

## 論文の内容の要旨

氏名：長 井 幸 一

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：唾液腺の腺房再生過程における EGF family の発現と役割

外分泌腺の一つである唾液腺は消化酵素の分泌、口腔内環境の維持など多様な機能を担っている。自己免疫疾患や癌の放射線治療、また唾石や加齢などによる唾液腺の消失や機能低下は唾液分泌量を減少させ、口腔の感染防御や生理機能の維持に重大な障害を引き起こす。したがって唾液腺の再生は QOL 向上のためにも重要である。これまでの唾液腺の再生研究で、ラットの唾液腺排泄主導管を実験的に結紮すると、唾液の排泄障害により唾液腺実質の萎縮が引き起こされることが確認されている。さらに結紮を解除することによって、唾液腺組織が正常唾液腺と同様の組織像を呈するまで回復することが報告された。この唾液腺主導管結紮と解除のモデルは、唾液腺の組織再生の過程を解明するために有用であると考えられるが、腺房細胞の再生メカニズムの詳細は未だ明らかにされていない。

そこで、著者らの研究室で新たに開発した、血管クリップを用いる唾液腺再生マウスモデルを用いて腺房細胞を観察し、再生に関する直接的な機能的分子を追求することとした。

実験には、C57BL マウス雌 65 匹を本学動物飼育室にて 2 週間予備飼育させた後に実験に供した。Pentobarbital sodium 腹腔内麻酔下に左顎下部に切開を加え、顎下腺主導管の基部にクリップを装着した。1 週間後にマウスを再び麻酔し、クリップの解除を行った。その後、マウスは 0, 1, 3, 7, および 14 日後にそれぞれ顎下腺を摘出 (n=8) して epidermal growth factor (EGF) family および EGF receptor (EGFR) の発現動態を経時的に免疫組織化学, Western blot および real time PCR で観察した。

また、唾液腺から導管上皮細胞を分離培養し、EGF family の一つである epiregulin 添加による細胞増殖能および EGF family の autocrine および juxtacrine 作用についても検索した。さらに再生唾液腺の機能を検討する為に、細胞の水分分泌機能に関与する aquaporin5 の発現についても検索した。

マウス顎下腺の主導管を 1 週間結紮することで、これまでのラットでの報告と同様に顎下腺の萎縮が起こりその重量が 40% 程度減少することを確認した。また、結紮解除によって顎下腺の重量は処置前の約 80% まで回復することを明らかにした。この変化を組織学的に観察すると、小葉内の腺房細胞はほぼ消失しており、小葉内導管は立方型細胞からなる tubular structure に置き換わっていた。結紮解除で重量の回復した唾液腺では、腺房細胞の再生が起こり正常唾液腺の小葉構造に回復していた。分裂期の細胞を幅広く検出する PCNA の免疫染色で、tubular structure を構成する細胞が数多く標識されることから、この細胞がその後再生する腺房細胞の前駆細胞であると考えた。事実、PCNA で標識される分裂期の細胞数は結紮解除後 3 日まで有意に増加し、その後大きく減少していた。また、同時期に tubular structure で EGFR の発現が上昇することを確認した。このことから、結紮解除 0 日から 3 日目までが腺房再生に重要な期間であり、この時期に発現・作用する因子が再生に

関わる直接的な機能的分子と考えられた。著者らはすでに、この唾液腺腺房細胞再生モデルを用いて、再生過程で発現する遺伝子変化を microarray 解析により網羅的に捉えており、萎縮顎下腺で上昇を示した遺伝子を 1894 個、減少を示した遺伝子を 977 個検出した。その中で再生期に EGFR 発現増加がおこることを確認し、本実験においては免疫組織化学によって発現増加を検出した。さらに、この EGFR にリガンドが結合して活性化が起きていることを確認するため、EGFR のリン酸化の状態を免疫組織化学および Western blot で確認したところ、結紮解除後 0 日および 1 日で高度なリン酸化が起こり、その後は急速に減少することを見いだした。これらの結果、腺房細胞再生のシグナル伝達が結紮解除後の極めて短期間にかつ限定的に起こることを明らかにした。次に EGFR のリガンドとなる EGF family について遺伝子レベルの発現を検討した。その結果、興味あることに EGF は結紮解除後 0 日および 1 日では発現が見られず、発現の増加は結紮解除 3 日以降であり、腺房細胞の再生開始に直接関与する増殖因子とは考えにくい結果であった。一方、EGFR のリン酸化に対応して発現増加するリガンドは、EGF family のうち epiregulin であることを見いだした。epiregulin の発現増加と EGF の発現動態は、Western blot でも確認された。

ついで、epiregulin の唾液腺上皮細胞への増殖効果を検討するために、主導管を結紮して萎縮した顎下腺から酵素処理によって上皮細胞を分離した。この細胞の EGFR 発現を確認したのち epiregulin を作用させたところ、epiregulin の濃度依存的に増殖を示した。この結果は、唾液腺再生マウスモデルにおける腺房細胞の再生が *In vitro* で再現ができたものと考えられた。さらに、epiregulin を作用させた顎下腺上皮細胞は、betacellulin 以外の EGF family 遺伝子の発現を増加させたことから、epiregulin は autocrine および juxtacrine 作用を持つと考えられた。前述の実験で唾液腺腺房再生モデルにおいて、結紮解除で唾液腺の形態が回復することは示したが、唾液腺機能の回復がみられるかは明らかでなかった。そこで、唾液腺機能の一つとして腺房細胞の水分分泌に関わる aquaporin 5 の発現を観察したところ、結紮による萎縮唾液腺では aquaporin 5 の発現の著しい低下を認めたが、腺房細胞の再生と共に発現が増加したことから、唾液腺の分泌機能も回復するものと考えられた。

以上、本研究の結果、マウス顎下腺腺房細胞再生メカニズムにおける、EGF family の epiregulin は、EGFR を介して再生に関与する直接的な作用分子の一つであることを初めて明らかにした。