

唾液腺の腺房再生過程における EGF family の発現と役割

長井 幸一

日本大学歯学部病理学講座

(指導 小宮山一雄 教授, 岩瀬孝志 講師)

概 要

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ている。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、マウス顎下腺主導管をクリップで結紮し、その後クリップを除去し結紮を解除するモデルを用いて腺房細胞再生を観察し、再生に関わ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、クリップの撤去を行った。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 EGFReceptor (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。また、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為に、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、顎下腺再生モデルにおける腺房細胞の再生が *in vitro* で再現が出来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。

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泌に関わる aquaporin5 の発現を観察したところ、結紮による萎縮唾液腺では aquaporin5 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、顎下腺腺房細胞再生メカニズムにおける、EGF family の epiregulin の機能は EGFR を介したもので、epiregulin が唾液腺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。

結 論

マウス顎下腺主導管結紮解除による唾液腺再生モデルを用いて、腺房細胞の再生過程を観察し以下の結論を得た。

1. 唾液腺再生は顎下腺主導管の結紮解除直後から始まることを示した。
2. 腺房細胞の再生は導管上皮由来の tubular structure が前駆細胞であることを明らかにした。
3. 腺房細胞の再生には EGFR とそのリガンドである増殖因子の関与が必要である事を示した。
4. 腺房細胞再生の初期に有意に増加する増殖因子として epiregulin を検出した。
5. 再生腺房細胞が機能的にも回復していることを、aquaporin5 の発現により確認した。

本研究により著者は唾液腺再生過程で作用する増殖因子として epiregulin が重要であることを初めて明らかにし、続いて起こる EGFR の活性化が腺房細胞の再生を誘導することを示した。

なお、本論文は原著論文 Nagai K et al., Epiregulin is critical for the acinar cell regeneration of the submandibular gland in a mouse duct ligation model, J Oral Pathol Med. 2014 May;43(5):378-387. を基幹論文とし、これに aquaporin5 の成績を新たな実験データとして加えることによって総括したものである。

緒 言

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¹⁻⁶⁾。さらに結紮を解除することにより、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ている^{3-5, 7)}。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。近年、唾液腺主導管結紮後の萎縮唾液腺から分離された前駆細胞は、膵臓細胞や肝細胞に分化する能力を有することが報告された⁸⁾。このことから、主導管の結紮により唾液腺萎縮の過程で生じた前駆細胞は、導管結紮解除後におこる唾液腺の再生に中心的に関与することが示唆される。

Epithelial growth factor (EGF) は、Cohen⁹⁾ が 1962 年にはじめて唾液腺から発見し、53 個のアミノ酸からなる 1 本鎖の分子で、唾液腺導管上皮の convoluted duct cell から産生されることが免疫組織学的に確認されている¹⁰⁾。その後に発見された同様な働きをする分子と共に EGF ファミリーを形成している。EGF ファミリーは生体組織の器官発生、形態形成組織再生と修復などには種々の増殖因子として働いていることが知られている。EGF ファミリーには EGF のほか、transforming growth factor- α (TGF- α)、heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF)、amphiregulin, betacellulin, epiregulin, epigen および neuregulin などの分子がある。これらの増殖因子は、チロシンキナーゼ型の EGF 受容体にリガンドとして結合し細胞を活性化する。EGF ファミリー分子は、はじめから分泌タンパクとして合成されるのではなく、膜に結合した前駆体タンパクとして発現し、細胞膜表面でプロテアーゼによって切断され分泌型の増殖因子となる特徴を有している。EGF はオスのマウス唾液腺で大量に産生されており、唾液腺を摘出すると血清に含まれる EGF 量は著しく低下する。このことから唾液腺は EGF の主要な産生臓器であると考えられている¹⁰⁾。

これらの増殖因子が結合する受容体は、膜貫通型受容体である epidermal growth factor receptor (EGFR/erbB1), erbB2, erbB3, erbB4 の 4 種が存在しており、それぞれホモダイマーあるいはヘテロダイマーを形成している¹¹⁾。生体内の様々な臓器において発現し、器官の発生、創傷治癒、上皮の再生に重要な役割を果たしている。EGF フ

ファミリー分子がレセプターに結合すると、細胞内ドメインのチロシンリン酸化が開始され、シグナルカスケードの mitogen-activated protein kinase (MAPK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K), signal transducers and activators of transcription (STAT) pathways などのシグナル経路が活性化する¹²⁻¹⁶⁾。その結果、細胞増殖、走化性、形態形成、細胞分化および抗アポトーシスなどの細胞内シグナル伝達物質を介して誘導することが知られている^{11, 17)}。さらに、多くの癌細胞において、EGFR の過剰発現が認められ、EGFR の恒常的な自己リン酸化により癌細胞が自律性の増殖を引き起こし、癌の増殖・進展に関わっているとの報告がされている¹⁸⁾。

EGFR はさまざまな臓器および組織において発現がみられ、臓器や組織の発生、炎症、再生や修復に関与している。唾液腺において EGFR の存在は発生初期から確認されており、導管細胞および小葉間の間葉細胞に発現し、唾液腺の形態形成に関与するとの報告があり^{16, 19)}、また、萎縮顎下腺の再生過程に EGFR の活性化がおこるとの報告¹²⁾もあるが、EGFR に結合する各リガンド間での顎下腺萎縮および再生時の役割、またその作用機序は不明な点が多い。著者は、実験的にマウス顎下腺排泄導管を結紮し顎下腺萎縮を起こし、萎縮顎下腺に発現する遺伝子を網羅的に検討するため microarray 解析を行った。萎縮顎下腺において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、その結果、発現上昇をみとめた EGF 関連遺伝子の epiregulin を萎縮顎下腺で起こる導管細胞の増殖を誘導する因子の一つと考えた。

EGF ligand family の一つである epiregulin は NIH3T3/clone T7 の conditioned medium 中から同定された分子で、正常の線維芽細胞では発現がほとんどみられない。精製されたマウス epiregulin は 46 のアミノ酸残基を持ち、他の EGF ligand family 分子とは 20-50%のアミノ酸配列の相同性がある。扁平上皮癌 A431 細胞株の EGFR への結合能は、EGF や TGF- α と比べて弱い。しかし、細胞増殖活性は EGF や TGF- α よりも高いことが報告されている²⁰⁾。Epiregulin は成人生体内の各組織において正常ではほとんどその発現はみられないが、胎盤と末梢血中の白血球では高発現が検出されている²¹⁾。さらに epiregulin は Hela 細胞を始め大腸癌、腎臓癌、肺癌、扁平上皮癌など多くの腫瘍細胞株において高発現が報告されている²²⁾。EGF の産生臓器として知られる唾液腺における epiregulin の検討はなく、わずかに唾液腺腫瘍の adenoid cystic carcinoma において発現がみられたとする報告があるのみである²³⁾。本研究では、マウス顎下腺の主導管結紮と解除による唾液腺再生モデルを用い、再生過程での EGFR および EGF ligand family の動態について観察し、その作用について検討を行った。

材料と方法

C57BL マウス雌（6 週齢，日本クレア）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。本研究にはマウス 65 匹を使用し、その平均体重は 19.8 ± 0.9 g であった。なおすべての実験は日本大学動物実験規定にしたがい、日本大学歯学部動物実験委員会の承認（許可番号 AP09D038）を受けておこなった。

マウス顎下腺の結紮および組織標本の作製

実験は Pentobarbital sodium（ソムノペンチル，共立製薬株式会社）30 ml/kg をマウス腹腔内に投与し、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（Titanium Aneurysm Clip，瑞穂医科工業株式会社）を装着した（第 1 図）。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。マウスは 0，1，3，7 および 14 日後にそれぞれ顎下腺を切除摘出（n=8）し、以降の実験に供した。摘出した顎下腺は 10% 中性緩衝ホルマリン固定液で 1 晩浸漬固定後，通法に従いパラフィン包埋を行い，厚さ $4 \mu\text{m}$ の薄切標本を作製した。標本は hematoxylin-eosin 染色後の組織学的観察，および EGFR 発現の免疫組織化学に用いた。

免疫染色

免疫染色は、薄切標本のパラフィンを除去後に 0.3% 過酸化水素-メタノール溶液で内因性のペルオキシダーゼをブロックした。ついで抗原賦活化は，10 mM クエン酸緩衝液（pH6.0）に浸漬し 98°C で 20 分間加熱後，室温まで除冷した。各至適濃度に調整された 1 次抗体を 4°C で 1 晩反応をおこなった。その後，2 次抗体の反応および発色を，Histofine simple stain kit（Nichirei Bioscience）および Histofine stain kit（Nichirei Bioscience）を用いて，それぞれ用法に従って行った。ついで，各組織標本を hematoxylin 液にて核染色を施した後，顕微鏡下に観察した。免疫染色のコントロールには各染色において 1 次抗体を除いたものを使用した。本研究で使用した 1 次抗体および免疫染色キットを表 1 に示す。

