

20020739

厚生労働科学研究費補助金

特定疾患対策研究事業

涙腺の分化増殖機構の解明と再生医療への応用

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 坪田一男

平成15（2003）年3月

目 次

I. 総括研究報告

涙腺の分化増殖機構の解明と再生医療への応用 ----- 1

坪田一男

II. 分担研究報告

涙腺・唾液腺分化・増殖機構の解明に関する研究----- 9

斎藤一郎

厚生労働科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）

総括研究報告書

涙腺の分化増殖機構の解明と再生医療への応用

主任研究者 坪田一男 東京歯科大学眼科教授

研究要旨

スティーブン・ジョンソン症候群やシェーグレン症候群などにより消失または著しく傷害された涙腺の機能を回復することが本研究の目的である。涙腺細胞に効率よく増殖・分化を誘導する因子を同定するとともに、同定された因子を用いて *in vitro* で幹細胞より分化誘導した涙腺の構成細胞を移入することによりその機能の回復をはかる。本年度は本研究の初年度に当たり実験が継続中であるが、これまでに得られた知見を以下に示す。

- 1) 涙腺・唾液腺特異的にプロラクチン(PRL)を高発現するトランスジェニックラット(PRL-TG)を用いた解析で、PRL が涙腺・唾液腺の放射線傷害の修復に関与していることが明らかになった。
- 2) 涙腺の増殖・分化誘導因子を同定するために p53^{-/-}マウスより涙腺(ML)および唾液腺細胞株(MSG)を樹立した。
- 3) MSG を用いた実験によりアンドロジェンが cAMP-PKA-CREB 経路を介して分化を誘導する機構が明らかになった。
- 4) ML における遺伝子発現プロファイルを serial analysis of gene expression (SAGE)法により作成し胚性幹細胞 (ES 細胞) の遺伝子発現プロファイルと比較することにより涙腺特異的に分化を誘導する候補遺伝子を統計学的に解析した。
- 5) SAGE 法により作成された ML における遺伝子発現プロファイルと MSG における遺伝子発現プロファイルを比較し、涙腺特異的に発現する遺伝子を統計学的に解析した。
- 6) FACS (自動細胞分離装置：フローサイトメーター) を用いてマウス涙腺組織より組織幹細胞として知られる side population cell (SP 細胞) を採取し、*in vitro* で培養可能なことを確認した。

分担研究者 齋藤一郎 鶴見大学歯学部教授

A. 研究目的

自己組織再生の検討は種々の疾患や障害などにより喪失した組織を人為的に構築し、その生理的機能を回復させる事を目的に行われており、従来の対症療法的な薬剤や不完全な人工臓器、免疫学的拒絶反応を生じる移植臓器などにかわる画期的な治療の一つと考えられる。この分野の急速な進歩は、最近の発生学や分子生物学の知見に支えられ、形態形成を司る遺伝子の発見や細胞増殖を誘導する因子の同定により、3次元的な再構築が可能になろうとしているが、涙腺をはじめとする外分泌腺での知見は極めて少ない。このことは腺組織由来の適切な細胞株が少ないことに起因しており、涙腺においてもその増殖や分化を制御する因子の同定や組織形成に至るプロセスを実験的に把握するための腺細胞株の樹立が望まれている。この目的に基づき単一遺伝子の欠損で不死化が誘導可能で、比較的正常な機能・形態を備えた不死化涙腺細胞株を p53^{-/-}マウスから樹立することに成功した。樹立した涙腺細胞株は腺組織の再生能を

解析する上で有用なモデル細胞と考えられる。また、乳汁分泌促進をはじめ外分泌腺の分化・増殖にきわめて関連の深い因子の一つとして知られるプロラクチンを介した涙腺の再生機構を解明するために、プロラクチン遺伝子を涙腺などの外分泌腺に特異的に発現させたトランスジェニックラットを作出しその機能を解析する。これらの結果より得られた知見を応用することにより涙腺組織幹細胞や胚性幹細胞 (ES 細胞) より涙腺細胞の分化を誘導する。さらに本研究では、p53 欠失マウスから樹立した涙腺細胞株の発現遺伝子プロファイルを作成し、胚性幹細胞 (ES 細胞) や組織幹細胞 (tissue stem cell) の発現遺伝子プロファイルと比較することにより、涙腺の再生に関わる特異的な遺伝子を同定する。また、これらの因子を ES 細胞あるいは患者本人より採取された組織幹細胞に作用させることにより、病的に消失した涙腺組織の再生を行う。

