

論文の内容の要旨

氏名：小川 博亮

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名： **Regulatory mechanism on expression of stem cell markers in parotid acinar cells after tissue injuries**
(組織傷害後の耳下腺腺房細胞における幹細胞マーカーの発現調節機構)

唾液は口腔内環境を維持するために必須の体液であり、唾液分泌低下は重篤な齲蝕や歯周疾患、口腔粘膜の感染症などの疾病を引き起こすだけでなく、咀嚼障害や嚥下障害など摂食困難の原因にもなる。現在、全国に約 800 万人の口腔乾燥症患者が存在すると言われており、歯科において重大な問題となっている。唾液分泌低下の原因は様々であるが、シェーグレン症候群のような慢性炎症や頭頸部癌への放射線治療は、唾液腺の組織障害を引き起こし、唾液腺腺房細胞の萎縮やアポトーシスへつながると考えられている。一方、組織障害は唾液分泌低下を引き起こすものの、その障害の程度が比較的軽度であれば、やがて唾液分泌が回復することが知られている。また、組織障害時には幹細胞・前駆細胞マーカーが増加することも報告されている。したがって、唾液腺組織の中に存在する幹細胞、あるいは前駆細胞が組織障害によって活性化し、増殖・分化して失われた腺房細胞を再生させるのではないかと考えられている。しかし、幹細胞・前駆細胞が組織中のどこにどのような形で存在しているのかは、明らかではない。

我々はこれまでに、耳下腺腺房細胞の初代培養細胞を用いて、唾液腺の機能低下機構について解析を行ってきた。初代培養細胞は、組織からの単離直後には腺房細胞としての性質を維持しているが、徐々に腺房細胞マーカーであるアミラーゼやアクアポリン5の発現量が低下し、代わって claudin-4 などの導管マーカーの発現がみられるようになる。これらの遺伝子発現変化を Src キナーゼの阻害薬である PP1 や p38 MAP キナーゼ阻害薬である SB203580 が抑制することや、細胞単離の際に p38MAP キナーゼの活性化が起こるが、Src 阻害薬添加によってその活性化が抑制されることから、Src-p38 MAP キナーゼを介するシグナル経路が腺房細胞の脱分化を引き起こしていると考えた。しかし、導管マーカーである claudin-4 の発現はみられたが、導管の重要な働きを担うナトリウム水素交換輸送体の発現はみられず、唾液腺発生初期にみられる claudin-6 や排出導管の基底細胞にみられる cytokeratin-14 の発現が上昇しており、未分化導管としての性質を獲得していることが予想された。これらのことから、腺房細胞は組織障害によって未分化な状態になり腺房細胞としての機能を失うが、同時に再分化能を獲得している可能性があると考えた。

そこで、本研究ではまず、唾液腺と類似の構造・機能を持つ膵臓外分泌細胞における幹細胞・前駆細胞マーカーである nestin の発現について解析を行った。腺房細胞は、Sprague-Dawley 系雄性ラットから単離した耳下腺から酵素処理によって単離した。動物実験は松戸歯学部動物実験委員会の承認を得て行った。単離腺房細胞を Src キナーゼ阻害薬 PP1 存在下及び非存在下で培養し、1, 2, 3, 7 日後に、総 RNA およびタンパク質を抽出した。mRNA の発現量はリアルタイム RT-PCR 法で、タンパク質の発現量はウエスタンブロッティング法によって定量化した。その結果、nestin は単離直後の細胞にはほとんどみられなかったが、培養3日目まで mRNA 発現量が増加した。また、タンパク質量は7日目まで増加し続けた。一方、PP1 存在下で培養した細胞では、nestin の発現量は増加するものの低く抑えられた。nestin 発現細胞が腺房細胞由来であることを示すために、抗 nestin 抗体および抗アミラーゼ抗体による二重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。中間径フィラメントの一つである nestin は細胞質中に網目状に観察され、同じ細胞にアミラーゼを含む分泌顆粒が存在した。しかし、分泌顆粒をよく維持している細胞では nestin の発現が弱く、分泌顆粒が減少している細胞では nestin の発現が高いという関係がみられた。したがって、腺房細胞が未分化の状態になることと nestin の発現増加が関連していることが予測された。

次に、腺房細胞におけるマイクロ RNA (miRNA) の発現変化を解析した。miRNA は 20-25 塩基からなるノンコード RNA であり、他の遺伝子の発現調節を行うことが報告されている。腺房細胞の遺伝子発現変化における miRNA の役割を調べるために、細胞単離直後および培養1日目における miRNA の発現パターンを GeneChip miRNA array を用いて解析し、以前行った mRNA expression array の結果と比較した。その結果、単離直後と比べて、培養1日目には 18 種の miRNA が発現上昇し、52 種の miRNA が発現低下していた。

発現変化していた miRNA に対する KEGG pathway 解析を行ったところ、43 の pathway が同定されたが、その一つとして Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells が同定された。次に、発現低下した miRNA のうち、単離直後の発現量が高かった 7 種の miRNA (miR-375-3p, miR-3473, miR-429, miR-30b-5p, miR-15b-5p, let-7f-5p, miR-25-3p) について標的遺伝子をデータベースより抽出した。抽出された 1088 遺伝子のうち、202 遺伝子が expression array 解析において発現上昇していた。この 202 遺伝子を用いて KEGG pathway 解析を行ったところ、21 の pathway が同定されたが、その一つとして Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells が同定された。このことから、miRNA の発現変化が多能分化能の獲得に関与する可能性が考えられた。続いて、7 種の miRNA のうち、最も発現変化が大きく、全 miRNA 中で Weighted Average Difference の値が最も大きかった miR-3473 について、解析を行った。miR-3473 の発現量は単離直後と比較して、培養 2 日目まで有意に低下した。miR-3473 の標的遺伝子候補の一つであり、nestin の発現調節を行っているとして報告されている Sox10 の mRNA 発現量およびタンパク質量を調べたところ、いずれも 2 日目をピークとして増加していた。一方、Src 阻害薬である PP1 存在下では、miR-3473 の発現低下、Sox10 の発現上昇ともに、非存在下と比較して抑制されていた。

これらの結果から、唾液腺初代培養細胞では、Src が誘導するシグナルにより、幹細胞マーカーである nestin が発現上昇するが、miRNA の発現変化が nestin の発現誘導に関わっている可能性が示された。初代培養細胞における遺伝子発現変化は、生体内における組織障害応答性の幹細胞・前駆マーカーの増加の原因の一つであると考えられる。腺房細胞が組織障害に応答して未分化状態になるものの、再分化能を獲得することによって、障害後の再生に関わる可能性がある。