顎下腺導管上皮細胞の分離および培養

摘出した顎下腺は，直ちに外科用メスにて細切したのち，以下の酵素処理を行った。はじめに，組織細片を Dullbeco's Modified Eagle Medium Mixture F-12（DMEM/F12，Gibco）に，1 mg/ml の Collagenase A（Roche Diagnostic）と 0.6 mg/ml の hyaluronidase（AbD Serotec）を加えた溶液中で，37°C で 40 分間攪拌した。次いで，200×g で 3 分間遠心し，上清を除き，1 mg/ml の dispase（Gibco）を加えた DMEM/F12 培養液

中で再び 37°Cで 40 分間攪拌した。遠心により細胞を回収し、William's E medium (Gibco) で 3 回洗浄を行った。回収した細胞は、10%ウシ胎児血清 (FBS, Cansera International) および 1%ペニシリン・ストレプトマイシン液 (Gibco), 1 μ M dexamethasone (Sigma Aldrich), 1 ng/ml insulin like growth factor (Sigma Aldrich) を加えて、直径 35 mm collagen-coated culture dish (Iwaki サイテック) へ播種して、primary culture を 5% CO₂, 37°Cの条件下に培養を行った。培養液は 2 日ごとに交換し、細胞が 70-90%の confluent になった時点で継代して継代 2~4 代目の細胞を培養唾液腺細胞として以下の実験に供した。

培養唾液腺細胞の免疫染色

細胞を collagen-coated chamber slide (Iwaki サイテック) に播種し、1 晩固着させたのち、4%パラホルムアルデヒド固定液で固定後、hematoxylin-eosin 染色を施し形態の観察を行った。さらに細胞は、CK18 抗体 (LifeSpan BioSciences) および EGFR 抗体 (Abcam) で免疫染色を行った。それぞれ至適濃度の 1 次抗体 (1:200) を 4°Cで 1 晩反応させ、phosphate buffered saline (PBS) で洗浄後、二次抗体としてビオチン標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (BD pharmingen) を室温で 1 時間反応させた。次いで、ストレプトアビジン-FITC (DAKO) を室温で 1 時間反応させ、4',6-diamidaine-2'-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Roche) を用いて核染色を行い、蛍光顕微鏡 (BX60, OLYMPAS) 下に観察し、撮影を行った。

培養唾液腺細胞における EGFR および EGF family mRNA の検出

細胞から、total RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて抽出し、NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Nanodrop Technologies) により吸光度 (A260 および A280) を測定して、RNA の濃度および純度を確認した。次いで、採取した RNA 1 μ g を template とし、cDNA の作製を Omniscript RT kit (Qiagen) を用いて行った。PCR は得られた cDNA を template に EGF, TGF- α , HB-EGF, amphiregulin, betacellulin, epiregulin, epigen の primer (表 2) と EmeraldAmp PCR Master Mix (Takara) を用いて、Thermal cycler (GeneAmp PCR system 9700 Applied Biosystems) で行った。反応は 94°Cで 30 秒間の denaturation, 60°Cで 30 秒間の annealing, 72°Cで 30 秒間の extension を 1 サイクルとし、35 サイクル繰り返した。PCR 合成産物は 2%アガロースゲル電気泳動により分離し、エチジウムブロマイドで染色後に紫外線下で観察を行った。

培養唾液腺細胞の増殖効果

細胞 1×10^4 個を collagen-coated 96 well plate (Iwaki サイテック) に播種し、24 時間血清非添加で培養し固着させた。次いで培養液に recombinant mouse epiregulin (R&D System) を 0-20 ng/ml の濃度で添加して 48 時間培養した。細胞増殖効果を Cell counting Kit-8 (同仁化学) を用いた WST-8 reduction assay によって行った。また、増殖抑制実験として、上記細胞培養液に erb-B1 特異的 tyrosine kinase inhibitor である Tyrostatin AG 1478 (Merk) を 200 nM の濃度で加え同様に培養を行なった後に測定した。

PCNA 陽性細胞

培養唾液腺細胞を collagen-coated chamber slide (Iwaki サイテック) に播種し、1 晩固着させたのち、2%中性緩衝ホルマリン固定液で固定した。PBS で洗浄した後、200 倍希釈の PCNA 抗体 (DAKO) を用いて 4°C で 1 晩反応させ、免疫染色を行った。2 次抗体として HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (DAKO) を室温で 1 時間反応させ、3,3'-diaminobenzidine (DAB) により発色後、核染色を hematoxylin で行い観察した。陽性細胞を光学顕微鏡下で観察し、6 視野に分け合計 0.96 mm^2 当たりの全細胞数および PCNA 陽性細胞数を計測した。得られた結果より全細胞数における陽性細胞の割合を%で表した。

Western blot

培養唾液腺細胞を protease inhibitor (Sigma) を加えた RIPA buffer (Thermo Scientific Inc) 内で 1 ml のシリンジを用いてホモジェナイズし、14,000 rpm, 4°C で 30 分間遠心した後、上清を回収した。溶液のタンパク濃度を Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories) で測定した。次にサンプルを 14-6%の polyacrylamide gel で SDS-PAGE を行った後、polyvinylidene difluoride membrane (Millipore Corp) に転写した。メンブレンを 5%skim milk 溶液で 1 時間ブロックキングした後、400 倍希釈の抗 EGFR 抗体 (Abcam) または 1000 倍希釈の抗 phosphorylated EGFR 抗体 (Abcam) と 4°C , overnight で反応を行った。次にメンブレン TBS-Tween 20 で十分に洗浄後、10000 倍希釈のペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (GE Healthcare) を 2 次抗体として室温で 1 時間反応させた。十分に洗浄後、免疫複合体を ECL detection system (GE Healthcare) を用いて X 線フィルム (Kodak) で検出した。

Real-time PCR

顎下腺細胞の培養液に epiregulin 10 ng/ml を添加して前述の方法で 6 時間培養後、total RNA の回収および cDNA の作製を行った。EGFR および EGF ligand family の遺伝

子の増幅に用いた primer は前述と同様なものを使用した(表 2)。遺伝子発現の定量を SYBER Premix Ex Taq (Perfect Real Time, TAKARA) 用いて, Smart Cyclor II System (TAKARA)で行った。反応はサンプルに SYBER ExTaq を加え 95°C 10 秒間で直鎖化した後, denaturation を 95 度 15 秒間, annealing/extension を 60°C 30 秒間の 2 step PCR を 45 サイクル行った。各遺伝子発現量は, 内因性コントロールである peptidylprolyl isomerase A (PPIA) のデータで標準化した。なお, それぞれの培養条件で PPIA の遺伝子発現量は常に一定であった。

統計処理

得られたデータを平均±標準偏差で表し, Mann-Whitney U test を用い有意性の検定を行った。なお, 有意水準は $p < 0.05$ とした。

結果

顎下腺重量の変化

顎下腺はクリップによる結紮後 1 週間で腺体が萎縮し, 重量が 38%程度まで減少したが, 結紮解除後は徐々に増加して 14 日後には元の重量の約 77%まで回復した(第 2 図 A)。

顎下腺の組織学的変化

唾液腺主導管の結紮 7 日後では, 萎縮が起こり小葉内の腺房細胞はすべて消失した。小葉間導管は残存していたが, 小葉内導管は消失し腺房の前駆細胞と思われる立方型細胞からなる tubular structure に置き換わっていた。小葉内には線維性結合組織が増生し tubular structure の間を埋めていた。結紮解除 3 日後には, tubular structure 周囲に未熟な腺房細胞が出現しはじめ, 結紮解除 7 日後には成熟した腺房細胞が出現した。結紮解除 14 日後では, tubular structure は消失し, 成熟した腺房細胞が多くを占めた。このとき腺房周囲の結合組織は減少していた(第 2 図 B)。

免疫組織化学では, 正常唾液腺の排泄導管および介在部導管は CK18 タンパク強陽性を示すが, 顆粒細胞は弱陽性を示した。結紮 7 日後および解除 3 日後では CK18 タンパクは弱陽性であったが, 解除 14 日後では正常唾液腺とほぼ同様な染色強度を示した(第 2C)。

PCNA 標識細胞の検出

細胞分裂期の核を標識する PCNA 染色は、正常唾液腺では陽性細胞が極めて少数で、導管上皮細胞にみられたのみであった。解除後の陽性細胞は主として tubular structure を構成する立方型上皮細胞である。解除 14 日後では、正常唾液腺と同様、導管上皮細胞に陽性細胞をみた(第 2 図 D)。PCNA 陽性細胞数は結紮解除 0 日から増加し、解除 3 日で最も高い値を示したが、解除 7 日後では有意に減少していた(第 3 図)。