B. 研究方法

1. プロラクチン発現トランスジェニックラット(PRL-TG)の作出

涙腺・唾液腺局所にプロラクチン遺伝子を発現させるため、parotid secretory proteinのプロモーターである Lama6 を用い、この下流にラットプロラクチン遺伝子をつなぎ TG の遺伝子を構築した。

2. PRL-TG における涙腺・唾液腺放射線障害後の修復能の検討

上記で作成した TG の涙腺・唾液腺に 15Gy の放射線照射を行う。コントロールの放射線照射を行った正常ラットと比較検討を行う。

3. p53^{-/-}マウスより涙腺細胞株(ML)および唾液腺細胞株(MSG)の樹立

p53^{-/-}マウスより涙腺および唾液腺を採取し酵素処理により細胞を分散した後、EGF および下垂体ホルモンを含んだ serum free keratinocyte medium で培養し細胞株を樹立した。

4. 涙腺特異的分化誘導因子の同定

p53 欠損マウスより樹立された涙腺細胞 (ML) における発現遺伝子プロファイルを serial analysis of gene expression (SAGE)法により作成す

る。さらに、この data をすでに homepage 上で公開されている ES 細胞の発現遺伝子プロファイルと比較し、統計学的解析を行い、涙腺特異的に分化を誘導する候補遺伝子を選択する。また、これまで涙腺と唾液腺は発生学的あるいは組織学的に非常に類似した組織と考えられ特異的なマーカー分子の報告はない。そこで、p53^{-/-}マウスの唾液腺から樹立された唾液腺細胞の発現遺伝子プロファイルを涙腺と同様な方法により作成し、涙腺細胞株の発現遺伝子プロファイルと比較することにより、涙腺特異的に発現している遺伝子を同定する。

5. 組織幹細胞の同定

肝臓をはじめ多くの臓器で特異的なマーカー分子を利用した幹細胞の単離が可能となったが、これまで涙腺特異的な幹細胞のマーカー分子に関する報告はなく、幹細胞の単離は困難と考えられていた。最近になり ES 細胞、造血幹細胞、組織幹細胞に共通して ATP binding cassette (ABC) transporter の発現が報告され、幹細胞マーカーとして利用が可能と考

えられる。ABC transporter を有する細胞は色素排除能を有し Hoechst3342 で処理しても染色されない細胞群 (side population, SP 細胞) として検出されることが報告されている。この方法は、涙腺にも応用が可能で、具体的には、マウスより採取した涙腺を酵素処理し細胞を分散した後 Hoechst3342 により染色し、FACS Vantage (自動細胞分離装置:フローサイトメトリー) により Hoechst3342(-)分画を sorting する。

(倫理面への配慮)

厚生労働省による「遺伝子解析研究に付随する倫理問題に対応するための指針」に従い、研究計画書、同意文書を作成し、大学の倫理審査委員会で検討を始めている。具体的には、個人情報保護のため個人情報を外部に持ち出さず、資料を匿名化し、管理担当者を当大学に設置する。倫理委員会の審査に従った同意説明を行い、提供者の自由意志に基づくインフォームドコンセントを得る。資料の廃棄、遺伝子解析結果の開示については、提供者の意志を尊重する。

C. 研究結果

1. PRL-TG を用いた解析

作出された PRL-TG における導入遺伝子発現は、耳下腺や涙腺組織で認められ、顎下腺や肺、肝臓などに明らかな発現は認められなかった。次に、PRL-TG ラットはノン TG ラットと比較すると、唾液分泌量の亢進を認めた。更に、このラットに放射線を 15Gy 照射し、放射線障害後の分泌能の賦活化を検討したところ、照射後 3 週間までは PRL-TG、ノン TG 共に著しい分泌量の低下を示したが、その後、PRL-TG では徐々に唾液分泌量が亢進し、照射後 16 週では未照射のラットと同等な分泌量に回復した。また、ヒト唾液腺由来細胞株である HSY を用いた in vitro における解析ではプロラクチンの作用は cAMP-PKA-CREB 経路を介していることが示唆された。

2. p53^{-/-}唾液腺細胞株(MSG)を用いた解析

唾液腺の形態形成を促進させると報告がある性ホルモンのアンドロジェンを添加したマトリジェル上で MSG を培養すると、著明な branching が

認められ、inhibitor を用いた解析によりこの branching が cAMP-PKA-CREB を介していることが明らかとなった。現在 ML をもちいて同様の解析を行っている。

3. 涙腺特異的な分化誘導因子の同定

SAGE 法により作製された ML、MSG、における発現遺伝子プロファイルと既に公開されている ES 細胞の発現遺伝子プロファイルを比較し統計学的な解析を行っている。

