

有郭乳頭の形態形成における細胞増殖因子受容体の発現

田中三千三郎 安部仁晴 中川敏浩

Immunohistochemical Localization of Growth Factor Receptors in Developing Human Circumvallate Papillae

Michisaburoh TANAKA, Kimiharu AMBE and Toshihiro NAKAGAWA

In order to clarify the role of growth factors in developing lingual papillae, the expression of TGF- β receptor (TGF β R), Flt-1, KDR/Flk-1 and low affinity NGF receptor (LNGFR) were investigated on the human circumvallate papillae using an immunohistochemical method.

At fetal 16 weeks, immunoreactivity of TGF β R was detected on many cells at epithelial and mesenchymal tissue in the circumvallate papillae. Immunoreactivity of TGF β R weakened gradually in developing circumvallate papillae, and was restricted only to epithelial tissue at fetal 28 weeks. Immunoreactivity of Flt-1 was similar to that of KDR/Flk-1, which was expressed in endothelial cells, epithelial cells and mesenchymal tissue. Those expressions were intensive at surface of circumvallate papillae. However, immunoreactivity of Flt-1 and KDR/Flk-1 was localized at microvascular endothelial cells in fetal 28 weeks. Immunoreactivity of LNGFR was expressed in mesenchymal tissue on basal papillae at fetal 16 weeks. On the other hand, immunoreaction of LNGFR at fetal 21 weeks was extended to surface of circumvallate papillae, which was localized at nerve fibers at fetal 28 weeks. With regard to the immunolocalization of each antibody in taste buds, the expression of TGF β R was observed at all cells, those of Flt-1 and KDR/Flk-1 were visible at a few cells in taste buds.

These results suggest that TGF β R, Flt-1, KDR/Flk-1 and LNGFR are concerned with the morphogenesis of circumvallate papillae. In addition, TGF β R, KDR/Flk-1 and Flt-1 may play an important role in the differentiation of taste buds.

Key words : TGF- β receptor, KDR/Flk-1, Flt-1, NGF receptor, circumvallate papillae,

緒 言

これまで舌乳頭を材料に用いた研究は、味蕾に関するものが多く、味蕾の分布と増齢変化^{1,2)}や味蕾を構成する細胞の分化³⁾、神経線維との関連性^{4,5)}等に焦点があてられている。また有郭乳頭の発育

については、結合織芯を含めた微細構造の検索⁶⁾と細胞や線維成分の構成の観察^{7,8)}についての報告がなされている。

組織や器官の発生とその発育過程には、細胞増殖因子が関与しており、形態形成過程の随所で細胞の増殖分化、誘導からアポトーシスに至るまで

受付：平成19年12月12日，受理：平成20年1月17日
奥羽大学歯学部生体構造学講座口腔組織学分野
(指導：山本茂久教授)

Division of Oral Histology, Department of Morphological
Biology, Ohu University School of Dentistry
(Director : Prof. Shigehisa YAMAMOTO)

