

論文名 : Effects of C-xylopyranoside derivative on epithelial morphogenesis in an organogenesis model of oral mucosa

新潟大学大学院医歯学総合研究科

氏名 上野山 敦士

(要約)

培養口腔粘膜 (EVPOME) 臨床応用プロトコールでは、作成に万全を期しても薄い上皮しか形成されず、移植に適さない“不良品”が作成されることが現状では避けられない。これを移植した場合には、上皮細胞が分泌する創傷治癒促進成長因子の産生量が低下し、移植後創傷治癒に支障をきたすため、“不良品”の早期発見と発生予防が EVPOME 品質管理のカギとなる。現在はグルコース消費量測定のみで品質管理が行われているが、早期発見のより有効な手段の開発は遅れている。そこで私は EVPOME の品質向上のため、“不良品”の発生を抑え、予防する有効な手段として薬理的なアプローチを検証した。皮膚・口腔粘膜上皮の菲薄化は加齢に伴うプロテオグリカン (PG) 含有量の減少と相関するといわれている。PG は硫酸化多糖であるグリコサミノグリカン (GAG) がコア蛋白質に共有結合した糖蛋白で、細胞外基質の主要な構成成分として組織構築に重要な役割をもつと同時に、近年 GAG は多くの増殖因子や細胞接着分子と結合し、様々な細胞機能を調整することも分かってきた。本研究はグリコシルトランスフェラーゼ阻害剤で、GAG 合成を促進するとされる C 配糖体的一种である β -D-xylopyranoside-n-propane-2-one (XPP) を培地に添加し、3次元口腔粘膜培養モデルを用いて上皮の再生・形態形成を分析し、培養口腔粘膜の品質保証/管理における有効性を検証した。

十分なインフォームドコンセントを得た患者から採取した歯肉から上皮細胞と線維芽細胞を単離し、それぞれを 0.06mM Ca^{++} と 1.2mM Ca^{++} 含有無血清培地 (EpiLife)、および 10% ウシ胎児血清 (FBS) 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) で単層培養した。実験はまず、各培地に 2, 10mM の XPP を加え、各細胞を 24、48 時間単層培養し、細胞の代謝活性と培地中に放出された硫酸化 GAG(s-GAG)量を測定した。代謝活性はいずれの培養条件でも対照に対して有意差は認めず、2, 10mM の XPP に細胞毒性がないことが示された。さらに s-GAG 量は、1.2mM Ca^{++} EpiLife で培養した上皮細胞で有意に産生量が増加していた。次に、3次元培養口腔粘膜モデル (3DOMM) に 2, 10mM の XPP を添加して培養を行った。作成した 11 個の試料で、組織学的分析と各種タンパクの発現解析を行い、培養上清も回収した。組織学的観察ではいずれの 3DOMM も錯角化を伴う重層扁平上皮が形成されており、XPP が上皮の重層化や分化に影響を及ぼさないことが示唆された。一方、形成された上皮は統計学的有意差には至らなかったものの、明らかに 2, 10mM の XPP を添加した 3DOMM で厚みが増していた。また 11 サンプル中、XPP 添加群の上皮厚さの最小値が対照に比べ増加しており、上皮の菲薄化が抑えられていた。そして特筆すべきことは、2mM の XPP で作成した 3DOMM は、形成された上皮の厚さのばらつきが非常に小さく

【別紙2】

なっていた。しかしながら、10mMのXPPで作成した3DOMMにこの傾向は見られなかった。さらに上清中に放出されたs-GAG量は、XPP添加群の3DOMMで有意に増加しており、上皮の厚さの増加との関連が示唆された。最後に、こうした上皮形態形成に変化をもたらすメカニズムを解明する手がかりとして、細胞接着因子を含む上皮基底膜マーカータンパク(IV型コラーゲン、ラミニン、ニドゲン、インテグリン $\alpha 6$ および $\beta 1$)、プロテオグリカン(デコリン、シンデカン、CD44)、細胞の増大やタンパク合成に関わるAkt/mTORシグナル経路(Akt, S6K, S6)に注目し、それらに関するタンパクの発現量を免疫ブロッティングで、組織学的局在について免疫組織化学的手法で解析を進めた。免疫ブロッティングの結果から、検索したタンパクのうちラミニン、インテグリン $\beta 1$ 、S6を除くすべてで10mMのXPP添加により作成した3DOMMは対照と比較して、1.5倍以上の発現の増加が認められた。一方、2mMのXPPを添加した3DOMMでは、対照と比較してその発現が1.5倍増加したタンパクは、インテグリン $\alpha 6$ 、CD44、Akt、S6Kのみで、その他のタンパクで顕著な増加は認められなかった。また、これらのタンパクの局在に異常と考えられる所見はなく、その発現量は免疫ブロッティングの結果と一致していた。

以上から、2mMのXPPを培地に添加して3DOMMを作成すると、培養口腔粘膜で形成される上皮の厚みが増加し、ばらつきを減少させると同時に薄い上皮形成も抑制し、上皮形態形成の改善に寄与していた。すなわち、2mMのXPPによる薬学的アプローチは、規格外製品の発生予防に効果があることで培養口腔粘膜製品間格差を是正し、3DOMMにおける品質向上につながるため、現行の培養口腔粘膜作成プロトコールへ応用可能であることが示唆された。これにはs-GAG産生量の増加が大いに関連し、それに伴うインテグリン $\alpha 6$ 、CD44の発現増加による上皮の質の向上やAkt/mTOR経路の活性化による細胞の生存促進効果が考えられるが、10mMのXPPの添加では、主な上皮基底膜マーカータンパクやプロテオグリカンの発現が2mMを添加した3DOMMより増加していたにも関わらず、上皮形態形成の改善が2mM程顕著ではなかったことから、さらにその原因とメカニズムを追究していく必要がある。