

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593011

研究課題名(和文)顎下腺再生過程における基礎的研究

研究課題名(英文)The fundamental Study about regeneration of submandibular gland

研究代表者

清水 治 (SHIMIZU, Osamu)

日本大学・歯学部・講師

研究者番号：40260971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ラット顎下腺再生過程における細胞骨格の変化をに関わる因子が何であることを検討し、細胞外基質からのシグナルを受ける役割を持つintegrinの同定やそれによる細胞の形に変化を与える細胞骨格が唾液腺再生に影響を与えていることを明らかにした。また、ラット生体外での唾液腺再生細胞の培養が可能になり、今後、その実験系を使用することによって色々なタンパク質の役割解析が可能となってくると思われる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to assess alteration in the cytoskeleton and localization of integrin during regeneration of the rat submandibular gland. The findings suggested that alpha3- and alpha6beta1-integrin regulate the regeneration and alteration in cytoskeleton effect regeneration of acinar cell from the duct like structure. Additionally, in vitro investigation of the salivary regeneration was available by this study. We can evaluate the roles of many proteins during regeneration of submandibular gland.

研究分野：唾液腺の再生

キーワード：唾液腺再生 顎下腺 細胞骨格 integrin duct like structure in vitro

1. 研究開始当初の背景

(1) 唾液腺再生医療に寄与する基礎的研究の一つとして唾液腺の主導管を結紮して得られる萎縮・再生モデルが有用である。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。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。

(2) 我々はこれまでラット顎下腺再生過程における細胞外基質の変化を解析し (Ueda K et al. 2009, Int J Oral Maxillofac Surg 38, 79-84)、細胞外基質がdrasticな変化を起こしていることを報告した。一方、細胞外基質分子の差異情報はintegrinを介して細胞内にシグナルが伝達される。したがって細胞外基質の変化が細胞内骨格形成に何らかの影響を与えている可能性が考えられる。一方FGFをはじめとする成長因子は発生過程において重要な役割を果たしている。FGF10のnull mouseでは発生初期段階においてprimaryな役割を果し、FGF8の解析ではbranching morphogenesisなどの後期段階に関わっているとの報告がある。そこで細胞骨格に関するものとFGFなどの成長因子に関するものとの2本立てで本実験計画を立案した。

2. 研究の目的

ラット顎下腺結紮モデルを用いて、顎下腺再生過程において(1)細胞骨格がどのように変化しているか、(2)FGF、FGFR、wnt等のタンパク質の局在がどこに局在しているかを解析し、萎縮させた顎下腺から得られた細胞懸濁液を培養し、in vitroでのタンパク質やinhibitorの添加実験を行うことで、その機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物

8週齢のWister系ラットの顎下腺主導管をチタンmini clipで結紮した。結紮7日後に結紮を解除。再生0、1、3、7、11、14、21日目に顎下腺を摘出した後、パラフィン切片と凍結切片とした。これらを組織化学および免疫組織化学的検索に供した。なお、コントロールとしては結紮していない顎下腺を用いた。

(2) 組織化学

HE, periodic acid-schiff (PAS), alcian blue (AB)染色を行い、萎縮・再生過程が順調に進行しているかを確認した。

(3) 細胞骨格

細胞骨格の検索にはTRITC-標識のphalloidinを用いる。凍結切片の場合は0.1%のTritonX100を含む冷アセトンにて10分間固定した後、十分に乾燥させた。その後、phalloidinを30分間反応させた。パラフィン切片の場合は、脱パラ後、0.1%のTritonX100を含むphalloidinを30分間反応させた。

(4) integrinの局在
alpha3beta1-, alpha6beta1-, alpha5beta1-integrinを認識する抗体を用いて、それらの局在を免疫組織化学的に解析した。凍結切片の場合は冷アセトンにて10分間固定した後、十分に乾燥させた。1%BSA-PBSで非特異的反応をブロックしたのち、希釈した1次抗体を4℃でovernightした後PBSで洗浄。その後、室温でFITC-あるいはTRITC-標識、場合によってはHRP-標識の2次抗体を60分間反応させた。