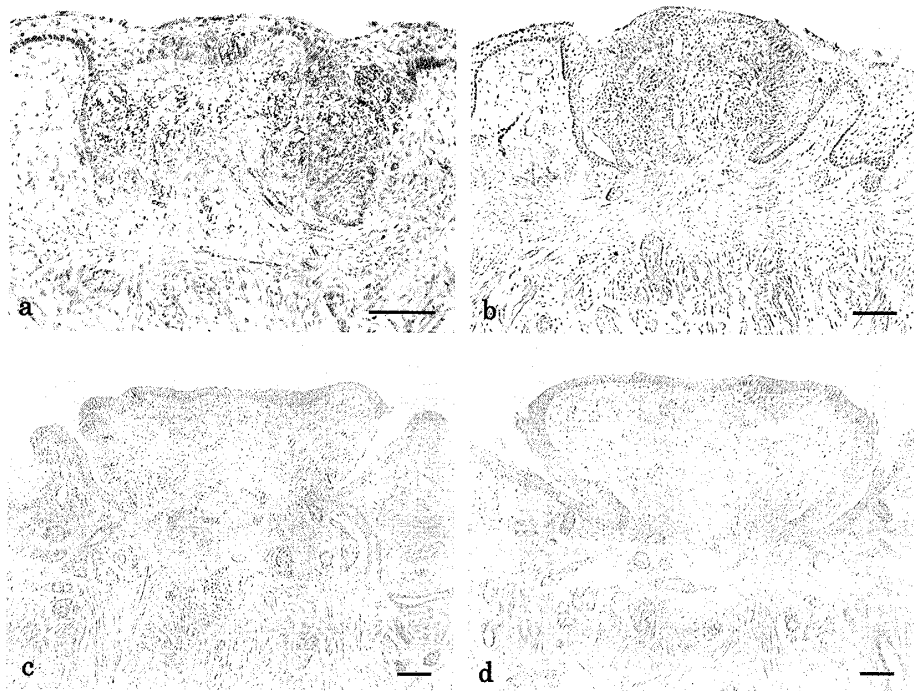


図1 抗TGFβR抗体染色像 bar: 100μm

- a: 胎生16週齢 TGFβRの局在は、乳頭上皮と固有層内の中央部で強く、味蕾原基にも観察される。
- b: 胎生21週齢 TGFβRの局在は、有郭乳頭に局限して観察される。
- c: 胎生25週齢 TGFβRの局在は低下しているが、味蕾では依然として強い。
- d: 胎生28週齢 TGFβRの局在は、乳頭上皮では陽性であるが、固有層内では低下している。

コントロールしている。現在まで、細胞増殖因子はEGFをはじめとして、数百種にもおよぶ膨大な数の因子が同定されている。ひとつの組織・器官が形成される過程には、多くの細胞増殖因子が関連していることは周知の事実であり、各組織・器官における増殖因子の制御機構に関しては、現在も盛んに解析が行われている。しかし、舌乳頭における細胞増殖因子との関連性についての報告は、味蕾に関するもの^{4,9~11)}や発生の初期段階に関するもの^{12,13)}で、形態形成過程に影響を及ぼす因子についての報告はほとんどない。

そこで、器官形成の根幹をなすと考えられる細胞増殖と分化、血管新生と神経線維の誘導に関連する因子としてTGF-β、VEGF、NGFに焦点を絞り、ヒト有郭乳頭の形成過程におけるそれぞれの受容体の局在とその推移を免疫組織化学的に検討した。

材料および方法

1. 研究材料

材料には、奥羽大学歯学部生体構造学講座所蔵のヒト胎児舌を使用した。観察期間は、胎生16, 21, 25, 28週齢とした。なお週齢は体重を考慮のうえ、国友の座高表¹⁴⁾を参考に決定した。

2. 研究方法

標本の作製手順は、まず舌を摘出し、有郭乳頭のみをトリミングした後、10%中性緩衝ホルマリン液にて浸漬固定を行った。試料は30%ショ糖液にて氷結防止処理を行い、Tissue Mount(白井松器機, 東京)に包埋、液体窒素で急速凍結し、クリオスタット(MICROM, Germany)にて厚さ10μmの連続切片を作製した。

凍結切片を0.3% H_2O_2 含有メタノール溶液にて10分間処理し、内因性ペルオキシダーゼを不活性化した。次いで、10%正常ウサギ血清(HISTOFINE SAB-PO Kit, ニチレイ, 東京)にて

