



# Expression of Ror2 associated with fibrosis of the submandibular gland

Takahashi, Daiki

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2018-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7127号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007127>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

## 学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Expression of Ror2 associated with  
fibrosis of the submandibular gland

顎下腺の線維化に関連した Ror2 の発現

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻  
口腔外科学  
(指導教員：古森 孝英教授)

高端 大希

顎下腺は大唾液腺の一つであり、食物の消化、抗菌、口腔内の湿潤など様々な面において重要な役割を担っている。唾液腺炎症によって頻発する顎下腺の機能異常は QOL に大きな影響を与える。しかし炎症によって誘起される顎下腺の機能異常のメカニズムは不明な点が多い。今回我々は顎下腺主導管の片側結紮により顎下腺炎症を誘起させたモデルマウスを用いて、様々な組織の組織損傷と炎症応答に関与していることが知られている Ror ファミリー受容体型チロシンキナーゼなどの発現解析を行った。

本研究では 8 週齢雄の C57/BL6 マウスを用いて実験を行った。吸入麻酔下にて頸部正中に切開線を加えて顎下腺、および顎下腺主導管であるワルトン管を剖出した。右側顎下腺の顎下腺主導管を手術用絹糸にて結紮し、切開部を縫合した。コントロールは非結紮側、ならびに疑似手術顎下腺を用いた。

マウスの顎下腺は主に腺房細胞、介在部導管、顆粒性導管、線条部導管、排泄導管によって構成されている。組織学的解析から、結紮後 1 日目において、導管の拡張が認められたが、腺房細胞に明らかな変化は認められなかった。結紮後 4 日目と 7 日目においては、拡張した導管の細胞、腺房細胞ともに萎縮し、また、小葉間の間質に線維芽細胞様の細胞が多数認められた。一方、非結紮側と疑似手術顎下腺ではこれらの変化は認められなかった。次に、線維芽細胞のマーカーであるビメンチンに対する抗体を用いて免疫組織染色を行った。その結果、小葉内および小葉間の間質においてビメンチン陽性細胞の蓄積が観察された。一方、非結紮側顎下腺におけるビメンチン陽性細胞はわずかしこ認められなかったことから、主導管結紮が線維芽細胞の蓄積をもたらしたことが示された。

次に我々は顎下腺の炎症が線維性病変を誘起するかどうかについて検討を行うため、アザン染色によって膠原繊維を検出した。その結果、結紮後 4 日目と 7 日目において、線維芽細胞の蓄積と一致した小葉間の間質に膠原繊維の蓄積が認められた。一方、非結紮側顎下腺においては、膠原繊維の蓄積は認められなかった。したがって、主導管結紮により顎下腺の線維性病変が誘起されることが示された。

Wnt5a-Ror シグナルが顎下腺の傷害応答に関与する可能性を検討するために、主導管結紮後の顎下腺の Ror1, Ror2, Wnt5a の発現量を定量的 RT-PCR (qRT-PCR)法にて比較した。その結果、結紮後 4 日目と 7 日目の顎下腺において、それら全ての遺伝子発現が非結紮側と比べて有意に増加していることが示された。次に免疫組織学的解析によって Ror2 の発現部位について検討した。その結果、結紮の有無や結紮期間に関わらず Ror2 の発現が導管細胞に認められ、腺房細胞には認められなかった。一方、結紮後 4 日目と 7 日目において、小葉間間質の線維性病変部や腺房細胞の周囲に Ror2 の顕著な染色が認められた。このような変化は非結紮側と疑似手術顎下腺では認められなかった。これらの結果より、Ror2 は結紮側顎下腺の線維化の進行に伴って発現誘導されることが示唆された。

顎下腺線維化の分子の基盤を明らかにするため、QIAGEN 社 RT2 Profiler PCR Array Mouse Fibrosis を用いて線維化に関わる遺伝子発現のプロファイリングを行った。その結果、様々な組織の線維化において重要な役割を果たしている TGF- $\beta$  1, TGF- $\beta$  3 の発現が