(5) 成長因子の局在

FGFR, Wntを認識する抗体を用いて、それらの局在を免疫組織化学的に解析した。免疫染色の方法は上記integrinと同様の方法で行う。

(6) 萎縮させた顎下腺から細胞懸濁液を作製。萎縮させたラット顎下腺(5-6ラット)を径2mm大になるまで細切。細切した組織はコラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ処理した後、ディスパーゼでさらに分散し細胞懸濁液を調整した。96U底プレートでスフェロイド培養をおこない添加実験に供した。

(7) スフェロイド培養における添加実験。
スフェロイド培養にcytochalasin D, FGF, FGFR inhibitor SU5402, PI3K inhibitor LY294002等を添加し腺房細胞の形成過程をAQP-5で免疫染色した。

4. 研究成果

(1) ラット顎下腺再生過程における細胞骨格形成の変化をFITCあるいはTRITC標識のphalloidinを用いて検索した。また、細胞外基質のレセプターであり細胞骨格を調整しているintegrinに関してもその局在を詳細に解析した。その結果、再生3日目から7日目にかけてduct like structure(DLS)のapical siteとその細胞内に線状のactin陽性反応が認められた。また、正常顎下腺とDay14のintercalated duct(ICD)に線状のactin陽性反応が認められた。一方、integrinに関しては再生過程である3日目から7日目にかけてalpha3-integrinはDLSを構成する細胞のapical surfaceとlateral surfaceに認められた。また、再生3日目において未熟な腺房細胞に認められたdiffuseなalpha6beta1-integrinの局在は、alpha3-integrin陽性細胞の遠位に存在していた。さらにalpha6beta1-integrinの腺房

細胞における局在は、腺房細胞の分化が進むにつれて、細胞質から基底側へと変化した。以上のことより顎下腺再生過程における DLS が ICD と類似した性格を有し、この DLS から腺房細胞への分化に alpha3-integrin, alpha6beta1-integrin および F-actin の局在の変化が関与していると考えられた。

(2) 顎下腺再生過程における FGF と FGFR の局在について検討した。検索した抗体は FGF-1~-10 と FGFR-1~-4 である。FGF に関しては FGF-2、-7、-8、-10 に関して陽性反応を認めた。それ以外の抗体に関して陽性反応は認めなかった。先ず、FGF-2 は正常顎下腺の介在部導管、線条部導管および血管に陽性反応を認めた。この陽性パターンはこれまでの報告と同様であった。再生過程にある DLS と newly formed acinar cells(NFAC)に陽性反応を認めた。FGF-7 は、NFAC に認められ、成熟過程にある腺房にその局在を認めた。FGF-8 は正常および D14 にはその陽性反応は認められず、再生過程にある DLS にのみ陽性反応が認められた。FGF-10 に関しては、正常および D14 の介在部導管および再生 3 日目の NFAC から再生・成熟過程にある腺房細胞の lateral site に局在していた。Receptor に関しては、FGFR-1 が正常と D14 の intercalated duct(ICD)と DLS と NFAC に陽性反応を認めた。FGFR2 は正常と D14 の ICD に僅かに陽性反応を認めたのみであった。FGFR3 は正常と D14 の腺房細胞と DLS に陽性反応を強く認めた。FGFR4 は再生過程の DLS と正常および D14 の ICD に陽性反応を認めた。以上の所見から、顎下腺再生過程においては FGF-2、-7、-8、-10 が NFAC、DLS で重要な役割を果たしており、その働きは FGFR1、FGFR4 によって細胞内に伝達されていることが示唆された。