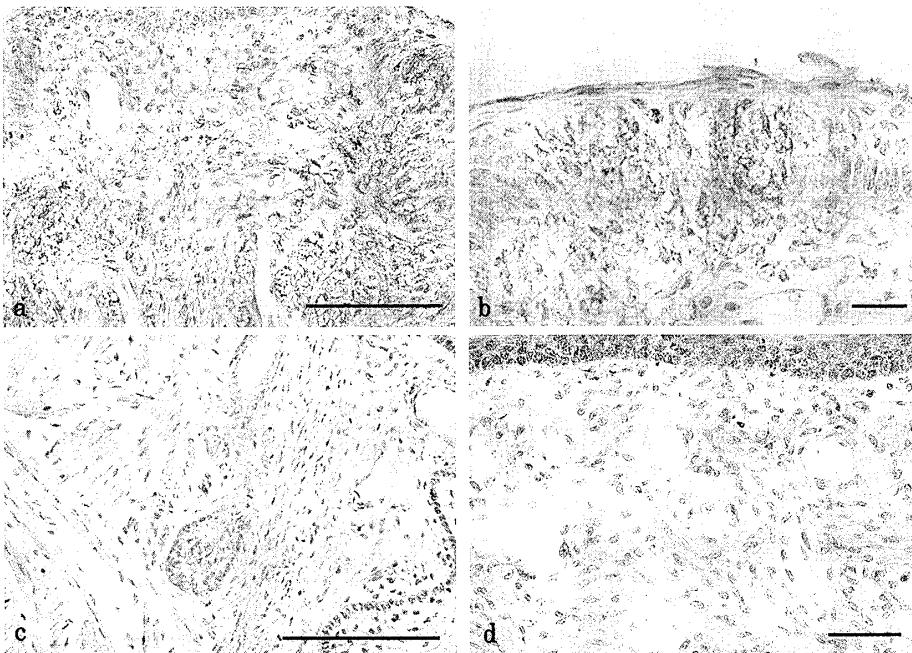


図2 胎生21, 28週齢 抗TGFβR抗体染色像

- a : 胎生21週齢乳頭上部の拡大像 TGFβRの局在は、乳頭上部にまで拡大したが、血管では陰性である。bar : 100μm
 b : 胎生21週齢味蕾の拡大像 味蕾を構成する細胞のすべてに強いTGFβRの局在が観察される。bar : 10μm
 c : 胎生21週齢エブネル腺の拡大像 エブネル腺原基やその周囲において、TGFβRの局在はみられない。bar : 100μm
 d : 胎生28週齢乳頭上部の拡大像 TGFβRの局在は、乳頭上皮で強く、固有層では弱い。bar : 100μm

10分間、ブロッッキング処理を行い、一次抗体を反応させた。

本研究に使用した一次抗体は、rabbit anti human TGF-βreceptor II (TGFβR) (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Cat # sc-220, CA, USA), mouse anti rabbit Flt-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Cat # sc-316, CA, USA), mouse anti human KDR/Flk-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Cat # sc-6251, CA, USA), mouse anti human NGFR low affinity receptor (LNGFR) (CEDARLANE lab. Ltd. Cat # cl10012, Ontario, CANADA)の4種類を用い、それぞれ10時間反応させた。

次に、二次抗体としてbiotinylated anti rabbit mouse immunoglobulin (HISTOFINE SAB-PO Kit, ニチレイ, 東京)を30分間、その後peroxidase 標識streptavidin (HISTOFINE SAB-PO Kit, ニチレイ, 東京)を15分間反応させた。0.3% H₂O₂を含む0.05% 3,3-diaminobenzidinetetra-

hydrochloride(DAB)溶液 (0.05M Tris-HCl緩衝液pH7.6)にて発色を行い、5% methyl green (武藤化学薬品, 東京)にて核染後、光顕観察を行った。なお、切片の洗浄および抗血清の希釈には0.05M Tris-HCl緩衝液 (pH7.6)を用いた。

対照実験は、一次抗体のかわりに正常ヤギ血清 (DAKO Corp., CA, USA)を用いて同様の反応を行った。

なお、本研究の計画立案および遂行は、本学倫理審査委員会の承認を得て施行した。

結 果

1. 各週齢におけるTGFβRの局在

胎生16週齢において、舌背の粘膜上皮はわずかに隆起し、有郭乳頭の外形を形成していた。乳頭の上皮内には味蕾の原基も観察された (図1-a)。抗TGFβRの反応は、舌背粘膜上皮および乳頭上皮に陽性反応がみられ、味蕾原基では強く観察された。乳頭の粘膜固有層内にもTGFβRの陽性反