非結紮側と比較して結紮側顎下腺で亢進していることが確認された。また TGF- $\beta$  receptor II, TGF $\beta$ -induced factor homeobox 1, Smad7, Serpine1, Ctgf, Snail1 といった TGF- $\beta$  シグナルに関連する遺伝子の発現量の増加も認められており、TGF- $\beta$  シグナルが顎下腺の線維化に関与していることが示唆された。さらに、炎症反応に関わる IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 、細胞外基質のリモデリングに関わる Collagen type I, MMPs、細胞接着に関わる Integrin  $\beta$  8, Integrin  $\alpha$  V、増殖因子 Platelet derived growth factor B, Hepatocyte growth factor といった遺伝子の結紮側における発現量増加が認められた。我々は結紮後 1 日目、4 日目、7 日目における TGF- $\beta$  1, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MMP-2 の発現量について qRT-PCR 解析を行った。その結果、TGF- $\beta$  1 と TNF- $\alpha$  は非結紮側と比較して結紮側顎下腺において結紮後 1 日目から有意な発現量の増加が認められ、結紮後 4 日目と 7 日目では更なる発現量の増加が認められた。IL-1 $\beta$  と MMP-2 は結紮後 4 日目と 7 日目で有意な発現量の増加が認められた。TNF- $\alpha$  と IL-1 $\beta$  は骨格筋損傷モデルマウスにおいて Ror1 と Ror2 の発現を誘起することが知られており、線維化が進行している顎下腺においてこれらの炎症性サイトカインが Ror1 と Ror2 の発現誘導に関与している可能性が示唆された。またマウス尿管結紮によって誘起される腎線維化では、Ror2 が MMP-2 の発現を誘導することが示されており、顎下腺の線維化においても同様の発現誘導機構が関与している可能性が示唆された。

以上の結果より顎下腺結紮によって誘起される線維化の過程で、各種線維化関連遺伝子の発現誘導とともに Ror1, Ror2, Wnt5a の発現が誘導される事が明らかとなった。免疫組織学的解析により、Ror2 は膠原繊維が豊富に蓄積している小葉間の線維性病変部や腺房細胞周辺の線維芽細胞様の細胞に検出されたことから、Ror2 が組織損傷応答として発現誘導され顎下腺線維化の進行に関与している可能性が示唆された。Ror1, Ror2, Wnt5a によるシグナル伝達がいかにして顎下腺の線維化を制御しているか、今後さらなる研究が必要である。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2744号	氏 名	高 端 大 希
論文題目 Title of Dissertation	Expression of Ror2 associated with fibrosis of the submandibular gland 顎下腺の繊維化に関連した Ror2 の発現		
審査委員 Examiner	主 査 丹生 健一 Chief Examiner 副 査 斎藤 浩人 Vice-examiner 副 査 和氣 弘明 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

## 【目 的】

顎下腺線維化に関連する Wnt5a-Ror シグナルについて、その生物学的意味について明らかにすることを目的に本研究を遂行した。

## 【方 法】

本研究では 8 週齢雄の C57/BL6 マウスを用いて実験を行った。吸入麻酔下にて頸部正中に切開線を加えて顎下腺、および顎下腺主導管であるワルトン管を割出した。右側顎下腺の顎下腺主導管を手術用絹糸にて結紮し、切開部を縫合した。

## 【結 果】

組織学的解析から結紮後 4 日目と 7 日目において拡張した導管の細胞と腺房細胞の萎縮が認められ、小葉間の間質に線維芽細胞様の細胞が多数認められた。一方、非結紮側と疑似手術顎下腺ではこれらの変化は認められなかった。次に線維芽細胞のマーカーであるビメンチンに対する抗体を用いて免疫組織染色を行った。その結果、小葉内および小葉間の間質においてビメンチン陽性細胞の蓄積が観察された。一方、非結紮側顎下腺におけるビメンチン陽性細胞はわずかしき認められなかったことから主導管結紮が線維芽細胞の蓄積をもたらしたことが示された。

