

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19248

研究課題名(和文) 顎下腺再生過程での細胞骨格変化・Wnt/ β -catenin経路に関する基礎的研究研究課題名(英文) Alteraiton of the cytoskeleton and Wnt/ β -catenin signaling pathway during regeneration of the rat submandibular gland

研究代表者

白土 博司 (SHIRATSUCHI, Hiroshi)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：50710844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：ラット顎下腺主導管結紮動物実験モデルを用いて硬化性唾液腺炎の治癒過程を検索した。7日間の主導管結紮を行い、解除後0日(D0)、3日(D3)、7日(D7)、11日(D11)、14日(D14)の再生過程にある顎下腺を摘出し組織切片を製作した。HEおよびPAS染色にて形態的变化を追跡した。D0では顕著な腺房萎縮を認め、再生腺房細胞は、D3までに常態時には存在しない導管様構造物と関連して出現し経時的に増加した。D14で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。細胞骨格を制御する因子の検索を行い、 β -catenin、wnt-1/2/3/10が唾液腺再生に関与していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唾液腺の再生過程はその発生過程と類似点が多いとされているが、その詳細については未解明な点が多く存在する。本研究は硬化性唾液腺炎を模した動物実験モデル(ラット顎下腺主導管結紮モデル)を用い、唾液腺の再生過程でどのような構造上の変化が生じているのか？その変化の中で各種タンパク質の局在がどのように変化しているのか？を明らかにすべく実施された。本研究は、今後の再生医療に繋がる基礎的実験データの収集を目的として実施された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to evaluate the regenerating process by using rat submandibular gland duct ligation animal model. This study enabled us to assess the roles of the various proteins during regeneration of the submandibular gland. Additionally, the correlation between cytoskeleton and β -catenin was detected in this study. Interestingly, the result indicated that wnt/ β -catenin signaling pathway contributed the submandibular gland regeneration.

研究分野：口腔外科学

キーワード：唾液腺 硬化性唾液腺炎 細胞骨格 細胞分化 免疫組織化学 動物実験モデル

1. 研究開始当初の背景

(1) 国内・国外の研究動向及び位置づけ

再生医療が全盛の昨今、唾液腺再生に関してはなかなか端緒を見つけれないのが現状である。その理由の1つに唾液腺組織の複雑さがある。唾液は腺房細胞にて産生されたのち、介在部導管、顆粒管(げっ歯類に特有)、線状部導管を経て排泄導管が口腔内に開口する。また、介在部導管と腺房細胞は筋上皮細胞で覆われており、唾液分泌と密接に関連している。

現在、唾液腺再生医療に寄与する基礎的研究の1つとして唾液腺の主導管を結紮することによって作成する萎縮・再生実験動物モデルが有用であり、三大唾液腺組織で多少の違いはあるものの、一様のコンセンサスが得られている。

ラット顎下腺主導管結紮・解除を例にとると、先ず顕著で広範な腺房細胞の萎縮が始まり、小葉内導管の拡張と結合組織の増生が起きる。その後の結紮解除により、腺房細胞の再生が始まり、正常な顎下腺本来の構造に修復される。この腺房細胞の再生過程では、残存した腺房細胞の増殖以外の経路が存在するという報告(Takahashi S et al 2001, J Histo Cyto, 49,1557-1564)があり、そのoriginについて不明な部分が数多く残っている。

これまで、腺房細胞への再生能をもつ細胞は、介在部導管の上皮(Burgess KI et al 1996, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod), 導管様構造物の上皮(Tamarin A 1971 J Ultras Res, Takahashi et al 1992, Arch Histol Cytol, Takahashi S et al 1998, Int J Exp Pathol,)、あるいはterminal tubule cell (Hanks et al. 1971, Am J Anat)などに存在すると報告されている。

しかしながらそれらを構成する細胞がどのように増殖し、腺房細胞に分化するかについては未だ不明な点が多い。再生医療に繋がる基礎実験としてこの再生モデルは非常に有用なツールであり、今なお多くの研究者が使用している。

(2) 着想に至った経緯

われわれはこれまでラット顎下腺結紮モデルを用いてその再生過程における細胞外基質の変化を解析してきた(Ueda K et al. 2009, Int J Oral Maxillofac Surg 38,79-84, 上田浩一朗 2008, 日大歯学 82, 139-146)。

再生過程における Tenascin, Fibronectin, laminin, type Ⅰ と collagen の局在を検索では、Tenascin と Fibronectin が導管様構造に観察され、laminin と type Ⅰ collagen は導管様構造と残存腺房細胞、新しく形成された腺房細胞周囲に肥厚した強い反応として認められた。このことは、ラット顎下腺再生過程において細胞外基質には drastic な変化が生じていることを表し、その変化は腺房細胞の再生に重要な役割を果たしていることが示唆された。