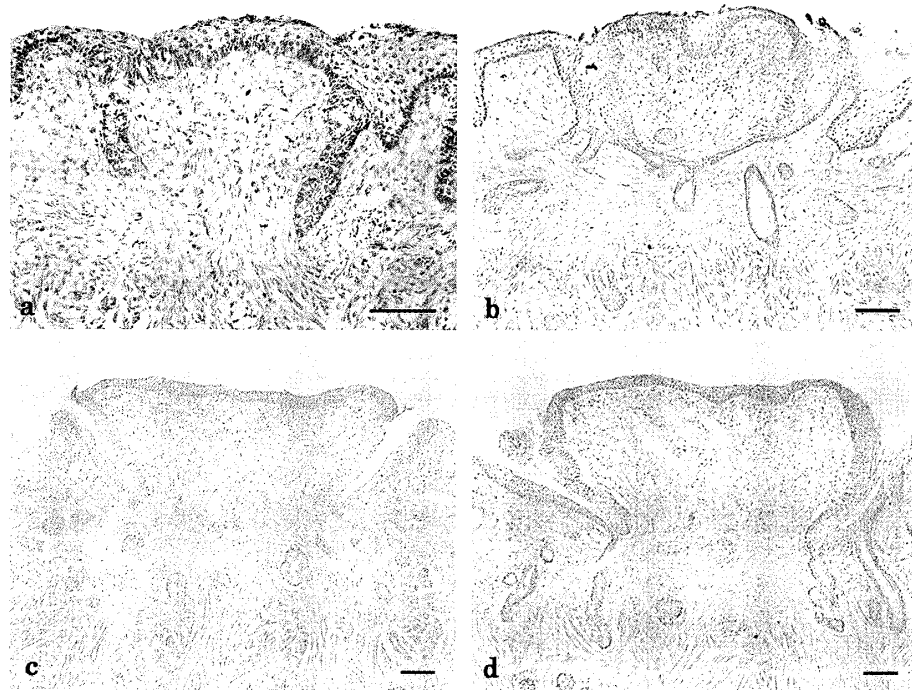


図3 抗Flt-1抗体染色像 bar: 100 μ m

- a : 胎生16週齢 Flt-1の局在は、乳頭上皮と固有層内の血管や一部の間葉組織に観察される。
 b : 胎生21週齢 Flt-1の局在は、二次乳頭で強く観察される。
 c : 胎生25週齢 Flt-1の局在は、乳頭上皮の上部で強く、固有層内では散在性に陽性反応が観察される。
 d : 胎生28週齢 Flt-1の局在は、乳頭上部の上皮にのみみられる。

応が観察され、特に中央部で強く認められた (図1-a)。

胎生21週齢では、有郭乳頭の側面に輪状溝が認められるようになり、乳頭下部にはエブネル腺の形成もみられた。エブネル腺の遠位端では管腔を有する導管が輪状溝に開口していた。また、味蕾は有郭乳頭側面にもみられ、乳頭の上皮全体に散在していた (図1-b)。抗TGF β Rの反応は、乳頭上皮で弱い反応がみられ、味蕾では構成細胞のすべてに強い陽性反応が観察された (図1-b, 図2-b)。また、乳頭の固有層内にも抗TGF β Rの陽性反応が局限してみられ、16週齢に比べ乳頭上部にまで拡大していた。なお、乳頭に分布する血管は陰性であった (図1-b, 図2-a)。一方、有郭乳頭の下部では、エブネル腺原基やその周囲において反応はみられなかった (図2-c)。

胎生25週齢になると有郭乳頭は増大し、輪状溝も明瞭に認められた (図1-c)。抗TGF β Rの反

応は、乳頭上皮においてやや低下したが、味蕾では依然として強い抗TGF β R陽性反応が確認された。乳頭の固有層内においても、21週齢に比べその反応性はさらに減弱していた (図1-c)。

