺房細胞が出現した。D7 には腺房細胞は成熟し、D11 までに normal と同様な組織像を呈した。

②tenascin-C は D0 で遠位残存導管上皮に出現した。しかし D7 には陽性反応は減少し、D14 では陰性であった。normal で全ての腺管周囲に認められる fibronectin は、解除後、遠位残存導管周囲に強陽性反応を呈した。しかし D7 には低下し、D14 では normal と同様の局在となった。

③type III および type IV collagen は、normal のすべての腺管構造周囲に陽性反応が認められた。再生過程で type III collagen は同様

の反応であったものの、typeIV collagen は再生腺房および遠位残存導管の陽性反応が増強していた。しかしその局在はD11までに normal と同様の染色強度まで低下した。

上記の結果から tenascin-C および fibronectin は残存導管の腺房細胞分化を誘導するものと考えられた。また type IV collagen は顎下腺再生の分枝形態形成促進に関与するものと示唆された。

#### Tenascin-c の局在

Time point		Area		
clamped	unclamped	acinar	small duct	large duct
Day0(NM)		+	*	-
Day7	Day0(D0)	-	++	-
	Day3(D3)	-	+++	-
	Day7(D7)	-	++	-
	Day11(D11)	-	+	-
	Day14(D14)	+	*	-

#### Fibronectin の局在

Time point		Area		
clamped	unclamped	Acinar	small duct	large duct
Day0(NM)		+	*	+
Day7	Day0(D0)	+	++	+
	Day3(D3)	+	+++	+
	Day7(D7)	+	++	+
	Day11(D11)	+	+	+
	Day14(D14)	+	*	+

#### typeIV collagen の局在

Time point		Area		
clamped	unclamped	acinar	small duct	large duct
Day0(NM)		+	*	+
Day7	Day0(D0)	+++	+++	+
	Day3(D3)	+++	+++	+
	Day7(D7)	++	++	+
	Day11(D11)	+	+	+
	Day14(D14)	+	*	+

(4) ラット顎下腺主導管結紮モデルを作製し、顎下腺の萎縮と再生を病理組織学的に観察するとともに、萎縮した顎下腺の主導管を介して DiI を逆行性に注入し、薬剤投与後の拡散範囲を検討した。

①4 日間の主導管結紮により顎下腺の重量は正常時のやく 55%となり、病理組織学的検索において閉塞性唾液腺炎の病態を確認した。また、結紮解除後、腺房細胞は一旦消失するものの、速やかに再生することを病理組織学的に観察した。

②萎縮した顎下腺主導管から DiI 逆行性注入後、結紮解除直後で頭側領域のみに貯留していた DiI は注入後 1 日目では顎下腺中央および尾側領域の約 80%以上に拡散し。注入後 2

日目ではさらに拡散が認められ、DiI が小葉内導管末梢部にまで達していることが確認された。

以上の結果から、ラット顎下腺主導管結紮モデルにおいて、顎下腺の萎縮・再生が速やかに起こることを明らかにした。さらに顎下腺主導管内注入法は、萎縮性唾液腺炎の薬剤投与経路として有効であることが示唆された。

これらの結果の一部を英文雑誌に投稿し受理されたことから分かるように、本研究は唾液腺の再生過程解明に大きな役割を果たしていると考えている。唾液腺は唾液を合成・分泌する腺房細胞を包むように筋上皮細胞が存在し、そこから口腔に向かって介在部、顆粒管、線状部、分泌導管とつながっており非常に複雑な構造を呈している。したがって、器官としての再生に関しては種々のタンパクが関与していると考えられ、器官再生はこれからかなりの時間と労力が必要になると考えられる。また、近年 ES 細胞や iPS 細胞を用いた報告が盛んに行なわれているものの、それは端緒についたばかりである。我々の唾液腺再生の研究は、臨床応用を視野にいれ iPS 細胞を用いた研究を始めており、更なる前進を目指しているが、これまでの基礎的研究が iPS 細胞を用いた現在の研究に大いに役立っている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

①Ueda K, Shimizu O, Oka S, Saito M, Hide M, Matsumoto M, Distribution of tenascin-C, fibronectin and collagen types III and IV during regeneration of rat submandibular gland, Int J Oral Maxillofac Surg, 38, 79-84, 2009, 査読有

②上田浩一郎、清水 治、白井理生、秀 真理子、上原浩之、生木俊輔、本田雅彦、関和忠信、小野正道、寺門正昭、ラット顎下腺主導管による萎縮顎下腺への薬剤拡散効果と顎下腺再生、日大歯学、82、17-23、2008、査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

①上田浩一郎、ラット顎下腺再生過程における tenascin-C, fibronectin, type III, IV collagen の発現、第 63 回日本口腔科学会、2009 年 4 月 16 日、浜松

②上田浩一郎、主導管結紮モデルによるラット顎下腺萎縮再生過程の組織学的変化、第 53 回日本唾液腺学会、2008 年 12 月 6 日、東京

③上田浩一朗、ラット顎下腺再生過程における laminin と integrin の局在、第 53 回日本口腔外科学会総会、2008 年 10 月 21 日、徳島

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清水 治 (Shimizu Osamu)  
日本大学・歯学部・専任講師  
研究者番号：40260971

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

磯川桂太郎 (Isokawa Keitaro)  
日本大学・歯学部・教授  
研究者番号：50168283