4. SP 細胞の単離

6 週齢の C57/BL6 マウス♂の涙腺より SP 細胞を採取した。また、これらの細胞は ABC transporter の阻害剤であるレセルピンにより色素排除能が阻害されていることが確認された (図 1)。

Reserpine(+)

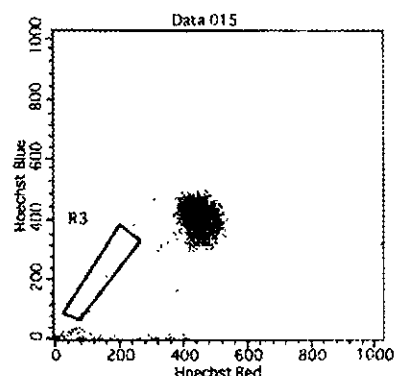


図 1 FACS を用いた涙腺 SP 細胞の同定

採取した細胞は培養可能で、広い細胞質を有する上皮様の細胞が認められた (図 2)。

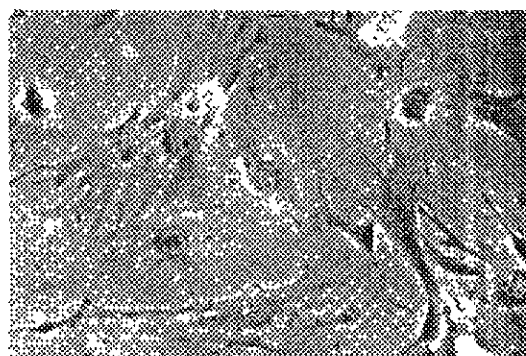
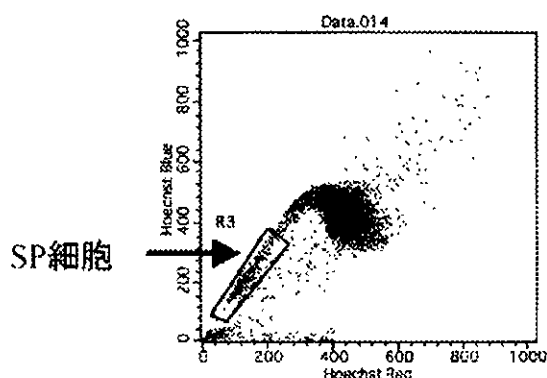


図 2 涙腺 SP 細胞の形態学的観察

今後増殖能を維持したまま長期にわたり培養可能な条件について解析するとともに、これまで報告されている幹細胞のマーカ分子の発現についても解析を行う予定である。

Reserpine(-)



D. 考察

本研究では PRL-TG および p53^{-/-} マウスより樹立された細胞株 (ML、MSG) を用いた解析により、プロラクチンやアンドロジェンが涙腺の分化増殖を誘導可能な因子であることが明らかとなった。また、これらの因子の下流には cyclicAMP-PKA-CREB を介した経路が存在していることが示唆された。これまでの報告により cyclic AMP (cAMP) を介する細胞内情報伝達経路は、細胞外シグナルに呼応した涙液の分泌調節機構として知られている。転写因子 cyclic AMP-responsive-element binding protein (CREB) は cAMP 依存性プロテインキナーゼ (cAMP-dependent protein kinase : PKA) の活性化によりリン酸化され、cAMP 応答配列 (cAMP-response element : CRE) と呼ばれる特定の塩基配列に結合することにより、CRE を転写調節領域にもつ遺伝子の発現を正に調節する転写因子である。腺上皮細胞の基底膜には副交感神経のアセチルコリン受容体 (ムスカリン受容体)、交

感神経のカテコールアミン α 、 β 受容体が存在しており、自律神経系の興奮によって、その化学伝達物質がこれらの受容体と結合すると、アセチルコリン受容体および α 受容体は細胞内の遊離 Ca^{2+} を増量、 β 受容体は細胞内 cAMP の生成を促し、これらの物質がセカンドメッセンジャーとして働き分泌能の亢進など種々の機能の発達を促すとされている (図3)。

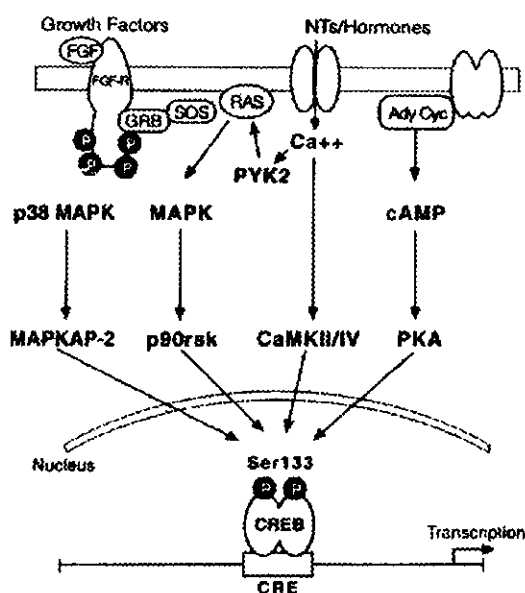


図3 CREB を介した細胞内伝達経路
各種ホルモン (プロラクチン、エストロジェン、ACTH など) の腺上皮細胞における分化・増殖促進作用も同様に cAMP を介して行われ、cAMP は重要なセカンドメッセンジャーであると考えられており、腺組織の分