有郭乳頭は胎生28週齢では、さらに発育し、頭部が平坦な広い形態を呈するようになった。味蕾は乳頭上面に比べ、輪状溝側面に多数形成されていた (図1-d)。抗TGF β Rの反応は、味蕾を含む乳頭上皮および舌背粘膜上皮に陽性であった。固有層内における反応性はさらに低下していたが、乳頭上部では弱い陽性反応がみられた (図1-d, 図2-d)。

2. 各週齢におけるFlt-1の局在

胎生16週齢における抗Flt-1の反応は、有郭乳頭を含めた舌背の粘膜上皮が陽性であったが、味蕾原基では明瞭な反応は確認されなかった。乳頭の固有層内では一部の血管と間葉組織に陽性反応が観察された (図3-a)。

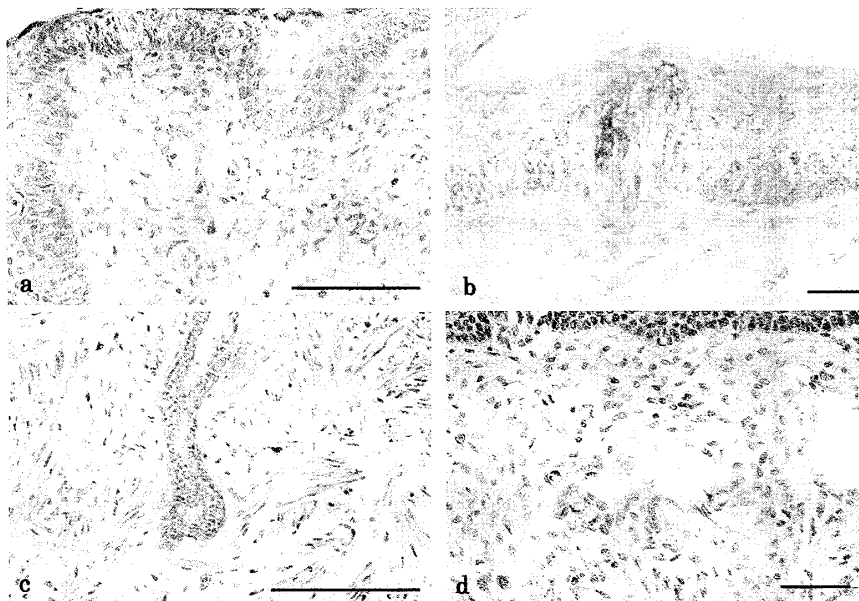


図4 胎生21, 28週齢 抗Flt-1抗体染色像

- a : 胎生21週齢乳頭上部の拡大像 Flt-1の局在は、固有層内の血管や一部の間葉細胞に観察される。bar : 100 μ m
- b : 胎生21週齢味蕾の拡大像 Flt-1の局在は、味蕾の一部に観察される。bar : 10 μ m
- c : 胎生21週齢エブネル腺の拡大像 Flt-1の局在は血管にみられるが、エブネル腺原基と周囲組織では明瞭でない。bar : 100 μ m
- d : 胎生28週齢乳頭上部の拡大像 Flt-1の局在は、固有層内の血管にのみ観察される。bar : 100 μ m

