

よって、審査の結果、本論文は歯科医学の進歩発展に寄与するところが大きく、学位授与に値すると判定した。

氏名・(本籍)	齊藤正人(北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	甲第47号
学位授与の日付	平成9年3月21日
学位授与の要旨	学位規則第5条1項該当(課程博士)
学位論文題目	ハムスター舌粘膜上皮におけるギャップ結合蛋白コネクシン発現, 局在についての検討
論文審査委員	主査 教授 賀来 亨 副査 教授 武田 正子 副査 教授 有末 眞

論文内容の要旨

緒言

口腔粘膜表層の重層扁平上皮は、種々の機械的刺激に対応すべく調和のとれた分化、増殖を営んでいるが、その恒常性維持の重要な因子のひとつとしてギャップ結合が注目されている。ギャップ結合の本体は、構成蛋白であるコネクシンが集合することにより形成されるチャンネルで、これを通じ物資の交換、すなわち細胞間コミュニケーションが、生体の恒常性の維持に携わっていると考えられている。コネクシンは現在までラット、マウスで12種類クローニングされており、多くの場合個々の細胞において2種類以上発現していることが明らかにされている。

近年、組織の再生過程や癌化過程においてコネクシンの発現変化、局在変化がみられ、細胞間コミュニケーションが低下、消失することが確認されているが、細胞の増殖、悪性化との詳細な関係は明らかではなく、また口腔粘膜におけるコネクシン検索は未だなされていない。

そこで本研究では、ハムスター舌粘膜重層扁平上皮にて、まず正常状態でのコネクシンの発現、局在を明らかにし、次いで創傷治癒過程および発癌過程での発現、局在変化を免疫組織化学的手法、分子生物学的手法を用い比較検討し、口腔粘膜の分化、増殖および悪性化とギャップ結合の関与を検索することを目的とした。

方法

研究材料として7週齢雄シリアンコールテンハムスターの舌粘膜組織を用いた。創傷治癒過程の検索では、舌下面に幅約2mm、深さ約0.5mmの創傷を与え、治癒過程にある舌組織を摘出した。なお屠殺1時間前にbromodeoxyuridine (BrdU) 1ml/100g wtを腹腔内投与しDNA合成期にある細胞を標識した。発癌過程では0.1%DMBAアセトン溶液を週3回、24週間舌下面に塗布し、生じた腫瘍を摘出した。摘出物はそれぞれ急速凍結し、northern blot analysis, western blot analysisおよび凍結切片を作製し免疫組織化学染色に使用した。また摘出物の一部は4%パラホルムアルデヒドにて固定し、パラフィン切片を作製した後、in situ hybridizationに用いた。蛋白の検索には、抗ラットコネクシン26 (Cx26)、コネクシン32 (Cx32) ポリクロナール抗体および抗ラットコネクシン43 (Cx43) モノクローナル抗体を用い、mRNAの検索には、ラットCx26, Cx32, Cx43 cDNAをdigoxigenin RNA labeling kitにてantisense RNAプローブを作製し使用した。またコントロールにそれぞれのsenseプローブを用いた。

結果

正常重層扁平上皮ではCx26, Cx43の蛋白および

mRNAが発現し、Cx32は認められなかった。また蛋白の局在は、Cx43は基底層から有棘層下層に、Cx26は有棘層上層から顆粒層に認められた。しかし、Cx43mRNAは蛋白と同様に、基底層から有棘層にシグナルがみられるものの、Cx26mRNAは基底層から顆粒層に分布しており、Cx43mRNAとCx26mRNAの発現はオーバーラップしていた。

創傷治癒過程では、創傷後6時間でCx26、Cx43はともに創傷部断端で消失するが、BrdU陽性率がピークとなる創傷後24時間で、特にCx26の発現増加と局在の変化がみられ、その後Cx43も同様の変化をたどった。しかしBrdU陽性率の減少と創傷粘膜の治癒に伴い、その発現、局在の変化は元に戻り始めた。Cx26、Cx43mRNAは創傷後6時間でも発現しており、創傷後24時間ではともに著しい発現増加が観察された。

