



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

頸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

頸下腺は大唾液腺の一つであり、食物の消化、抗菌、口腔内の湿润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頸下腺の機能異常は 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頸下腺の機能異常のメカニズムは不明な点が多い。今回我々は頸下腺主導管の片側結紩により頸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す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頸下腺、および頸下腺主導管であるワルトン管を剖出した。右側頸下腺の頸下腺主導管を手術用糸にて結紩し、切開部を縫合した。コントロールは非結紩側、ならびに疑似手術頸下腺を用いた。

マウスの頸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、結紩後 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。結紩後 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、非結紩側と疑似手術頸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、非結紩側頸下腺におけるビメンチン陽性細胞はわずかしか認められなかつたことから、主導管結紩が線維芽細胞の蓄積をもたらしたことが示された。

次に我々は頸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纖維を検出した。その結果、結紩後 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纖維の蓄積が認められた。一方、非結紩側頸下腺においては、膠原纖維の蓄積は認められなかつた。したがって、主導管結紩により頸下腺の線維性病変が誘起されることが示された。

Wnt5a-Ror シグナルが頸下腺の傷害応答に関与する可能性を検討するために、主導管結紩後の頸下腺の 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、結紩後 4 日目と 7 日目の頸下腺において、それら全ての遺伝子発現が非結紩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、結紩の有無や結紩期間に関わらず 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つた。一方、結紩後 4 日目と 7 日目において、小葉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紩側と疑似手術頸下腺では認められなかつた。これらの結果より、Ror2 は結紩側頸下腺の線維化の進行に伴つて発現誘導されることが示唆された。

頸下腺線維化の分子的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つた。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- β 1, TGF- β 3 の発現が

非結紮側と比較して結紮側頸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 シグナルが頸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 β , 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 β 8, Integrin α 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- β 1, TNF- α , IL-1 β , MMP-2 の発現量について qRT-PCR 解析を行った。その結果、TGF- β 1 と TNF- α は非結紮側と比較して結紮側頸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 β 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- α と IL-1 β 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頸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、頸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。

以上の結果より頸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 は膠原纖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頸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頸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	<p>Expression of Ror2 associated with fibrosis of the submandibular gland 頸下腺の線維化に関連した Ror2 の発現</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner 井上 伸一 副査 Vice-examiner 寺田 博人 副査 Vice-examiner 木村 伸介</p>		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

【目的】

頸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頸下腺、および頸下腺主導管であるワルトン管を剖出した。右側頸下腺の頸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頸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、非結紮側頸下腺におけるビメンチン陽性細胞はわずかしか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纖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纖維の蓄積が認められた。一方、非結紮側頸下腺においては膠原纖維の蓄積は認められなかった。したがって、主導管結紮により頸下腺の線維性病変が誘起されることが示された。

主導管結紮後の頸下腺の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日目の頸下腺において、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頸下腺では認められなかった。これらの結果よりRor2は結紮側頸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。

頸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- β 1, TGF- β 3の発現が非結紮側と比較して結紮側頸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 シグナルが頸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 β , 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 β 8, Integrin α 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。次に結紮後1日目、4日目、7日目におけるTGF- β 1, TNF- α , IL-1 β , MMP-2の発現量についてqRT-PCR解析を行った。その結果、TGF- β 1とTNF- α

は非結紮側と比較して結紮側頸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 β* 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- α* と *IL-1 β* 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頸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、頸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】

以上の結果より頸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頸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、頸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* 発現と頸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。