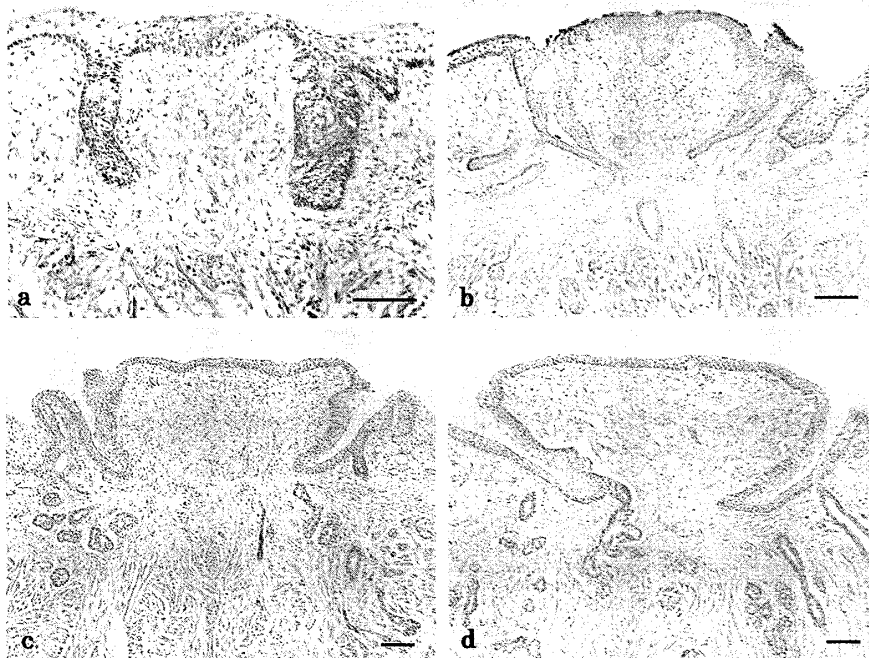


図5 抗KDR/Flk-1抗体染色像 bar : 100 μ m

- a : 胎生16週齢 KDR/Flk-1の局在は、乳頭上皮と固有層内の血管を含めた間葉組織に散在性に観察される。
- b : 胎生21週齢 KDR/Flk-1の局在は、二次乳頭で強い。
- c : 胎生25週齢 KDR/Flk-1の局在は、乳頭上皮および固有層内の血管や間葉組織に広範囲にみられる。
- d : 胎生28週齢 KDR/Flk-1の局在は、乳頭上皮に確認されるが固有層内では反応性は低下している。