EGFR のリン酸化

EGFR 発現の動態を免疫組織化学で検索したところ、正常唾液腺では導管細胞に恒常的に発現していた。導管結紮後では、EGFR は残存導管細胞のほか導管周囲の結合織内にも EGFR を発現する細胞を認めた(第 4 図 A)。

EGFR のリン酸化を Western blot で検討したところ、結紮解除後 0 日から 3 日後で認められ、解除 1 日後に最も高いリン酸化を示した(第 4 図 B)。さらに EGFR のリン酸化を免疫組織化学で観察したところ、同様に解除 0 から 3 日後では高い染色強度を示し、解除 7 日および 14 日後においても EGFR のリン酸化陽性細胞を検出した。しかし、正常唾液腺では EGFR のリン酸化は検出されなかった(第 4 図 A)。

EGF リガンドファミリーの遺伝子発現

6 種類の EGF リガンドの遺伝子発現を RT-PCR 法で観察し、HB-EGF が結紮解除 1 日でコントロールに比べ高発現を示した。Epiregulin は解除後 3 日まで高発現を示し、その後減少した。一方、EGF は解除 0 日では発現が減少しており、解除 5 日後になりコントロールとほぼ同様な発現レベルとなった(第 5 図 A)。

他の EGF ligand family 分子では、TGF- α が解除 1 日後にわずかに上昇したが、betacellulin と amphiregulin の発現はコントロールと比べ変化がなかった(データ未掲載)。

EGF, Epiregulin および HB-EGF のタンパク発現

遺伝子発現で変化の見られた 3 種類のリガンドについて Western blot でタンパク発現の変化を観察した。EGF は導管結紮により発現が消失し、結紮解除後 0 および 1 日では発現せず、3 日後でわずかに発現がみられ、7 日あるいは 14 日後には正常唾液腺と同程度の発現が得られた。Eiregulin の発現は結紮により消失はみられず、逆に解除後 1 日から 3 日後までは発現量が有意に増加し、その後は徐々に低下した。HB-EGF は本実験期間を通して発現量の変化は見られなかった(第 5 図 B)。

Epiregulin の増殖効果

結紮後萎縮した唾液腺から分離した上皮細胞の形態を hematoxylin-eosin 染色で、また唾液腺上皮細胞由来である事を CK18 および EGFR の免疫染色で確認した。(第 6 図 A)。分離上皮細胞は epiregulin 添加により濃度依存的に増殖した (第 6 図 B)。この分離上皮細胞の EGF family の遺伝子発現を検索したところ、epiregulin, HB-EGF, betacellulin, TGF- α , amphiregulin の弱い発現を認めたが、EGF の発現はみられなかった (第 7 図 A)。次に分離上皮細胞に epiregulin (10 ng/ml) を添加して EGF ligand family の遺伝子発現を検索したところ、betacellulin を除く 4 つの EGFR ligand family の有意な発現増加を認めた (第 7 図 B)。

再生過程における唾液腺小葉内間質の変化

Azan - Mallory 染色により間質の変化を観察したところ、正常顎下腺では小葉間に薄い被膜状の濃青色に染色された膠原線維を認めた。腺房細胞の細胞質内に貯留する粘液は薄青色に染色された。導管は赤色に染色され、その導管上皮内の分泌顆粒は濃赤色に染色されていることから導管内の分泌顆粒は好酸性であると考えられた。しかし、腺房内の分泌顆粒は識別できなかった。好酸性の導管および腺房周囲に基底膜様の青色を示す部を認めた。基底膜は膠原線維より薄い青色に染色されるが、その判別は本実験では難しかった。

結紮解除 0 日後で、小葉間に膠原線維の顕著な増生を認め、導管上皮の周囲に青色に染まる線維の出現が認められた。3 日後には未熟な腺房細胞の出現により小葉内の膠原線維は減少しており、7 日後には、成熟した腺房細胞の出現と小葉間の膠原線維量は正常組織とほぼ同様であった (第 8 図)。

再生腺房細胞における aquaporin5 の発現

正常顎下腺の aquaporin5 は免疫組織化学で、腺房の細胞質に弱陽性を示し、腺房細胞頂端部の細胞膜に強い陽性反応を示した。また介在部導管管腔側の細胞膜に中等度の陽性反応を示した。線条部導管および顆粒管にその存在は観察できなかった。

Aquaporin5 は結紮解除 0 日後で、腺房細胞の消失に伴い、aquaporin5 の陽性反応は減弱し、tubular structure に陽性反応をわずかに認めた。3 日後で、aquaporin5 の陽性反応は増加し、幼若な腺房細胞の増加に伴う aquaporin5 の出現を確認した。7 日後および 14 日後では成熟した腺房に aquaporin5 の陽性反応を認めた (第 9 図)。つぎに aquaporin5 の遺伝子発現を real-time PCR で検索したところ、結紮により有意に減少を示すが、解除後は徐々に発現が増加して解除 14 日では正常唾液腺とほぼ同程度の発現

が見られた (第 10 図)。

考 察

唾液腺再生研究は未だ緒に就いたばかりで、再生に関わる直接的な機能的分子は未だ明らかにされていない。近年、tissue engineering で唾液腺の胚芽を移植する方法が試みられているが²⁴⁾、実用までに臓器と周囲環境の相互作用など不明な点が未だ多く残されている。これまでの唾液腺再生研究の報告では、ラットの顎下腺導管結紮解除モデルでは唾液腺局所で EGFR の発現が亢進することが報告され¹²⁾、わずかに HB-EGF や FGF の発現が検出されたのみである¹²⁾。著者らの研究室では、マウス顎下腺主導管をクリップで結紮し、その後結紮解除することで、腺房細胞再生を観察できるモデルを開発し検討をおこなってきた。マウス顎下腺の主導管の結紮により、これまでの報告と同様に顎下腺の萎縮が起こりその重量が減少することを確認した⁴⁻⁷⁾。また、結紮解除により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。結紮解除により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とほぼ同じ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 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。さらに、同時期に tubular structure で EGFR の発現が上昇することを確認した。これらのことから、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 1894 種を、減少を示した遺伝子 977 種を検出した。その中で腺房再生期に EGFR 発現増加がおこることを確認し、本実験においても免疫組織化学で発現増加を検出した。EGFR はリガンドが結合すると細胞内ドメインのリン酸化がおこりシグナル伝達を開始される。そこで著者は、本実験で 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為に、酵素処理によって、主導管を結紮して萎縮した顎下腺から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、マウスモデル顎下腺における腺房細胞の再生が *in vitro* で再現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。

Epiregulin は近年の研究により、末梢血液中のマクロファージ、胎盤、肺、腎臓、膵臓、大腸で発現していることが報告されている^{22, 25)}。これまでに epiregulin は平滑筋細胞²⁶⁾、卵母細胞の成熟²⁷⁾、小腸への障害からの保護²⁸⁾に働くほか、線維芽細胞、角膜細胞、角化細胞、腎臓の近位尿細管上皮を増殖させることが明らかにされている^{29, 30)}。しかし、唾液腺では epiregulin は adenoid cystic carcinoma の cell line である SACC-83 細胞の運動能および浸潤能を推進するとする報告²³⁾があるのみである。

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事は示したが、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、唾液腺機能における指標の一つとして、腺房細胞で aquaporin5 の発現を観察した。aquaporin は哺乳類の細胞にみられ主に水チャネルとして機能する 6 回膜通過型の膜タンパクで、1992 年に Peter Agre らによって赤血球膜タンパクとして単離された³¹⁾。現在までに aquaporin 0~12 の 13 種類が知られ、発現にそれぞれ臓器特異性がある。唾液腺では aquaporin5 が腺房細胞の頂部細胞膜にあり、唾液分泌に重要な役割を果たしていて、シェーグレン症候群患者では発現低下と分布異常が知られている³²⁾。本実験で結紮による萎縮唾液腺では、腺房細胞の消失により aquaporin5 の発現の著しい低下を免疫組織化学で確認した。また、aquaporin5 遺伝子の発現は結紮により有意に低下し、解除後は経過とともにその発現が回復した。免疫組織化学においても解除後 14 日では、正常唾液腺とほぼ変わらない aquaporin5 の分布を確認できた。Aquaporin5 の発現は唾液分泌量と相関するという報告もあり³³⁾、腺房細胞の再生により唾液腺の分泌機能も回復したと考えられた。

以上、本研究の結果、マウス顎下腺主導管の結紮と解除による腺房細胞再生のメカニズムにおいて、EGF family の epiregulin は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。