この研究に引き続きわれわれは、同一の動物モデルを用い、Small Rho GTPase および β -catenin の局在変化について検討を行った(Shiratsuchi H et al. 2012, J Mol Hist 41,751-759)。その結果、腺房細胞再生、導管組織再生の両者に細胞骨格変化が関与しており、その細胞骨格変化は、腺房細胞では RhoA および RhoC によって、導管様構造物や介在部導管では Rac1 および β -catenin によって、それぞれ調節されていることが明らかになった。

しかし、唾液腺再生過程での細胞骨格変化や古典的 Wnt/ β -catenin でのシグナル伝達に関わるタンパク質の局在変化については不明な点が多い。本研究では、唾液腺再生過程でのそれらの局在変化を分析することを目的とした。

2. 研究の目的

唾液腺排出管閉塞性疾患として位置づけられる唾石症は、口腔外科の臨床において、診断・治療の両面において重要な一角をなす。唾石症では唾液の分泌障害により腺実質の変性、萎縮、壊死が惹起される。その腺実質の萎縮過程や再生の可能性について、われわれはこれまで顎下腺主導管結紮動物実験モデルを用い、唾液腺再生過程での細胞外基質の変化やその関連因子の局在について報告してきた(Ueda K et al. 2009, Shiratsuchi H et al. 2012, Shimizu O et al. 2015, Yasumitsu T et al. 2018)。しかし、唾液腺再生過程での細胞骨格変化や古典的 Wnt/ β -catenin シグナル伝達に関わるタンパク質の局在変化については不明な点が多い。

本研究では、唾液腺再生過程でのそれらの局在変化を分析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物実験手技

8週齢の Wistar 系雄性ラットを用いた。腹腔内にネブタール 50 mg/kg を投与した後、顎下部に 1/8 万アドレナリン含 2% リドカイン 0.3ml を局所麻酔し、替刃メスで鋭的に皮膚切開を加えたのち、皮下組織を鈍的剥離することで展開、左右の顎下腺主導管を明示した。その後、左右の顎下腺主導管を腺体に近い部位でチタン mini clip を用いて結紮し、皮弁を 4-0 ナイロン糸で閉鎖創となるよう縫合した。結紮 7 日後に再度、ラット腹腔内にネブタール 50 mg/kg を投与し、前回皮膚切開を加えた部位を再度切開、鉗子を用いてチタン mini clip を除去することで結紮解除とし、顎下腺を摘出後、以下の実験へ供した。なお、コントロールとしては結紮していない正常顎下腺を用いた。

(2) sample の採取

ラット顎下腺主導管をチタン mini clip にて 7 日間結紮した顎下腺，その後解除して 3，7，11 および 14 日間経過した顎下腺，さらに，対照群として主導管非結紮の顎下腺を採取した。

採取した顎下腺を長軸方向に 2 分割し，一方をパラフィン包埋切片製作に，他方を新鮮凍結切片製作に，それぞれ供した。

(3) 組織学的検索

通法に従いパラフィン包埋切片について H-E，periodic acid-schiff (PAS) 染色を行った。

(4) -catenin 等の局在

採取した顎下腺について凍結切片を製作し，免疫組織化学的検索を F-actin，-catenin，wnt-1，wnt-2，wnt-3，wnt-4，wnt-5，wnt-10 について行った。F-actin，-catenin，wnt-1，wnt-2，wnt-3，wnt-4，wnt-5，wnt-10 を特異的に認識する抗体を用いて，それらの局在を下記プロトコルによる染色で免疫組織化学的検索を行った。

凍結切片を室温で 60 分乾燥，PBS にて洗浄

4 で 15 分間のアセトン固定，PBS にて洗浄

非特異的反応のブロッキング，PBS にて洗浄

希釈した 1 次抗体を 4 で over night，PBS で洗浄

室温で HRP-標識の 2 次抗体を 60 分間反応，PBS で洗浄

通法通り封入し，顕鏡した。

4. 研究成果

(1) 顎下腺再生過程の評価

解除後 0 日(D0)，3 日目(D3)，7 日目(D7)，11 日目(D11)，14 日目(D14)の再生過程にある顎下腺を摘出しパラフィン包埋組織切片を製作。H-E 染色および PAS 染色にて形態的变化を追跡した。

H-E 染色および PAS 染色にて結紮解除後 0 日では，顕著な腺房萎縮を認めた。再生腺房細胞は，D3 までに常態時には存在しない導管様構造物と関連して出現し，D7～D11 にかけて経時的な増加を認めた。D14 では，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) 免疫組織学的解析