発癌過程において、DMBAにより誘導された乳頭腫は、Cx26、Cx43ともに発現の増加と、角質層を除く全層に局在がみられた。扁平上皮癌ではCx43は常に一定の発現が認められたが、Cx26では高分化から低分化へと組織の分化度が低下するに従い、発現が低下、消失した。これはmRNAでも同様であった。また正常細胞では膜表面に存在するコネクシン蛋白が、癌細胞では核周囲の細胞

へと局在変化かしているものが多数観察された。

結 論

1. ハムスター舌粘膜重層扁平上皮では、Cx26、Cx43の発現が認められた。これらの局在は転写後の調節を受け、上皮の分化過程に従いCx43からCx26へと変化しており、重層扁平上皮の分化過程においてコネクシンの発現調節が行われていることが示唆された。

2. 創傷治癒過程では、創傷直後にコネクシンの発現の消失がみられるが、創傷の治癒に伴い、細胞増殖能の相関したコネクシンの発現増加と局在の変化が認められた。

3. 発癌過程において、乳頭腫ではコネクシンの発現増加がみられるが、扁平上皮癌ではその悪性化に伴いCx26の発現低下、消失が認められた。また正常では細胞膜表面に点状に存在するコネクシンが、癌細胞では核周囲へと局在変化かすることが多くの部位で観察され、細胞間コミュニケーションの阻害が示唆された。

以上より、ギャップ結合蛋白コネクシンは口腔粘膜重層扁平上皮の分化、増殖に深く関与しており、特に癌化過程におけるコネクシンの変化がその悪性度、phenotypeに重要な因子であることが示唆された。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

口腔粘膜表層の重層扁平上皮は、種々の機械的刺激に対応すべく調和のとれた増殖、分化を営んでいるが、このような恒常性の維持の重要な因子のひとつとしてギャップ結合が注目されている。ギャップ結合の本体は、構成蛋白であるコネクシンにより形成されるチャンネルで、これを通じ物資の交換、すなわち細胞間コミュニケーションが行われている。

本研究では、まずハムスター舌粘膜重層扁平上皮にて、正常状態でのコネクシンの発現、局在の状態を明らかにし、次いで創傷治癒過程、発癌過程での発現、局在の変化を免疫組織化学的手法、分子生物学的手法を用い比較検討し、口腔粘膜の分化、増殖および悪性化とギャップ結合の関与を検索することを目的とした。

ハムスター舌粘膜重層扁平上皮では、コネクシン26 (Cx26)、コネクシン43 (Cx43) の発現が認められた。これらの局在は転写後の調節を受け、上皮の分化過程に従いCx43からCx26へと変化しており、重層扁平上皮の分化過程においてコネクシンの発現調節が行われていることが示唆された。

創傷治癒過程では、創傷後6時間でCx26、Cx43ともに創傷部断端で消失するが、BrdU陽性率がピークとなる

創傷後24時間で、特にCx26の発現増加と局在の変化がみられ、その後Cx43も同様の変化をたどった。しかし創傷粘膜の治癒に伴い、その発現、局在の変化は元に戻り始め、細胞増殖能に相関したコネクシンの発現増加と局在の変化がみられた。

発癌過程において、乳頭腫ではCx26、Cx43の発現増加がみられるが、扁平上皮癌ではその悪性化に伴いCx26のみに著しい発現低下が認められた。また正常では細胞膜表面に点状に存在するコネクシンが、癌細胞では核周囲へと局在が変化することが多くの部位で観察され、細胞間コミュニケーションの阻害が示唆された。

以上より、ギャップ結合蛋白コネクシンは口腔粘膜重層扁平上皮の分化、増殖に深く関与しており、特に癌化過程におけるコネクシンの変化がその悪性度、phenotypeに重要な因子であることが示唆された。

本研究は、口腔粘膜の正常組織、創傷治癒過程および癌化過程において、ギャップ結合蛋白コネクシンの発現、局在の変化を明らかにした最初の報告であり、歯科医学および細胞生物学の発展に寄与するところが大きく、学位授与に値すると判定した。