化・増殖機構に重要な役割を担っている可能性が大きい。今後、これらの経路を詳細に検討することにより涙腺組織再生のメカニズムを把握する予定である。これらの解析により得られた知見は、本研究の最終的な目的である涙液の分泌障害を有する患者の治療へ応用することが可能である。すなわち、これらの知見を用いて、患者本人の涙腺より得られた幹細胞あるいはES細胞よりin vitroで涙腺細胞を分化誘導し、患者の涙腺組織に移入する。また、現在解析が継続されているSAGE法により得られた情報を応用することによりES細胞より涙腺細胞を分化させることが可能であり、発生学的にも多くの知見を得ることが可能と考えられる。しかしながら、臨床応用を考えて場合拒絶反応の克服や倫理的な問題を残している。一方、今回、我々が、涙腺組織幹細胞として同定したSP細胞はこれまで骨髄、筋肉、肝臓および中枢神経で分離されており、特に骨髄のSP細胞は造血細胞に分化するのみならず、骨格筋、心筋、血管内皮への分化能を有していることが報

告されている。組織幹細胞を用いる利点としては患者本人より採取することが可能で、in vitroで増殖分化誘導後、患者本人に移入することで、拒絶反応や倫理的な問題を回避することができる。しかしながら、in vitroで組織幹細胞に効率的に増殖を誘導する方法は確立されておらず、さらに検討が必要である。

本研究は、再生医療により涙腺機能障害を持つ患者の治療のみならずin vitroで作製された涙腺細胞は生理的条件に近い人工涙液の供給源として応用が可能である。

E. 結論

本研究により、プロラクチンおよびアンドロジェンが細胞内のcAMP-PKA-CREBを介し涙腺の組織再生に関与していることが明らかとなった。また、涙腺組織幹細胞としてSP細胞の存在が確認された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし。

2. 学会発表

1) 山田耕一. 唾液腺の分泌・再生能における転写因子 CREB の役割. 第7回シェーグレン症候群市川セミナー. 2002年

2) Tsubota K, Yamada K, Saito I. Enhanced lacrimation and salivation by cyclic AMP through phosphorylation of CREB (ser 133) in prolactin transgenic rats. The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Annual Meeting, 2002年.

3) Yamada K, Tsubota K, Saito I. Enhanced lacrimation and salivation in prolactin transgenic rats. 第8回国際シェーグレン症候群シンポジウム. 2002年

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特願 2002-313579 「プロラクチンを含む外分泌腺組織からの分泌促進剤およびプロラクチン遺伝子が導入されたトランスジェニック動物」

涙腺・唾液腺分化・増殖機構の解明に関する研究

分担研究者 齋藤一郎 鶴見大学歯学部教授

研究要旨

本研究では、乳汁分泌促進をはじめ外分泌腺の分化・増殖にきわめて関連の深い因子の一つとして知られるプロラクチンを介した涙腺の再生機構を明らかにする目的で、parotid secretory protein (PSP)の promoter である Lama6 の下流にプロラクチン遺伝子を結合した遺伝子を構築し、涙腺・唾液腺特異的にプロラクチン(PRL)を発現するトランスジェニックラット (PRL-TG) を作出した。PRL-TG は正常ラットと比較し涙液および唾液量が亢進していた。また、涙腺および唾液腺に放射線照射を行った後、唾液・涙液量の変化を経時的に測定したところコントロールラットでは著しく減少していたが、PRL-TG では32週で回復した。さらに、PRLの *in vitro* における機能を明らかにするため、ヒト唾液腺細胞株 (HSY) を PRL で刺激するとアミラーゼの発現亢進と転写因子 CREB のリン酸化が誘導された。次に、さらに詳細な検討を行うため比較的正常に近い性質を有する単一遺伝子の欠損を有する p53^{-/-}マウスより樹立された涙腺・唾液腺細胞株を樹立した。これらの細胞株はアンドロジェン添加マトリジェル上で培養すると branching が促進され、この branching は MEK インヒビターによって部分的に、PKA インヒビターにより完全に抑制された。また、これらの細胞を forskolin で刺激するとリン酸化 CREB が検出され、このリン酸化は PKA インヒビターで抑制され、MEK インヒビターでは抑制されなかった。以上の結果より、プロラクチンおよびアンドロジェン刺激において CREB のリン酸化が誘導されることが確認され、涙腺・唾液腺の分化にはこれまで報告されていた MAP kinase を介した経路以外に cAMP-PKA-CREB より成る経路の関与が示唆された。

