

Title	Localization and expression patterns of TRP channels in submandibular gland development
Author(s)	藤関, 元也
Journal	歯科学報, 118(2): 144-145
URL	http://hdl.handle.net/10130/4512
Right	
Description	

氏名(本籍)	藤 関 元 也 (東京都)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第 2144 号(甲第 1349 号)
学位授与の日付	平成28年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Localization and expression patterns of TRP channels in submandibular gland development
掲載雑誌名	Archives of Oral Biology 第74巻 46-50頁 2017年 doi : 10.1016/j.archoralbio.2016.09.011
論文審査委員	(主査) 井上 孝教授 (副査) 田崎 雅和教授 山本 仁教授 新谷 誠康教授 橋本 貞充教授

論文内容の要旨

1. 研究目的

Transient receptor potential (TRP) チャンネルは化学的・物理的刺激の受容に関与する多機能性のチャンネルであり、このチャンネルは成獣の多くの臓器で発現するほか、発生初期の臓器にも発現することが示されている。ラット成獣の唾液腺においても温度感受性 TRP が発現し、唾液の形成や分泌に関与することが示唆されている。ラット唾液腺は発生初期に唾液腺を構成する細胞が分化することによって、成獣の唾液腺を構成する細胞になる、つまり発生初期に顎下腺を構成する細胞群と、成獣における顎下腺を構成する細胞群とは異なる細胞であることが報告されている。そこで発生初期のラット顎下腺を構成する細胞群について、その細胞分化に関わる因子について明らかにするために、胎生18日 (E18)、20日 (E20)、生後0日 (PN0)、5日 (PN5)、28日 (PN28) のラット顎下腺を用いて、成獣において発現が確認されている TRP melastatin (TRPM) 8, TRP vanilloid (TRPV) 3, TRPV 4 および、唾液の分泌に関与するとされている TRP canonical (TRPC) 1 の発現を real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) と免疫組織化学染色を用いて検索した。

2. 研究方法

実験動物として、唾液腺の初期発生から細胞分化が生じる時期である胎生 (E) 18日、20日、生後 (PN) 0日、5日と、唾液腺を構成する細胞が発生初期に構成する細胞から分化して形態的成熟が完了している PN28 の Wistar ラット各8匹 (RT-PCR 用として各5匹、組織観察用として各3匹、合計40匹) を用い、顎下腺を観察対象として、RT-PCR と、各 TRP チャンネルの抗体を用いた組織免疫化学染色を行った。

3. 研究成績および結論

RT-PCR では E18 において TRPM 8, TRPV 4, TRPC 1 はすでに発現していたが、TRPV 3 ではほとんど発現していなかった。この後、TRPM 8, TRPV 3 は日齢と共に発現量が増加し、PN5 で最高値を示した。一方、TRPV 4 と TRPC 1 の発現量は E18 と比較して、E20 で増加するが、PN0 で一度減少し、PN5 で有意に増加した。また観察したすべての TRP の発現量は PN28 において PN5 よりも大幅に減少した。免疫組織化学染色では、今回観察したすべての TRP チャンネルの抗体に発生初期の顎下腺の大部分を構成する管状をなす細胞群が免疫陽性反応を示したが、RT-PCR で各 TRP の発現量をもっとも大きかった PN5 において、特に抗 TRPM 8 抗体や抗 TRPV 3 抗体に対して、管状の細胞群の端部に形成された大型の細胞が強い陽性反応を

示す一方、抗 TRPC 1 抗体に対しは導管が強い免疫陽性反応を示した。

以上の結果から、成獣の唾液腺で発現した TRP チャンネルが、成獣の顎下腺と全く異なる細胞群からなる発生初期の顎下腺にも発現することが示され、その発現状況から、この時期に発現する TRP チャンネルは発生初期の細胞群から成獣で観察される細胞群への細胞分化、特に PN 5 前後に生じる腺房への分化に強く関与することが示唆された。

論文審査の要旨

Transient receptor potential (TRP) チャンネルは化学的・物理的刺激の受容に関与する多機能性のチャンネルであり、これまでの研究で、このチャンネルは成獣において多くの臓器で発現するほか、発生過程の臓器においても発現することが報告されている。近年、成獣ラット唾液腺に TRP チャンネルの発現が確認され、TRP チャンネルが唾液の形成や分泌に関与することが示唆されている。一方、発生初期に唾液腺を構成する細胞群が分化し、成獣の唾液腺を構成する細胞群となるので、発生初期の唾液腺を構成する細胞群は、成獣の唾液腺を構成する細胞とは異なることが報告されているが、その分化に関わる因子については不明な点が多い。そこで胎生 (E) 18日、20日、生後 (PN) 0日、5日、28日のラット顎下腺を材料として、成獣の唾液腺で発現した TRP melastatin (TRPM) 8, TRP vanilloid (TRPV) 3, TRPV 4 および、TRP canonical (TRPC) 1 について、real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) と免疫組織化学染色により検索した。その結果、RT-PCR では、PN 5 の TRPV 4, TRPC 1 の発現が E18, PN 0, PN 28 と比較し有意に高かった。またこの時期の免疫組織化学染色では抗 TRPM 8 抗体、抗 TRPV 3 抗体、抗 TRPV 4 抗体に対して管状の細胞群の端部に形成された大型の細胞に、抗 TRPC 1 抗体に対しは導管に強い免疫陽性反応が観察された。以上の結果から発生初期のラット顎下腺に発現した TRP チャンネルは、発生初期の唾液腺を構成する細胞から成獣の唾液腺を構成する細胞への分化に関与することが示唆された。

本審査委員会では 1. 各 TRP チャンネルを選んだ理由、2. 実験に用いた各日齢を選んだ理由、3. TRP の発現について Laser microdissection (LMD) 法を用いなかった理由、などについて質問があった。これらの質問に対して 1. 本研究で選択した TRP チャンネルは成獣ラットにおいて存在が確認されており、唾液腺の機能の発現に関与していると考えられているほか、他の臓器の発生や細胞分化に関与していることが示唆されているので、本研究に用いることが有用と考えた、2. 本研究で観察した E18日、E20日、PN 0日、PN 5日、PN 28日は、それぞれ E18が顎下腺を構成する細胞が分泌型の細胞形態を示す時期、P20が細胞内に観察される分泌顆粒の性状が変化するとともに、線条部導管が分化を開始する時期、PN 0が出生直後で外的刺激を受け始める時期、PN 5がそれまでの顎下腺の大部分を占めていた管状をなす細胞群の末端で細胞の分裂と分化が起こり、かつ線条部導管の機能的成熟が起こる時期、PN 28が腺房細胞が機能的な成熟を終える時期である。これらの時期は細胞に大きな変化が生じており、細胞分化を観察するうえで重要な時期に相当すると考えたため、3. LMD 法を行ったが、RT-PCR に必要な RNA 量の採取が困難であったため組織単位で RT-PCR を行った、との回答があった。またタイトルを含めた英語表記、えられた所見に基づいた考察の表記、文献の表記、図表の構成などについて指摘があり、訂正が行われた。

本研究で得られた結果は、今後の歯学の進歩、発展に寄与するところ大であり、学位授与に値するものと判定した。