結 論

マウス顎下腺主導管結紮解除による唾液腺再生モデルを用いて、腺房細胞の再生過程を観察し以下の結果を得た。

1. 唾液腺再生は顎下腺主導管の結紮解除直後から始まることを確認した。
2. 腺房細胞の再生は導管上皮由来の tubular structure を形成する細胞が前駆細胞であることを明らかにした。
3. 腺房細胞の再生には EGFR とそのリガンドである増殖因子の関与が必要である事を示した。
4. 腺房細胞再生の初期に有意に増加する増殖因子として epiregulin を検出した。
5. 再生腺房細胞が機能的にも回復していることを、aquaporin5 の発現により確認した。

本研究により著者は唾液腺再生過程で作用する増殖因子として epiregulin が重要であることを初めて明らかにし、続いて起こる EGFR の活性化が腺房細胞の再生を誘導することを示した。

謝 辞

稿を終えるに当たり、懇切なるご指導とご高閲を賜りました本学病理学講座小宮山一雄教授、岩瀬孝志講師に謹んで感謝の意を表します。また、本研究に対してご支援とご協力をいただいた病理学講座員各位に深く感謝申し上げます。

References

1. Tamarin A (1971) Submaxillary gland recovery from obstruction. I. Overall changes and electron microscopic alterations of granular duct cells. *J Ultrastruct Res* 34, 276-87.
2. Tamarin A (1971) Submaxillary gland recovery from obstruction. II. Electron microscopic alterations of acinar cells. *J Ultrastruct Res* 34, 288-302.
3. Osailan SM, Proctor GB, Carpenter GH, Paterson KL, McGurk M (2006) Recovery of rat submandibular salivary gland function following removal of obstruction: a sialometrical and sialochemical study. *Int J Exp Pathol* 87(6), 411-423.
4. Cotroneo E, Proctor GB, Paterson KL, Carpenter GH (2008) Early markers of regeneration following ductal ligation in rat submandibular gland. *Cell Tissue Res* 332(2), 227-35.
5. Ueda K, Shimizu O, Oka S, Saito M, Hide M, Matsumoto M (2009) Distribution of tenascin-C, fibronectin and collagen types III and IV during regeneration of rat submandibular gland. *Int J Oral Maxillofac Surg* 38(1), 79-84.
6. Martinez JR, Bylund DB, Cassity N. (1982) Progressive secretory dysfunction in the rat submandibular gland after excretory duct ligation. *Arch Oral Biol* 27(6), 443-450.
7. Walker NI, Gobé GC (1987) Cell death and cell proliferation during atrophy of the rat parotid gland induced by duct obstruction. *J Pathol* 153(4), 333-344.
8. Okumura K, Nakamura K, Hisatomi Y, Nagano K, Tanaka Y, Terada K, Sugiyama T, Umeyama K, Matsumoto K, Yamamoto T, Endo F (2003) Salivary Gland Progenitor Cells Induced by Duct Ligation Differentiate Into Hepatic and Pancreatic Lineages. *Hepatology* 38(1), 104-113.
9. Cohen S (1962) Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* 237, 1555-1562.
10. Van Noorden S, Heitz P, Kasper M, Pearse AG (1977) Mouse epidermal growth factor: light and electron microscopical localisation by immunocytochemical staining. *Histochemistry* 52(4), 329-340.
11. Holbro T, Hynes NE (2004) ErbB receptors: directing key signaling networks

- throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44, 195-217.
12. Dang H , Elliott JJ , Lin AL , Zhu B , Katz MS , Yeh CK (2008) Mitogen-activated protein kinase up-regulation and activation during rat parotid gland atrophy and regeneration: role of epidermal growth factor and β 2-adrenergic receptors. *Differentiation* 76(5), 546-557.
 13. Nishioka T , Kim HS , Luo LY , Huang Y , Guo J , Chen CY (2011) Sensitization of epithelial growth factor receptors by nicotine exposure to promote breast cancer cell growth. *Breast Cancer Res* 13(6), R113.
 14. Sebastian S, Settleman J, Reshkin SJ, Azzariti A, Bellizzi A, Paradiso A (2006) The complexity of targeting EGFR signalling in cancer: from expression to turnover. *Biochim Biophys Acta* 1766(1), 120-139.
 15. Kashimata M, Sayeed S, Ka A, et al. (2000) The ERK-1/2 signaling pathway is involved in the stimulation of branching morphogenesis of fetal mouse submandibular glands by EGF. *Dev Biol* 220(2), 183-196.
 16. Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, Phung Y, Pedersen RA, Werb Z, Derynck R. (1995) Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature* 376(6538), 337-341.
 17. Schneider MR, Werner S, Paus R, Wolf E (2008) Beyond wavy hairs: the epidermal growth factor receptor and its ligands in skin biology and pathology. *Am J Pathol* 173(1), 14-24.
 18. Younes MN, Park YW, Yazici YD, Gu M, Santillan AA, Nong X, Kim S, Jasser SA, El-Naggar AK, Myers JN (2006) Concomitant inhibition of epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases reduces growth and metastasis of human salivary adenoid cystic carcinoma in an orthotopic nude mouse model. *Mol Cancer Ther* 5(11), 2696-2705.
 19. Häärä O, Koivisto T, Miettinen PJ (2009) EGF-receptor regulates salivary gland branching morphogenesis by supporting proliferation and maturation of epithelial cells and survival of mesenchymal cells. *Differentiation* 77(3), 298-306.
 20. Dehaye JP, Turner RJ (1997) Epiregulin binds to epidermal growth factor receptor and ErbB-4 and induces tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor, ErbB-2, ErbB-3 and ErbB-4. *Oncogene* 15(23), 2841-2848.
 21. Toyoda H, Komurasaki T, Uchida D, Morimoto S (1997) Distribution of

- mRNA for human epiregulin, a differentially expressed member of the epidermal growth factor family. *Biochem J* 326(Pt 1), 69-75.
22. Dehaye JP, Turner RJ (1991) Isolation and characterization of rat submandibular intralobular ducts. *Am J Physiol* 261 (3 Pt 1), C490-496.
23. Hu KL, Li SL, Gan YH, Wang CY, Yu GY (2009) Epiregulin promotes migration and invasion of salivary adenoid cystic carcinoma cell line SACC-83 through activation of ERK and Akt. *Oral Oncol.* 45(2), 156-63.
24. Ogawa ML, Oshima M, Imamura A, Sekine Y, Ishida K, Yamashita K, Nakajima K, Hirayama M, Tachikawa T, Tsuji T (2013) Functional salivary gland regeneration by transplantation of a bioengineered organ germ. *Nat Commun* 4, 2498.
25. Bernardes VF, Gleber-Netto FO, Sousa SF, Silva TA, Abreu MH, Aguiar MC (2011) EGF in saliva and tumor samples of oral squamous cell carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 19 (6), 528-533.
26. Shirasawa S, Sugiyama S, Baba I, Inokuchi J, Sekine S, Ogino K, Kawamura Y, Dohi T, Fujimoto M, Sasazuki T. (2004) Dermatitis due to epiregulin deficiency and a critical role of epiregulin in immune-related responses of keratinocyte and macrophage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (38), 13921-13926.
27. Taylor DS, Cheng X, Pawlowski JE, Wallace AR, Ferrer P, Molloy CJ (1999) Epiregulin is a potent vascular smooth muscle cell-derived mitogen induced by angiotensin II, endothelin-1, and thrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (4), 1633-1638.
28. Park JY, Su YQ, Ariga M, Law E, Jin SL, Conti M (2004) EGF-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science* 303 (5658), 682-684.
29. Sakai T, Larsen M, Yamada KM. (2003) Fibronectin requirement in branching morphogenesis. *Nature* 423 (6942), 876-881.
30. Onodera T, Sakai T, Hsu JC, Matsumoto K, Chiorini JA, Yamada KM. B (2010) tbd7 regulates epithelial cell dynamics and branching morphogenesis. *Science* 329 (5991), 562-565.
31. Zeidel ML, Ambudkar SV, Smith BL, Agre P (1992) Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein. *Biochemistry* 31 (33), 7436-7440.