A. 研究目的

我々は現在までに涙腺・唾液腺の組織破壊を示す臓器特異的自己免疫疾患の病因ならびに病態の形成機序の解

明を積極的に行ってきた。これらの一連の研究を通して、外分泌腺の組織破壊の機序やその要因が明らかとなり、これらの結果に基づいた治療法と診

断法の実用化を行ってきた。しかしながら、上記のように障害された組織の修復の手段は乏しく、組織の再生や機能の回復を目的とした研究は少ない。このことから、我々が現在まで積極的に行ってきたシェーグレン症候群の病態解析の経験と実績に基づき、損傷された腺組織の機能回復を目指した組織の再生機構の解明を行う。本研究では、乳汁分泌促進をはじめ外分泌腺の分化・増殖にきわめて関連の深い因子の一つとして知られるプロラクチンを介した涙腺の再生機構を解明するために、プロラクチンを涙腺・唾液腺組織特異的に高発現するトランスジェニックラットを作出し解析を行った。また、p53^{-/-}マウスの唾液腺より樹立された涙腺・唾液腺細胞株を用いて涙腺の分化・増殖機構の解明を行った。

A. 研究方法

1) プロラクチン発現トランスジェニックラット(PRL-TG)の作出

1) 涙腺・唾液腺局所にプロラクチン遺伝子を発現させるため、parotid secretory protein のプロモーターで

ある Lama6 を用い、これにラットプロラクチン遺伝子をつなぎ TG を作出した (図 1)。

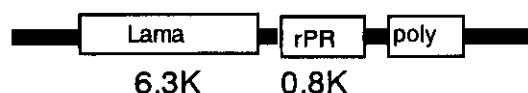


図 1 導入遺伝子の構築図

2) 涙液・唾液分泌障害ラットの作成

上記で作成した TG の涙腺・唾液腺に 15Gy の放射線照射を行う。コントロールの放射線照射を行った正常ラットと比較検討を行う。

3) p53^{-/-}マウスより涙腺細胞株(ML)および唾液腺細胞株(MS)の樹立

p53^{-/-}マウスより涙腺および唾液腺を採取し酵素処理により細胞を分散した後、serum free medium で培養を行い細胞株を樹立した。

A. 研究結果

作出された PRL-TG ではプロラクチン発現が耳下腺や涙腺組織で認められたが、顎下腺や肺、肝臓などに明らかな発現は認められなかった (図 2)。

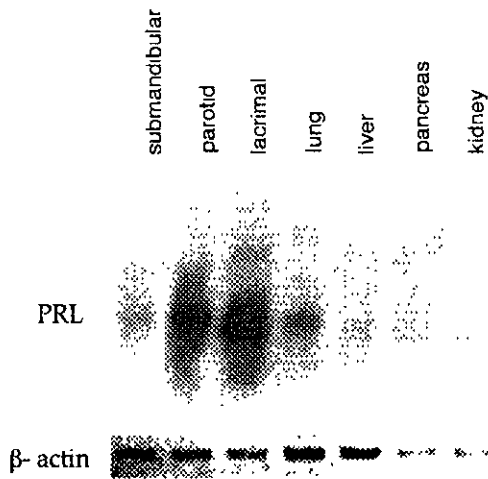


図2 ノーザンプロット法を用いた導入遺伝子発現の確認

次に、PRL-TG はノン TG と比較すると、唾液分泌量の亢進を認めた。更に、PRL-TG に放射線を 15Gy 照射し、放射線障害後の分泌能の賦活化を検討したところ、照射後 3 週間までは PRL-TG、ノン TG 共に著しい分泌量の低下を示したが、その後、PRL-TG では徐々に唾液分泌量が亢進し、照射後 16 週では未照射のラットと同等な分泌量に回復した (図 3)。