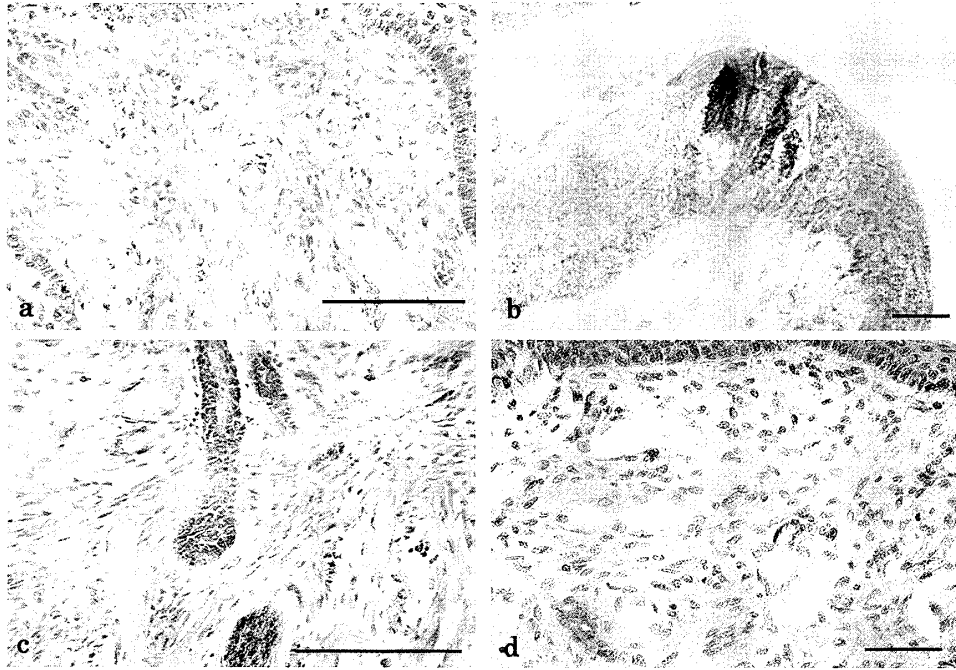


図6 胎生21, 28週齢 抗KDR/Flk-1抗体染色像

- a : 胎生21週齢乳頭上部の拡大像 KDR/Flk-1の局在は、固有層内の多くの血管や間葉組織にみられる。bar : 100 μ m
 b : 胎生21週齢味蕾の拡大像 KDR/Flk-1の局在は、味蕾を構成する細胞の一部にみられる。bar : 10 μ m
 c : 胎生21週齢エブネル腺の拡大像 KDR/Flk-1の局在は、エブネル腺原基や血管、神経線維束、筋線維に観察される。bar : 100 μ m
 d : 胎生28週齢乳頭上部の拡大像 KDR/Flk-1の局在は、乳頭上皮と血管に局限している。bar : 100 μ m

胎生21週齢での抗Flt-1の反応は、二次乳頭の形成部位に強く認められた。また、味蕾では一部の細胞に抗Flt-1の陽性反応が確認された(図3-b, 図4-b)。乳頭の固有層内では血管や一部の間葉組織に抗Flt-1陽性反応が観察された(図3-b, 図4-a)が、エブネル腺原基とその周囲では、明瞭な抗Flt-1陽性反応はみられなかった(図4-c)。

胎生25週齢における抗Flt-1の反応は、乳頭上皮、特に輪状溝に面する側方に比べ上部において強く、固有層内にはこれまでと同様に陽性反応が散在していた(図3-c)。

胎生28週齢での抗Flt-1の反応は、これまでと同様に乳頭上部の上皮に陽性反応がみられたが、固有層内では血管にのみ陽性反応が局限した(図3-d, 図4-d)。

3. 各週齢におけるKDR/Flk-1の局在

胎生16週齢における抗KDR/Flk-1の反応は、有郭乳頭を含む粘膜上皮が陽性であり、味蕾原基

では微弱な抗KDR/Flk-1陽性反応が認められた。固有層内では、血管や間葉組織に散在性に陽性反応が観察された(図5-a)。

胎生21週齢では、二次乳頭の形成部位に強い抗KDR/Flk-1陽性反応がみられ、味蕾では一部の細胞に陽性反応が確認された(図5-b, 図6-b)。また、固有層内では血管や一部の間葉組織に陽性であった(図5-b, 図6-a)。乳頭下部における反応は、エブネル腺原基や血管、神経線維束、筋線維といった多くの細胞に陽性反応が確認された(図6-c)。

胎生25週齢での抗KDR/Flk-1陽性反応は、乳頭上皮および固有層内に分布する血管や間葉組織に広範囲にみられた(図5-c)。

胎生28週齢における抗KDR/Flk-1の反応は減弱しており、乳頭上皮とエブネル腺では陽性反応が確認されたが、固有層内では血管にのみ局限していた(図5-d, 図6-d)。