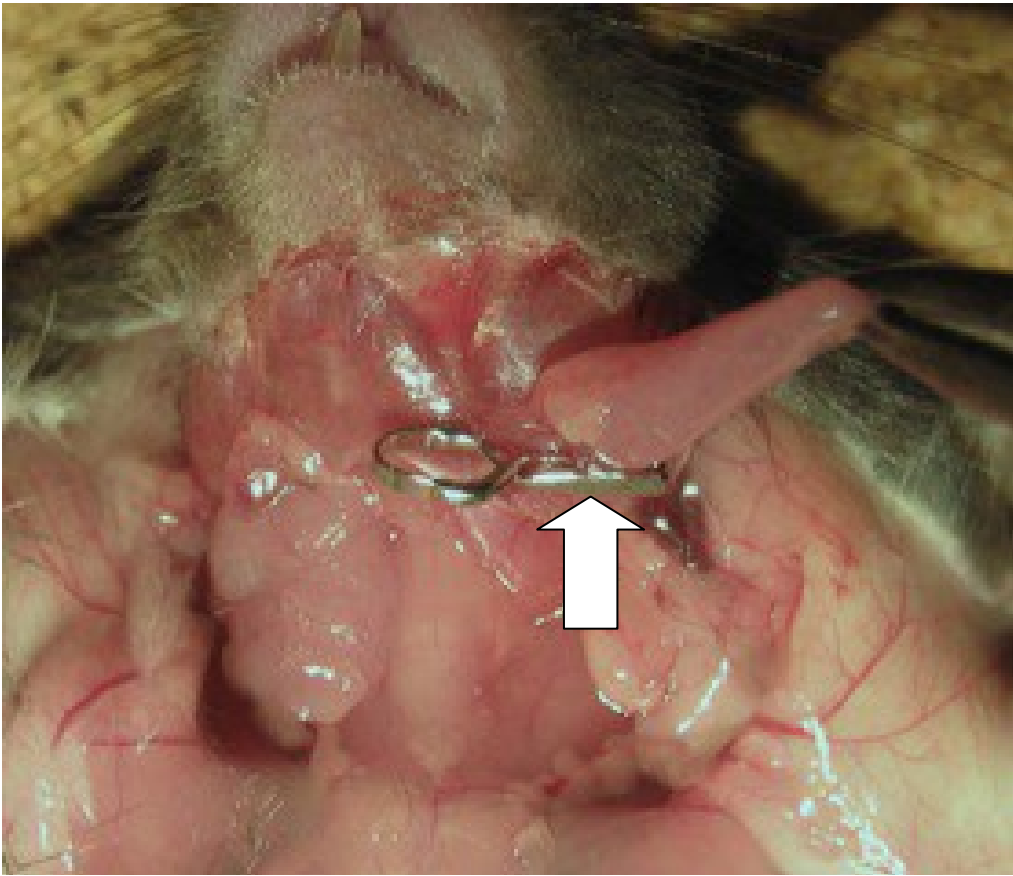
32. Ohashi Y, Ishida R, Kojima T, Goto E, Matsumoto Y, Watanabe K, Ishida N, Nakata K, Takeuchi T, Tsubota K. (2003) Abnormal protein profiles in tears with dry eye syndrome. *Am J Ophthalmol* 136 (2), 291-299.
33. Di Wang, Iwata F, Muraguchi M, Ooga K, Ohmoto Y, Takai M, Mori T, Ishikawa Y (2009) Correlation between salivary secretion and salivary AQP5 levels in health and disease. *J Medical Investigation* 56, 350-353.

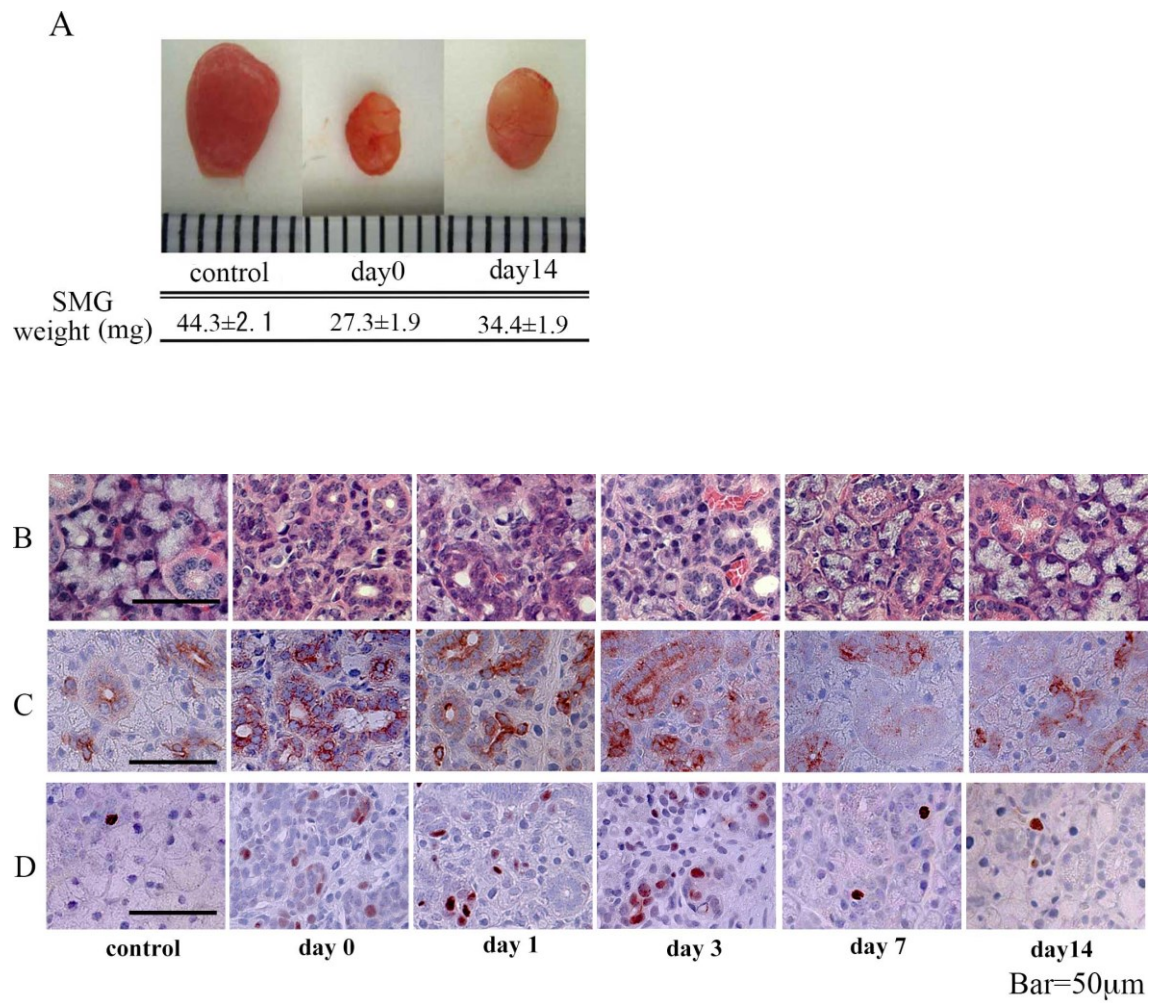
第1表 免疫組織化学およびWestern blotに使用した抗体一覧

免疫組織化学		
anti-CK18	x200	Lifespan Biosciences
anti proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	x50	DAKO
anti-EGFR	x200	Abcam
anti-phospho-EGFR	x200	Epitomics
anti-aquaporin5	x1000	Abcam
Western blot		
anti-EGFR	x400	Abcam
anti-phospho-EGFR	x1000	Epitomics
anti-epiregulin	x2000	Santa Cruz Biotechnology
anti-HB-EGF	x2000	Santa Cruz Biotechnology
anti- β -actin	x2000	Medical and Biological Laboratories
2次抗体および発色kit		
rabbit anti-goat Simple stain MAX PO [®]		Nichirei Bioscience
horseradish peroxidase-labeled goat anti-mouse Histofine stain kit		Nichirei Bioscience

第2表 検索に使用した primer sequence および product size

Gene	5primer sequence	3primer sequence	Size (bp)	Accession number
EGF	5'-CATCATGGTGGTGGCTGTCTG-3'	5'-CACTTCCGCTTGGCTCATCA-3'	137	NM_010113
TGF- α	5'-TCGCAGCAGCCAGTACCATC-3'	5'-CCAACCGACTTGTCTCAACCTA-3'	133	NM_031199
HB-EGF	5'-AAGTGAAGTTGGGCGTGGCTA-3'	5'-CGTGTAACGAACCACTGTCTCAGAA-3'	92	NM_010415
Amphiregulin	5'-TCCATGCACTGCCAAGTTCA-3'	5'-TCTCCACACCGTTCACCAAAGTAA-3'	117	NM_009704
Betacelullin	5'-TCCAAGATTTCCAAGTGAACCACA-3'	5'-TGCTGACATCAGTTCTAACCAGGAC-3'	105	NM_007568
Epiregulin	5'-CAGAGCCTTACACATGTCCAGCA-3'	5'-AAACATGTTACCCGACACCAG-3'	116	NM_007950
Epigen	5'-GGTTATACGGGACAACGATGTGAG-3'	5'-CCAGAGCAGATGATGTAGGGTGA-3'	182	NM_053087
PPIA	5'-ATCTTGTCATGGCAAATGCTG-3'	5'-AAACGCTCCATGGCTTCCAC-3'	146	NM_008907