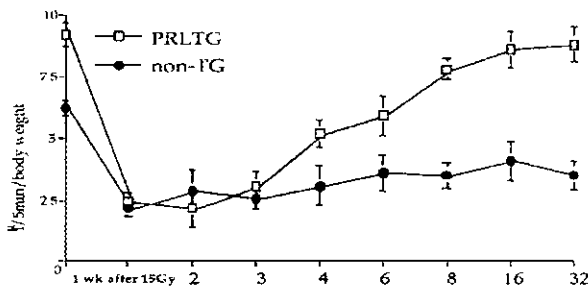


図3 涙液量と唾液量の測定

次にヒト唾液腺細胞株 (HSY) を用いてプロラクチンの分泌能に与える影響を検討した。プロラクチン 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を HSY 培養上清に添加し、分泌能の指標である唾液アミラーゼを検出したところ、添加 30 分後で明らかなアミラーゼタンパクの発現が検出された (図 4)。

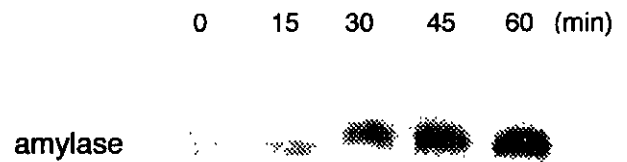


図4 プロラクチン刺激によるアミラーゼ蛋白発現

これまでの報告により、cAMP を介した経路が涙腺・唾液腺の分化に関与している可能性が考えられ、その下流に位置している転写因子の一つである CREB のリン酸化が検出されるか否かを検討した。HSY にプロラクチンを添加後 10 分でリン酸化 CREB が認められ経時的に増強することがみられた (図 5)。

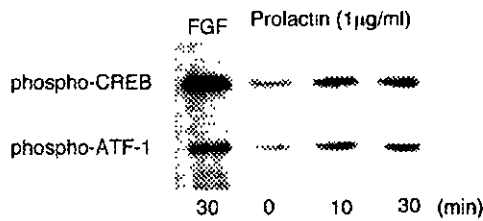


図5 プロラクチン刺激によるのリン酸化 CREB の検出

従って、プロラクチンによる唾液分泌能と PRL-TG における腺組織の再生機序に転写因子 CREB の関与が示唆された。

次に、我々は p53^{-/-}マウスより樹立した涙腺 (ML) および唾液腺細胞 (MSG) を用いて分化経路に関する詳細な検討を行った。これらの細胞はケラチン陽性で、マトリジェル上で培養するとリゾチームおよびアミラーゼ陽性を示した。また、電子顕微鏡にて形態学的特徴を検討した結果、マトリジェル上での培養により分泌顆粒の産生が認められた。従って、これらの細胞株は涙腺・唾液腺の上皮細胞であり、分泌細胞への分化能を有すると考えられた (図 6、7)。これらの細胞を用いて涙腺・唾液腺の形態形成を促進させると報告されている因子についてその機能を解析した。

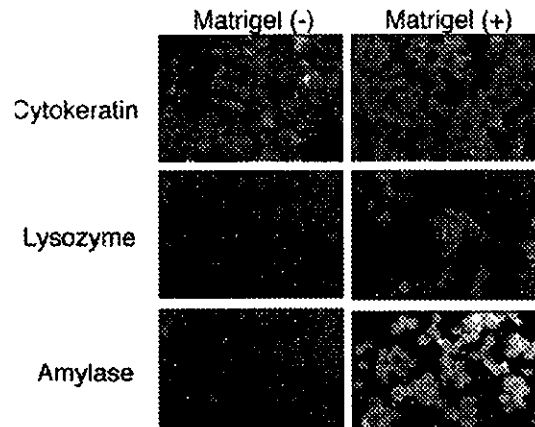


図6 matrigel による各種分泌マーカーの検出

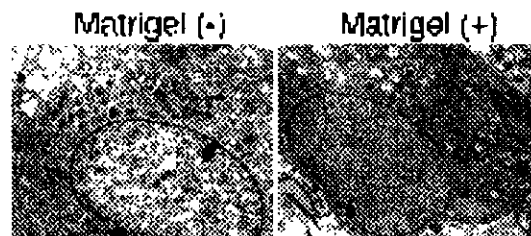


図7 分泌顆粒の電顕的観察

ここでは以前より唾液腺の分化を促進すると報告されている性ホルモンの一つであるアンドロジェンの機能について解析を行った。

アンドロジェンを添加したマトリジェル上で MSG を培養すると branching の促進が認められたので、そのメカニズムを検討するため、アンドロジェンを加えたマトリジェルに、さらに MAP キナーゼ経路のインヒビターとして MEK インヒビターと、

cAMP 活性化経路の下流である PKA のインヒビターを用いて形態学的特徴を観察した。その結果、MEK インヒビター添加により部分的に、PKA インヒビター添加により完全にアンドロジェンによる branching の促進が抑制された (図 8)。