(3) また wnt ファミリーに関してもその局在を解析した。wnt は細胞膜に存在する Frizzled(Fz)に結合し、beta-catenin 経路によって核内に beta-catenin が送られ種々の遺伝子発現が誘導され発生の形態形成や幹細胞の維持等に関与している。本研究では wnt-1、-2、-3、-10 および beta-catenin を認識する抗体を用い、さらに唾液腺幹細胞のマーカーと考えられている c-kit、Sca1、さらに筋上皮細胞のマーカーである alpha-SMA の抗体も用いた。その結果、beta-catenin は正常および D14 の ICD と再生過程にある DLS の核内に陽性反応を認め、wnt-1、-2、-10 が beta-catenin と同じ細胞に陽性反応を認めた。また、唾液腺幹細胞のマーカーである c-kit、Sca-1 は beta-catenin 核陽性細胞と同じ細胞に陽性反応を認めたことから唾液腺幹細胞は wnt-1、-2、-10 のシグナルを受け beta-catenin 経路によって維持調整されていることが示唆された。また、wnt-3 は正常顎下腺および D14 の腺房細胞周囲と ICD の

周囲、また発生過程における DLS の周囲に陽性反応を認めた。これら周囲の陽性細胞を同定するため筋上皮細胞のマーカーである alpha-SMA で染色したところ、wnt-3 は筋上皮細胞に特異的に発現していることが示唆された。このことは、顎下腺再生過程における筋上皮細胞の何らかの変化に wnt-3 が関与していることが示唆された。

(4) 今回確立を目指した in vitro 実験系において、萎縮させた顎下腺から得られた細胞懸濁液からスフェロイド培養し、得られた培養 3 日目の集合塊を HE および PAS 染色し、さらに alpha-SMA、CK-18 にて免疫染色した。HE 染色では、U 底に沿って一層細胞が並んであり、その内側に上皮様の細胞塊が認められた。また中央にはやや紡錘形の alpha-SMA 陽性細胞が認められた。また、Sca-1、C-kit は集合塊周囲の一層の細胞に認められたが、CK-18 の陽性反応は認められなかった。また in vitro 添加実験では PI3K の抑制で細胞塊の増大が観察された。今後の検討課題である。

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 2 件)

Shimizu O, Shiratsuchi H, Ueda K, Oka S, Yonehara Y, Alteration of the cytoskeleton and localization of the alpha6 beta1-integrin and alpha3 integrin during regeneration of the submandibular gland. Arch Oral Biol, 査読有, 57, 2012, 1127-1132 DOI:10.1016/j.archoralbio.2012.02.018.

Shiratsuchi H, Shimizu O, Saito T, Mashimo T, Yonehara Y, Immunohistochemical study of small Rho GTPases and beta-catenin during regeneration of the rat submandibular gland. J Mol Hist, 査読有, 43, 2012, 751-759 DOI:10.1007/s10735-012-9437-8.

[学会発表](計 4 件)

安光智洋、清水 治、白土博司、玉川崇皓、米原啓之、ラット顎下腺再生過程における wnt/beta-catenin タンパク質の局在、第 14 回日本再生医療学会、2015 年 3 月 20 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Shimizu O, Shiratsuchi H, Yasumitsu T, Mashimo T, Watanabe T, Saito T, Yonehara Y, Immunolocalization of FGFs and FGFRs during rat submandibular gland regeneration, 93rd International association for Dental Research, 2015, March, 12, Boston MA USA.

白土博司、清水 治、安光智洋、齊藤忠仁、真下貴之、米原啓之、ラット顎下腺再生過程における FGF および FGFR ファミリータンパク質の局在、第 58 回日本口腔外科学会総会・

学術大会、2013年10月12日、福岡国際会議場（福岡県福岡市）

清水 治、白土博司、真下貴之、斉藤忠仁、米原啓之、ラット顎下腺再生過程おける基礎的研究、第22回日本歯科医学会総会、2012年11月9日、インテックス大阪（大阪府大阪市）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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

岡 俊一 (OKA, Shunichi)
日本大学・歯学部・准教授
研究者番号：20256879

(3) 連携研究者

白土 博司 (SHIRATSUCHI, Hiroshi)
日本大学・歯学部・専修医
研究者番号：50710844