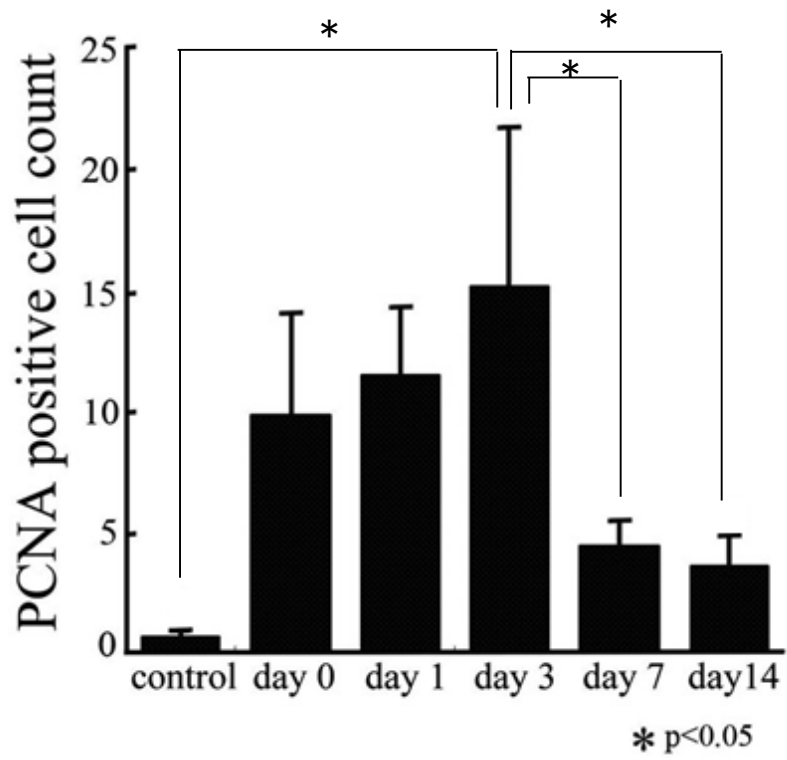




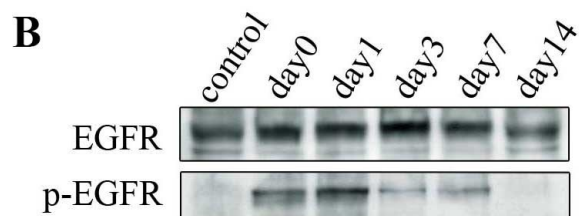
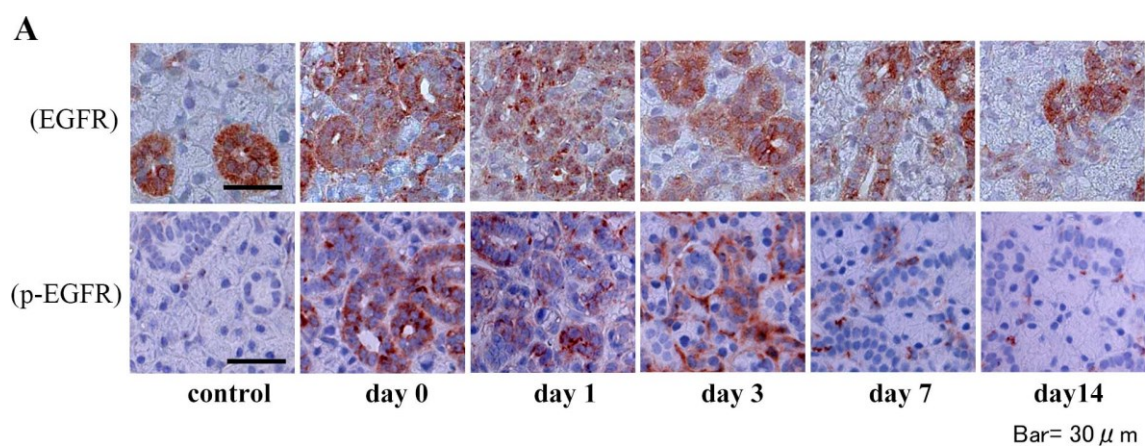
第2図 顎下腺主導管の結紮による萎縮と解除による再生所見

A:顎下腺重量の変化, B:萎縮と再生唾液腺の組織学的変化 (H&E stain)

C:CK18 免疫染色所見, D:PCNA 免疫染色所見

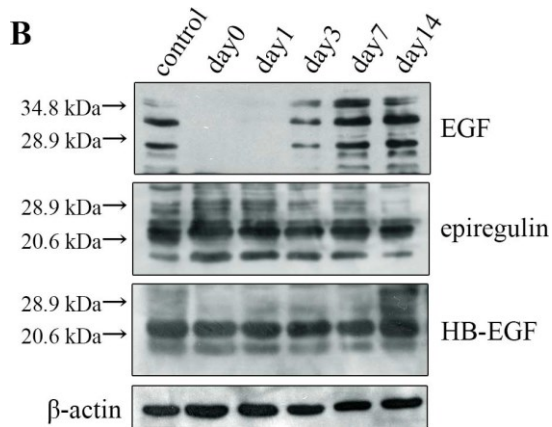
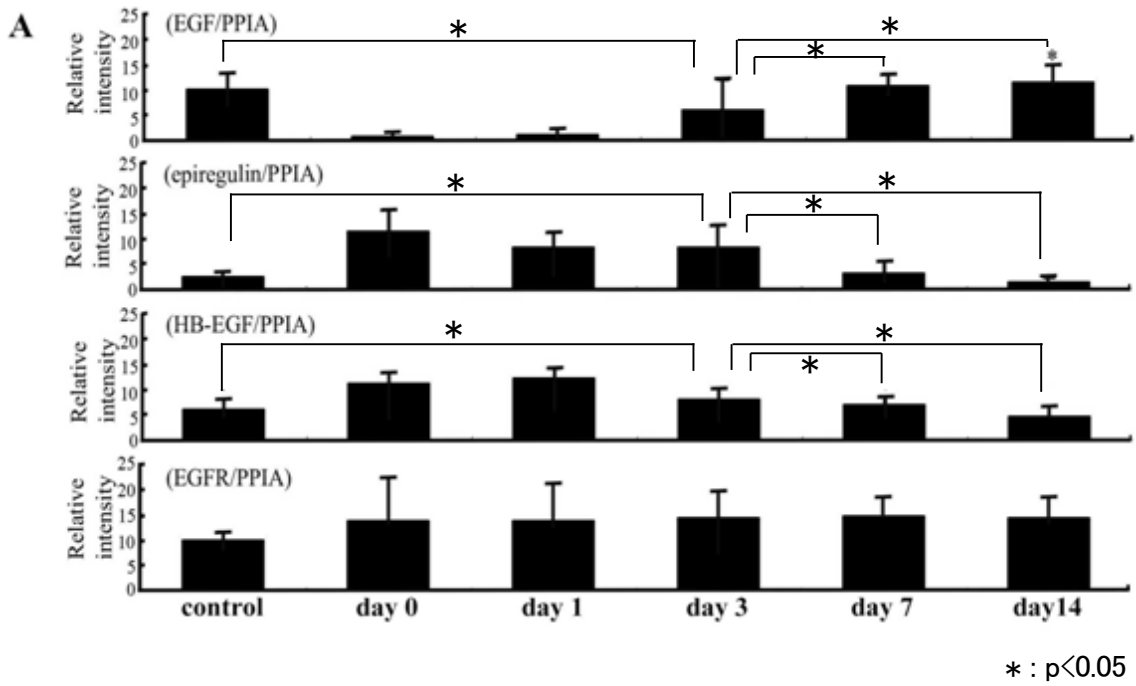