免疫組織化学的検索を F-actin，-catenin，wnt-1，wnt-2，wnt-3，wnt-4，wnt-5，wnt-10 について行った。

-SMA の局在

正常顎下腺にて腺房細胞および介在部導管周囲に -SMA の局在が認められた。顎下腺の萎縮再生過程においては D0～D11 にて導管様構造物および再生腺房細胞周囲にその局在を認めた。D14 では正常顎下腺と同様な分布を呈した。

F-actin の局在

正常顎下腺にて介在部導管の管腔側・腺房細胞基底側にそれぞれ F-actin の局在が認められた。顎下腺の萎縮再生過程においては D0～D11 にて導管様構造物の管腔側・再生腺房細胞の基底側にそれぞれ局在を認めた。D14 では正常顎下腺と同様な分布を呈した。

-catenin の局在

正常顎下腺の腺房細胞において細胞間での -catenin の局在を認めた。

再生過程において，D0～D11 にて導管様構造物の管腔側・細胞間に局在を認めた。

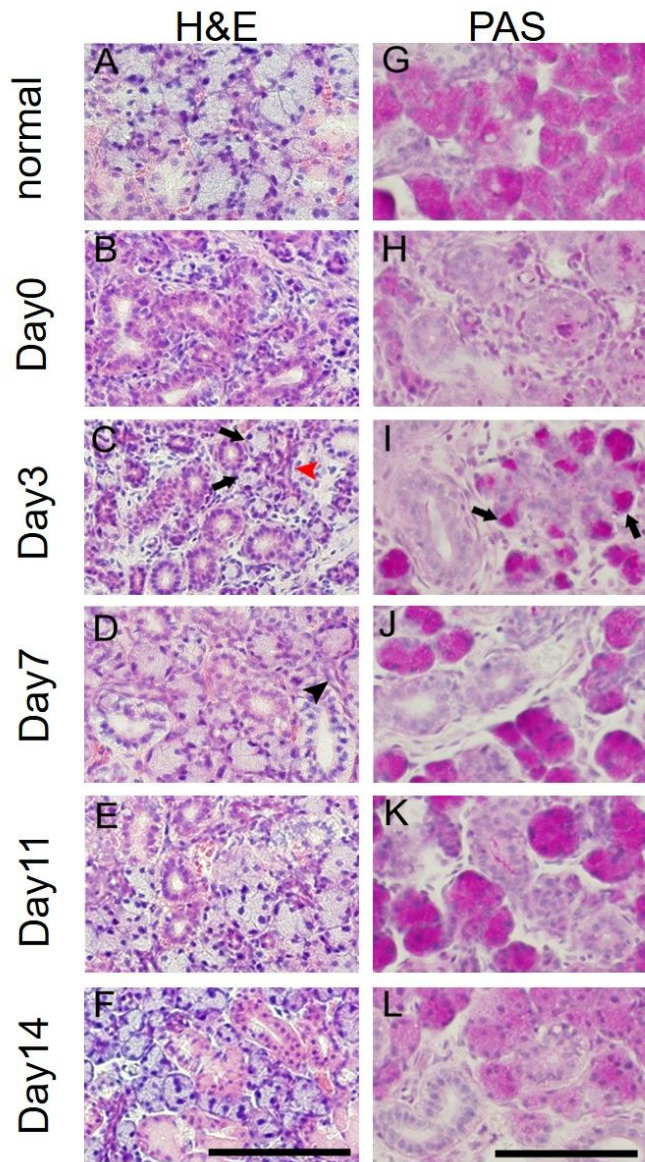
D14 では正常顎下腺と同様な分布を認めた。

Wnt-1，2，3，10 の局在

wnt-1，-2，-10 は -catenin と同様で正常顎下腺の腺房細胞において細胞間で局在が認められた。再生過程においては，D0～D11 にて導管様構造物の管腔側・細胞間に局在を認めた。

wnt-3 は正常顎下腺および D14 の腺房細胞周囲と介在部導管の周囲，また再生過程における導管様構造物の周囲で陽性反応がみられた。

wnt-4，-5 については一定のデータが得られなかった。



- 図中の黒矢印は再生腺房細胞を，赤矢頭は導管様構造物を，黒矢頭は介在部導管を示す．
- Scale bar : 100 μ m

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiroshi Shiratsuchi, Reiko Sekino, Takaaki Tamagawa, Tadayoshi Kaneko	4. 巻 vol.8
2. 論文標題 Herbal Medicine Treatment for Xerostomia in Elderly Patients and Salivary Gland Regeneration Research	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Aging Science	6. 最初と最後の頁 1-2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.35248/2329-8847.20.08.241.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------