アザン染色によって膠原繊維を検出した結果では、結紮後 4 日目と 7 日目において、線維芽細胞の蓄積と一致した小葉間の間質に膠原繊維の蓄積が認められた。一方、非結紮側顎下腺においては膠原繊維の蓄積は認められなかった。したがって、主導管結紮により顎下腺の線維性病変が誘起されることが示された。

主導管結紮後の顎下腺の *Ror1*, *Ror2*, *Wnt5a* の発現量を qRT-PCR 法にて比較した結果では、結紮後 4 日目と 7 日目の顎下腺において、それら全ての遺伝子発現が非結紮側と比べて有意に増加していることが示された。次に免疫組織学的解析によって *Ror2* の発現部位について検討した。結紮後 4 日目と 7 日目において小葉間間質の線維性病変部や腺房細胞の周囲に *Ror2* の顕著な染色が認められ、このような変化は非結紮側と疑似手術顎下腺では認められなかった。これらの結果より *Ror2* は結紮側顎下腺の線維化の進行に伴って発現誘導されることが示唆された。

顎下腺線維化の分子的基盤を明らかにするため線維化に関わる遺伝子発現のプロファイリングを行った結果では、様々な組織の線維化において重要な役割を果たしている *TGF-β1*, *TGF-β3* の発現が非結紮側と比較して結紮側顎下腺で亢進していることが確認された。また *TGF-β receptor II*, *TGFB-induced factor homeobox 1*, *Smad7*, *Serpine1*, *Ctgf*, *Snail1* といった *TGF-β* シグナルに関連する遺伝子の発現量の増加も認められており、*TGF-β* シグナルが顎下腺の線維化に関与していることが示唆された。さらに、炎症反応に関わる *IL-1β*, *TNF-α*、細胞外基質のリモデリングに関わる *Collagen type I*, *MMPs*、細胞接着に関わる *Integrin β8*, *Integrin αV*、増殖因子 *Platelet derived growth factor B*, *Hepatocyte growth factor* といった遺伝子の結紮側における発現量増加が認められた。次に結紮後 1 日目、4 日目、7 日目における *TGF-β1*, *TNF-α*, *IL-1β*, *MMP-2* の発現量について qRT-PCR 解析を行った。その結果、*TGF-β1* と *TNF-α*

は非結紮側と比較して結紮側顎下腺において結紮後 1 日目から有意な発現量の増加が認められ、結紮後 4 日目と 7 日目では更なる発現量の増加が認められた。*IL-1 $\beta$*  と *MMP-2* は結紮後 4 日目と 7 日目で有意な発現量の増加が認められた。*TNF- $\alpha$*  と *IL-1 $\beta$*  は骨格筋損傷モデルマウスにおいて *Ror1* と *Ror2* の発現を誘起することが知られており、線維化が進行している顎下腺においてこれらの炎症性サイトカインが *Ror1* と *Ror2* の発現誘導に関与している可能性が示唆された。またマウス尿管結紮によって誘起される腎線維化では、*Ror2* が *MMP-2* の発現を誘導することが示されており、顎下腺の線維化においても同様の発現誘導機構が関与している可能性が示唆された。

#### 【考 察】

以上の結果より顎下腺結紮によって誘起される線維化の過程で、各種線維化関連遺伝子の発現誘導とともに *Ror1*, *Ror2*, *Wnt5a* の発現が誘導される事が明らかとなった。免疫組織学的解析により *Ror2* は膠原繊維が豊富に蓄積している小葉間の線維性病変部や腺房細胞周辺の線維芽細胞様の細胞に検出されたことから、*Ror2* が組織損傷応答として発現誘導され顎下腺線維化の進行に関与している可能性が示唆された。

本研究は、顎下腺線維化に関連する *Wnt5a*-*Ror* シグナルについて、その生物学的意味について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった、*Ror2* 発現と顎下腺線維化との関連について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。