第3図 顎下腺の結紮と解除による PCNA 免疫染色陽性細胞数の経時的変化



第4図 導管の結紮と解除による顎下腺における EGFR 発現

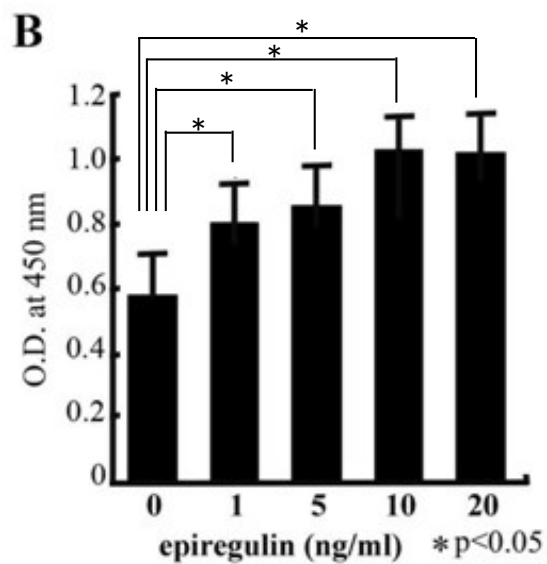
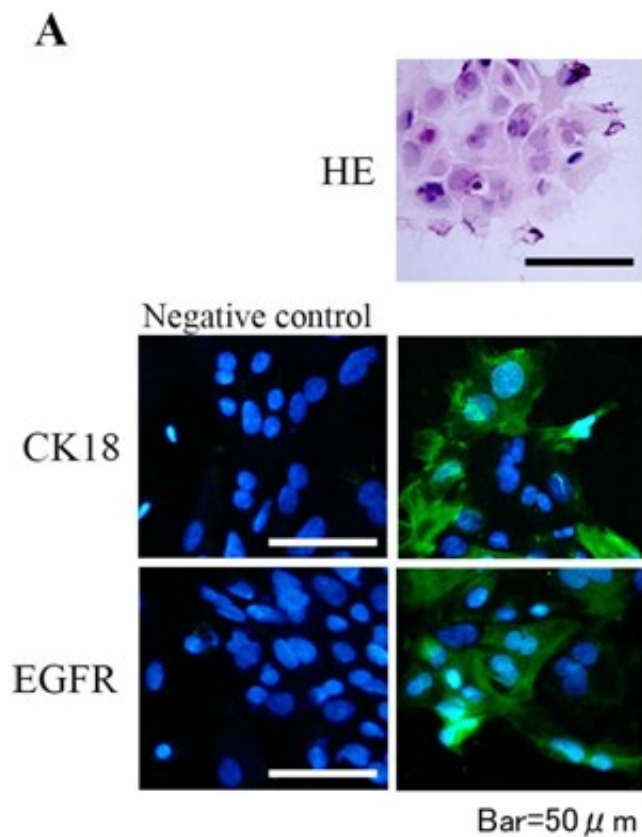
A:EGFR および EGFR リン酸化の経時的変化についての免疫組織化学的観察, B: EGFR リン酸化の Western blot による経時的解析



第5図 導管の結紮と解除による顎下腺における EGF family の発現

A: EGF family の遺伝子発現の real time PCR による経時的解析

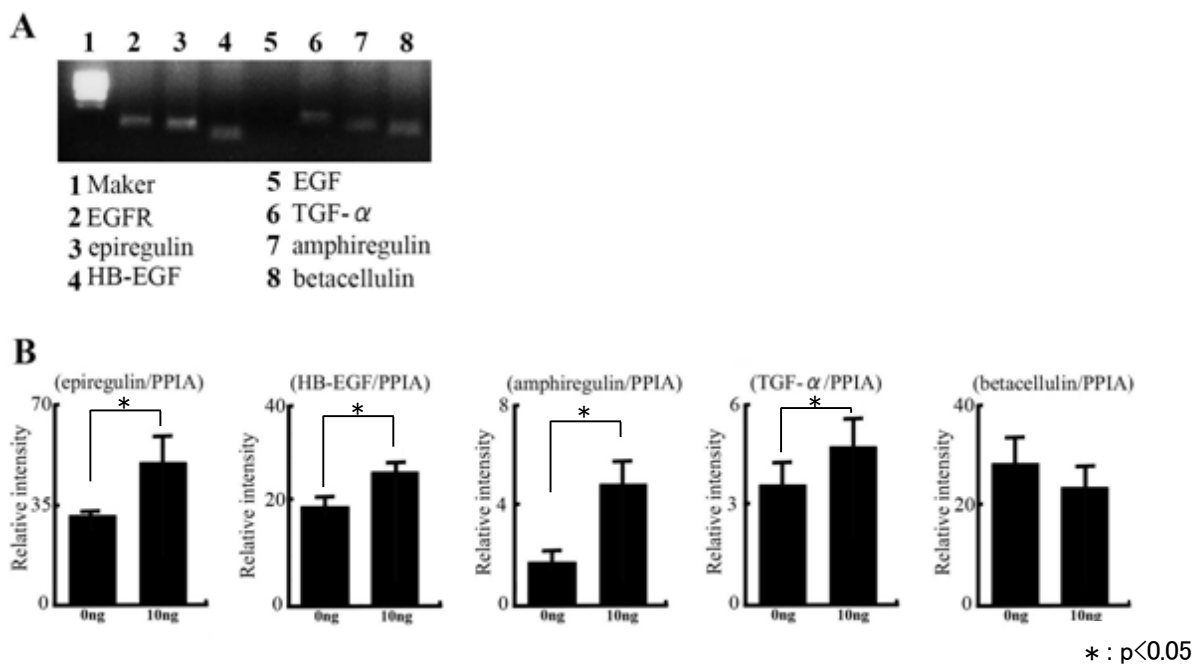
B: EGF および epiregulin タンパク発現の Western blot による経時的解析



第6図 萎縮唾液腺から分離培養をおこなった唾液腺上皮細胞の解析

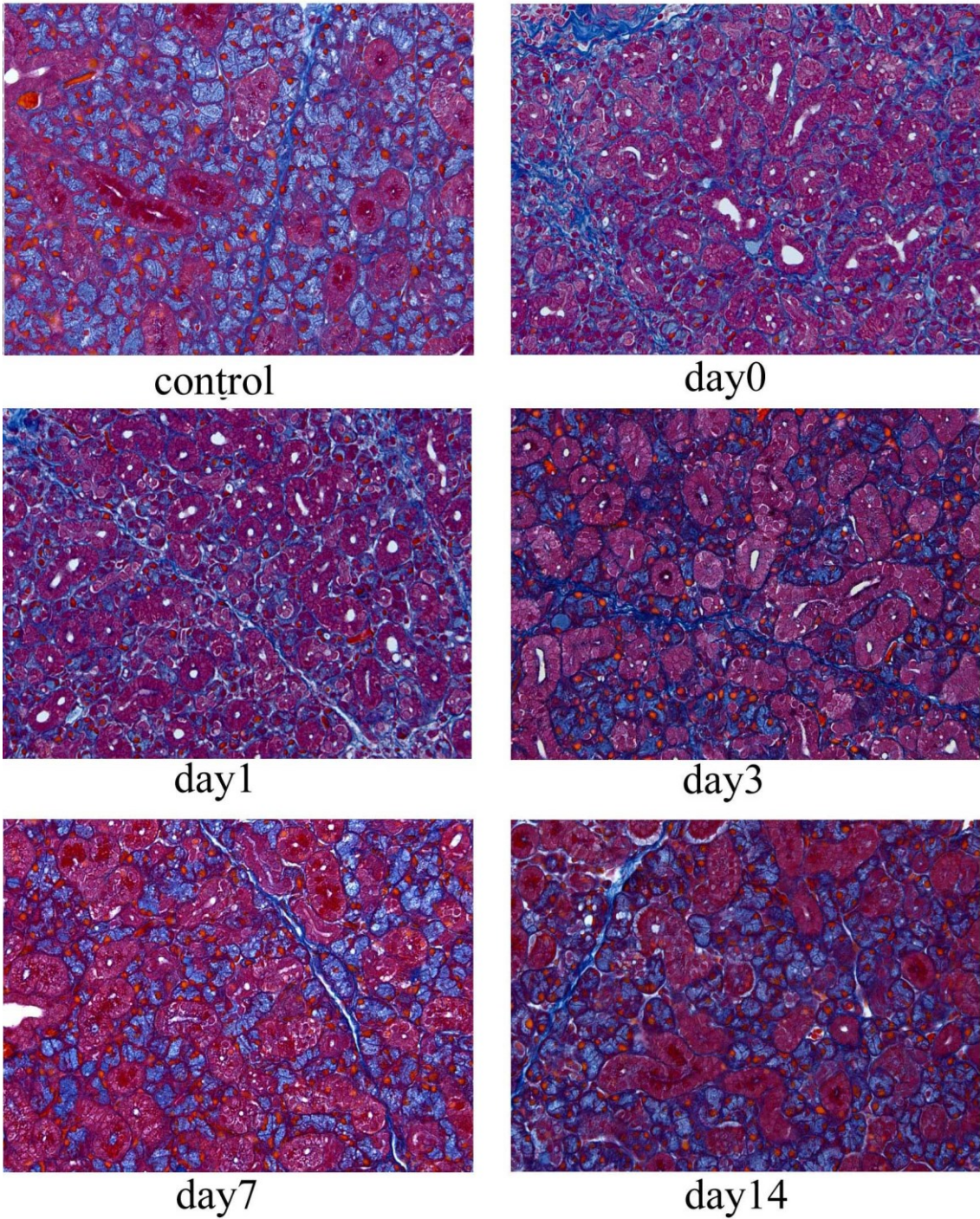
A: H&E 染色による形態像, CK18 および EGFR 発現の免疫組織化学