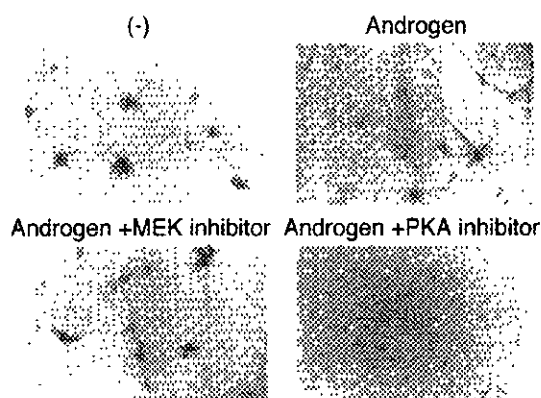


図 8 inhibitor によるアンドロジェンを介した branching の抑制効果

これらの結果より唾液腺細胞の branching には PKA を介した経路が関与している可能性が示唆されたので、その下流に位置している転写因子の一つである CREB のリン酸化について抗リン酸化 CREB 抗体を用いたウェスタンブロット法により検出した。アデニル酸シクラーゼの活性化を介して、cAMP 濃度を上昇させる forskolin (FSK) で刺激した後、抗リン

酸化 CREB 抗体を用いたウェスタンブロット法により検出した結果、forskolin 刺激 15 分よりリン酸化 CREB が検出された (図 9)。このリン酸化は PKA inhibitor 存在下では抑制されるが、MEK inhibitor では抑制されなかった。ここでは唾液腺細胞を用いた結果を示したが、涙腺細胞においても同様な結果は予測され、現在、解析を進めている。

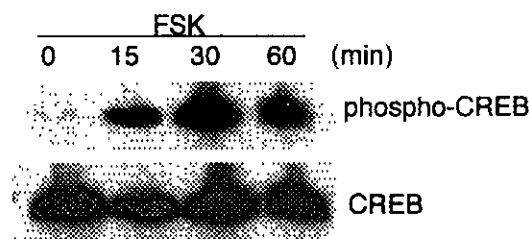


図 9 forskolin 刺激によるリン酸化 CREB の検出

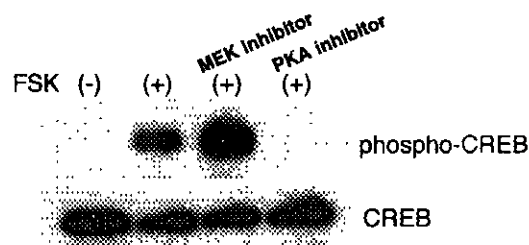


図 10 inhibitor による forskolin を介した CREB のリン酸化抑制効果

さらに、生体内で、CREB が涙線・唾液腺の形態形成および分泌機能に関

与しているか否かを詳細に解析するために、時期特異的に CREB の機能を消失させるシステムが有用と考えられ、我々は、エストロジェンの合成アンタゴニストであるタモキシフェンと結合する変異型エストロゲンレセプターのリガンド結合領域(LBD G512R)と、転写抑制型 CREB S133A との融合タンパク質 (LBD-CREB S133A) を涙腺・唾液腺特異的プロモーターである lama6 制御下で唾液腺局所に発現するトランスジェニックマウスの作成を現在行っている (図 1 1)。この変異マウスにタモキシフェンを投与することにより、唾液腺において転写抑制型 LBD-CREB の発現が誘導され、CRE を介する転写を阻害し、その状況下での涙腺・唾液腺の分泌機構を解析する予定です。また、涙腺・唾液腺の発生・分化を検討するため LBD を取り除いた Lama-CREB S133A トランスジェニックマウスの作出も行っている (図 1 2)。

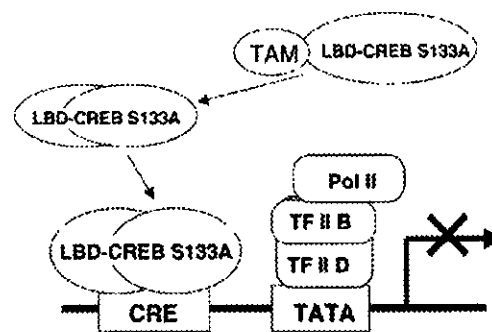


図 1 1 CREB S133A による転写抑制機構

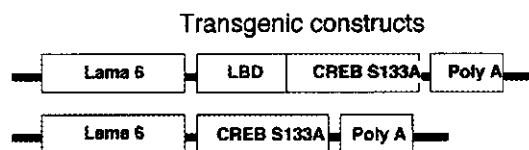
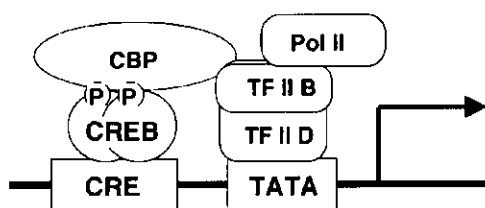


