

学位論文内容の要旨

論文提出者	赤井 崇浩
論文審査委員	(主 査) 朝日大学歯学部 教授 住友 伸一郎 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 柏俣 正典 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 近藤 信夫
論文題目	胎仔マウス顎下腺の分枝形態形成における integrin $\alpha 5$ サブユニットの役割
論文内容の要旨	<p>【目的】</p> <p>マウス顎下腺は胎生 11 日目 (E11) に舌の基部に位置する上皮細胞と、神経堤細胞由来の間葉細胞の相互作用によって上皮組織が肥厚し、その後、間葉側へ陥入することから発生する。その後、上皮の先端は分枝と伸長を繰り返す、外分泌腺特有の枝分かれ構造を形成していく。この現象は分枝形態形成とよばれており、重要な器官形成機構の一つとしてよく知られている。E13 の顎下腺では上皮の先端が 3 から 4 個に分枝した小葉が観察されるが、分枝形態形成にともない E15 以降には分泌顆粒が観察されるようになり発生が進行して行く。顎下腺の分枝形態形成は、無血清培養液中で器官培養した場合でも観察できることや顎下腺原基から間葉を取り除いて培養すると腺上皮の発達は完全に停止してしまうことなどから、上皮-間葉相互作用によって制御されている。上皮-間葉相互作用は、唾液腺などの外分泌腺だけではなく、歯胚、毛根、肺、神経系および腎臓などの発生過程に共通する機構として重要な役割を果たしている。Integrin は細胞外の情報を細胞内へ伝達 (outside-in signal) するほか、細胞内の情報を細胞外へ伝達 (inside-out signal) することで細胞の接着、分化、増殖、移動およびアポトーシスに関わることから上皮間葉相互作用を制御する因子と考えられている。本研究では、顎下腺の分枝形態形成における integrin $\alpha 5$ の役割について検討を行った。</p> <p>【材料および方法】</p> <p>ICR 系妊娠マウスから胎仔を取り出して実験に使用した。顎下腺原基は胎仔マウスから実体顕微鏡下で取り出し、DMEM/F12 培養液 (100 units/ml ペニシリン, 50 $\mu\text{g/ml}$ トランスフェリン, 100 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシンおよび 150 $\mu\text{g/ml}$ ビタミン C 含有) に浮かべた Nuclepore 膜上 (pore size 0.1 μm) で培養を行った。培養顎下腺原基の分枝形態形成に及ぼす抗 $\alpha 5$ integrin 抗体の影響は matched pair 法により行った。すなわち、胎生 13 日目 (E13) の同一の個体から得られた一方の顎下腺原基は anti integrin $\alpha 5$ (0, 10 および 20 ng/ml) を含む培養液上の膜に、もう一方の顎下腺は対照群として正常ラット IgG を含む培養液上の膜に静置して培養を行った。一定時間の培養後、顎下腺原基の形態の写真を記録して分枝数を比較した。また、ウェスタンブロット解析に用いた試料には、E13 顎下腺原基を上述の方法で anti integrin $\alpha 5$ 含有の培養液を用いて 24 時間培養を行い、さらに EGF あるいは FGF10 で刺激後 0, 10, 30 および 60 分に回収した顎下腺を使用した。</p>

さらに、一部の実験では顎下腺原基に Dispase を処理して分離した上皮に matrigel を覆って同様に Nuclepore 膜上で培養を行った。この際、培養液には anti integrin $\alpha 5$ (10 $\mu\text{g/ml}$) あるいは同量の正常ラット IgG を添加し、さらに EGF (20 ng/ml) あるいは FGF10 (500 ng/ml) を加えて顎下腺上皮の cleft 形成反応あるいは elongation 形成反応を惹起させた。顎下腺発生過程に転写される *integrin* の各種サブユニット ($\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$ および $\beta 4$ サブユニット) の mRNA は $\Delta \Delta \text{CT}$ 法によるリアルタイム RT-PCR により相対定量を行った。

【結 果】

すでに顎下腺原基に発現していることが知られている各種 *integrin* サブユニット ($\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$ および $\beta 4$ サブユニット) の mRNA について real time RT-PCR による相対定量を実施した。その結果、顎下腺発生の初期 (E13-E14) で $\alpha 5$ サブユニットの発現が高いことが分かった。他のインテグリンサブユニットでは $\beta 1$ が初期で高値を示した。培養顎下腺原基に anti integrin $\alpha 5$ を添加すると 5 $\mu\text{g/ml}$ の濃度以上で濃度依存的に分枝形態形成が抑制された。高濃度の anti integrin $\alpha 5$ (20 $\mu\text{g/ml}$) では顎下腺原基の分枝形態形成はほぼ完全に停止した。顎下腺上皮のみの培養系を用いた解析から、anti integrin $\alpha 5$ (10 $\mu\text{g/ml}$) は EGF が誘導する cleft 形成と FGF10 が誘導する elongation 形成を共に抑制した。抑制の程度は cleft 形成で約 20%、elongation 形成で 50% であった。また、抗 integrin $\alpha 5$ 抗体の添加により、FGF10 で惹起される E13 顎下腺原基の ERK1/2 のリン酸化の亢進が抑制された。

【考 察】

以上の結果から、integrin $\alpha 5$ サブユニットは発生の初期の段階で分枝形態形成に関わることが示唆された。また、integrin $\alpha 5$ サブユニットは分枝形態形成を構成する cleft 形成と elongation 形成に共に関与しており、elongation 形成には ERK1/2 経路の活性化を介していると考えられた。

【結 論】

顎下腺原基に発現している integrin $\alpha 5$ サブユニットは顎下腺原基の分枝形態形成に重要な役割を果たしていることが明らかになった。