B: 分離培養細胞の epiregulin 添加による細胞増殖能の検討

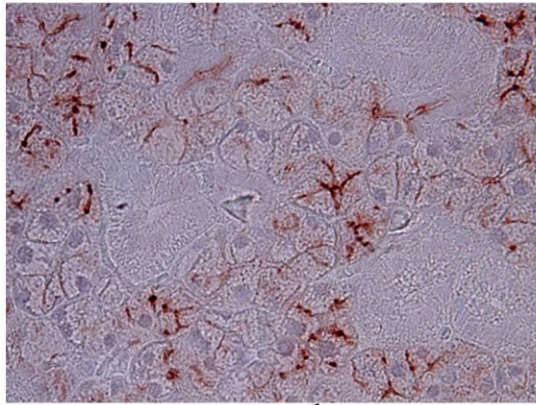


第 7 図 分離培養上皮細胞における EGF family 遺伝子の発現の検討

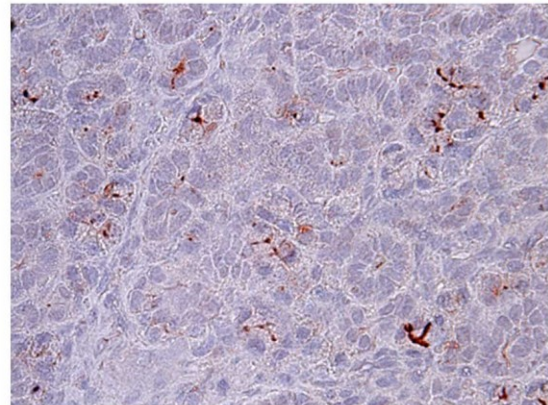
A: epiregulin 非添加細胞, B: epiregulin 添加後の培養 6 時間後



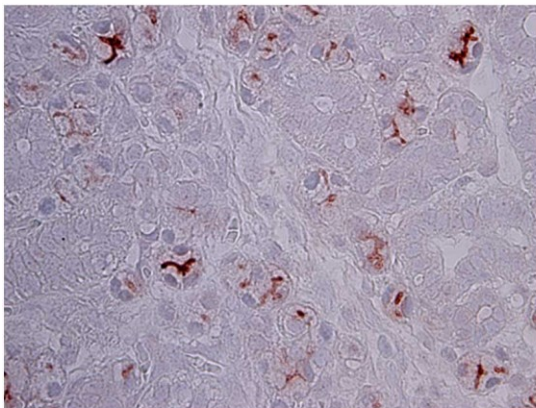
第8図 導管の結紮と解除をおこなった顎下腺における小葉内結合組織の経時的変化, Azan - Mallory 染色



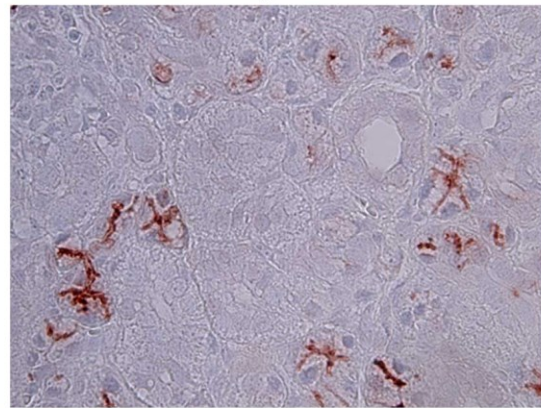
control



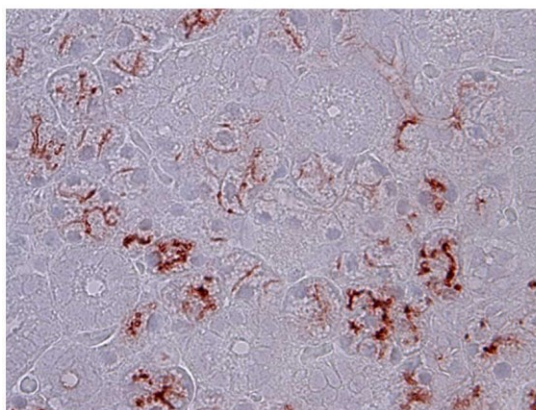
day0



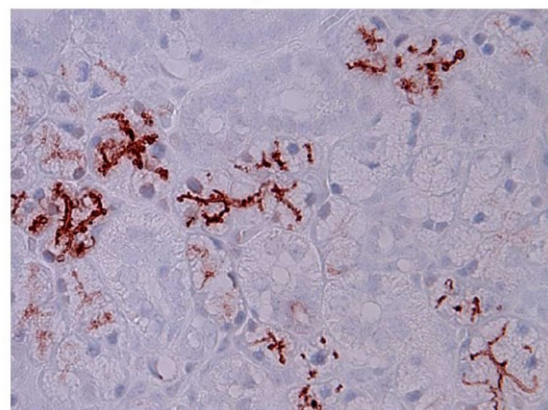
day1



day3

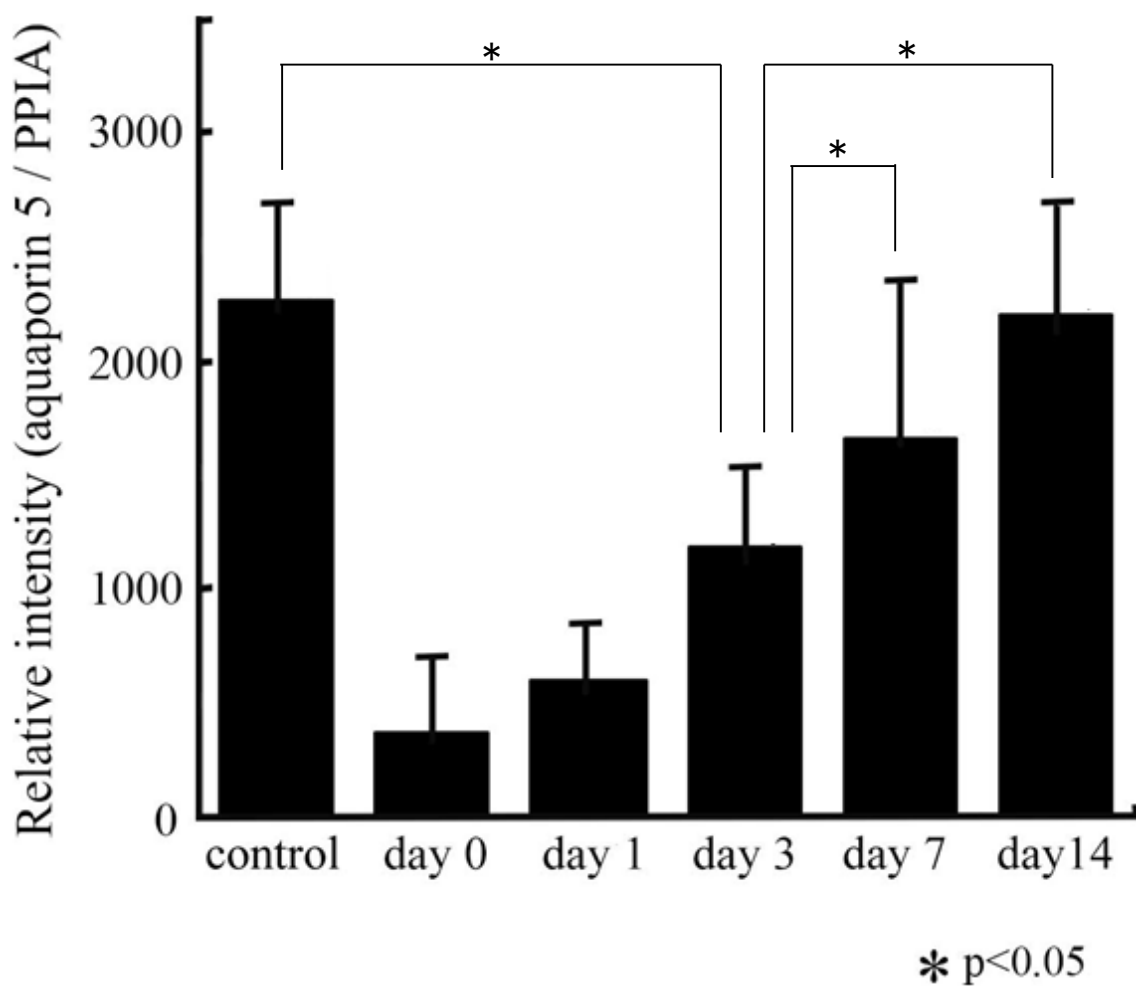


day7



day14

第9図 導管の結紮と解除をおこなった顎下腺における aquaporin5 の免疫組織化学による経時的解析



第10図 導管の結紮と解除をおこなった顎下腺における aquaporin5 遺伝子の発現の経時的変化, real time PCR