図 1 2 トランスジェニックマウスの遺伝子構築

B. 考察

本研究では parotid secretory protein のプロモーターである lama6 を TG マウスの導入遺伝子に応用することで涙腺・唾液腺特異的な遺伝子発現が可能となった。本研究でもこの構築によりプロラクチンの涙腺・唾液腺における特異的発現が可能となった。プロラクチンは、下垂体前葉から分泌されるホルモンで、乳腺小葉の発育、分娩後の乳汁分泌を促進すると共にパラクライン的な成長因子の役割を



も担っていると考えられている。プロラクチン受容体は、サイトカインレセプタースーパーファミリーに属す一本鎖の転写膜蛋白で、多種多様な組織にその発現が認められる。プロラクチンはプロラクチン受容体と二量体形成を起こし、サイトカイン受容体のチロシン残基リン酸化に重要な働きをもつ Janus kinase (JAK) 2 によりリン酸化を受け、さらにその下流に存在するシグナル伝達性転写群の一つである signal transducer and activator of transcription (STAT) 5a, 5b のリン酸化を引き起こす。活性化された Stat5a, Stat5b は核内へと移行し、 γ -interferon activation sites (GAS) に結合し、細胞の増殖、分化、乳汁分泌に働く whey acidic protein (WAP), β -lactoglobulin 遺伝子の転写を誘導するとされている。また、Stat5 の活性化は、乳腺分泌細胞への最終的な分化に重要なステップであると示唆されている。このようにプロラクチンを介した乳腺の増殖や分泌経路の解析はされているが、涙腺・唾液腺組織におけるプロラクチンの機能については明らかにされていない。

Mirchekff らは、腺房細胞での発現を報告し、涙液分泌におけるプロラクチンの役割を示唆している。唾液腺におけるプロラクチンの報告はないが、プロラクチン受容体に関しては、正常唾液腺組織においては線条部導管に、また唾液腺腫瘍においては導管の内腔表面にその発現を認めたとの報告があり、プロラクチンを介した分泌機構の存在が想定されている。本研究で作出された PRL-TG を介した解析では、プロラクチンが涙液および唾液の分泌のみならず再生にも関与していることが明らかにされ、プロラクチンの局所投与や遺伝子導入は乾燥症状の改善や腺組織の再生に役立つ可能性が示唆された。また、HSY ではプロラクチンにより PKA を介した CREB のリン酸化が認められ、さらに、この経路は p53^{-/-}マウス唾液腺細胞でも確認された。今後さらにプロラクチンを介した伝達経路を解析することで、より詳細な涙腺・唾液腺の分泌あるいは再生機構を明らかにする予定である。ここで用いた p53^{-/-}マウス唾液腺細胞株 (MSG) は、癌抑制遺伝子である p53 が欠損しているが、p53 の機

能はサイクリン依存性キナーゼの阻害タンパク p21 の発現を誘導することにより、細胞増殖を G1 期で停止させる作用を有し、この p53 の不活性化が細胞の不死化を誘導するとされている。また、p53^{-/-}マウスから樹立した細胞株はヌードマウスに接種しても癌化しないことや、正常機能を有するなどの利点がある。本研究でもこの細胞株を用いて、branching 形成を促進する因子としてアンドロジェンが明らかになった。また、アンドロジェンによる branching の解析により、これまで branching を誘導する経路として知られていた MAPkinase 経路以外に cAMP-PKA-CREB を介した経路の存在を示唆する所見が得られたことは興味深い。

E. 結論

涙腺・唾液腺組織特異的にプロラクチンを発現する TG を用いた解析により、プロラクチンが腺組織の分泌及び再生を誘導することが明らかになった。また、p53^{-/-}マウスより得られた涙腺・唾液腺細胞を用いて、アンドロジェンが腺組織の branching を誘導す

る因子の一つであり、その下流には cAMP-PKA - CREB を介した pathway が存在することが明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

特になし。

2. 学会発表

1) 山田耕一. 唾液腺の分泌・再生能における転写因子 CREB の役割. 第 7 回シェーグレン症候群市川セミナー. 2002 年.

2) Koichi Yamada, Kazuo Tsubota, Ichiro Saito. Enhanced Lacrimation and Salivation in Prolactin Transgenic Rats. 第 8 回国際シェーグレン症候群シンポジウム. 2002 年.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特願 2002-313579

「プロラクチンを含む外分泌腺組織からの分泌促進剤およびプロラクチン遺伝子が導入されたトランスジェニック動物」

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。