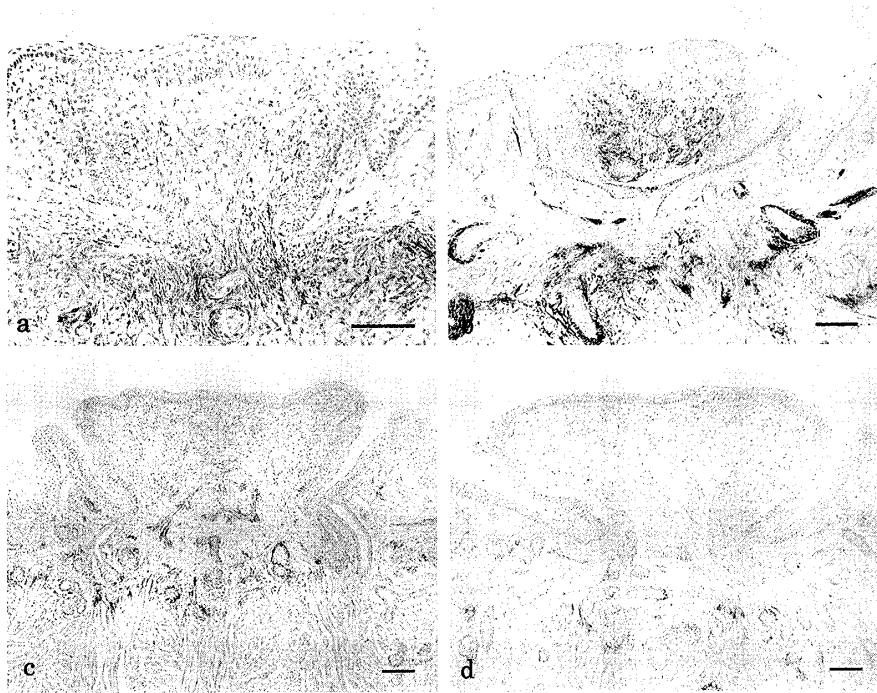


図7 抗LNGFR抗体染色像 bar: 100 μ m

- a : 胎生16週齢 LNGFRの局在は、上皮では観察されず、乳頭下部や味蕾原基に近接する部位にみられる。
- b : 胎生21週齢 LNGFRの局在は、16週齢に比べ固有層内で拡大している。
- c : 胎生25週齢 LNGFRの局在は、エブネル腺とその周囲で強く、固有層では弱い。
- d : 胎生28週齢 LNGFRの局在は、乳頭ではほとんど観察されず、乳頭下部に限局している。

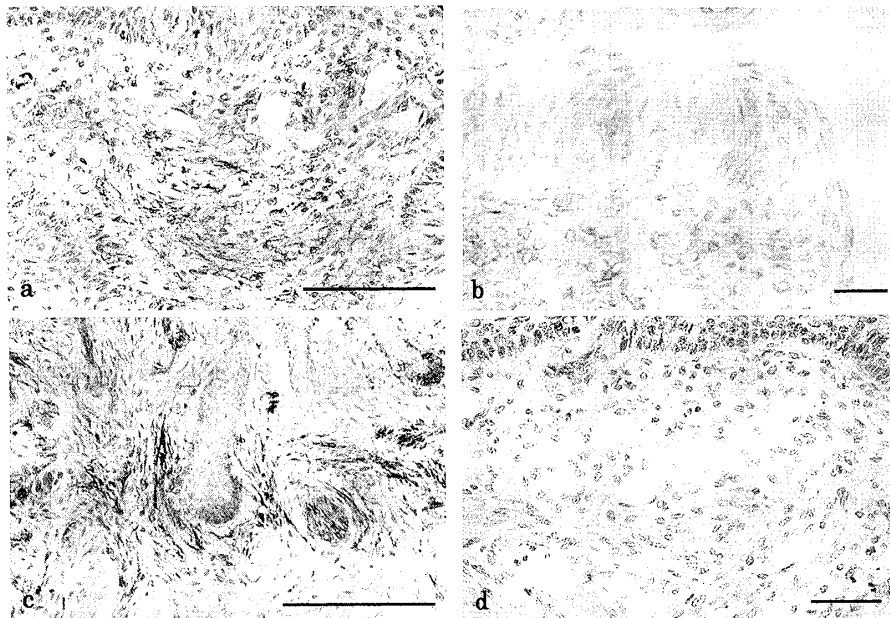


図8 胎生21, 28週齢 抗LNGFR抗体染色像

- a : 胎生21週齢乳頭上部の拡大像 LNGFRの局在は、乳頭上部にまで拡大している。bar: 100 μ m
- b : 胎生21週齢味蕾の拡大像 LNGFRの局在は、味蕾の基底側に近接する部位にみられる。bar: 10 μ m
- c : 胎生21週齢エブネル腺の拡大像 LNGFRの局在は、エブネル腺原基末端の細胞にみられ、周囲の神経線維や間葉組織にも観察される。bar: 100 μ m
- d : 胎生28週齢乳頭上部の拡大像 LNGFRの局在は、固有層内に存在する太い神経線維に弱陽性反応が観察される。bar: 100 μ m

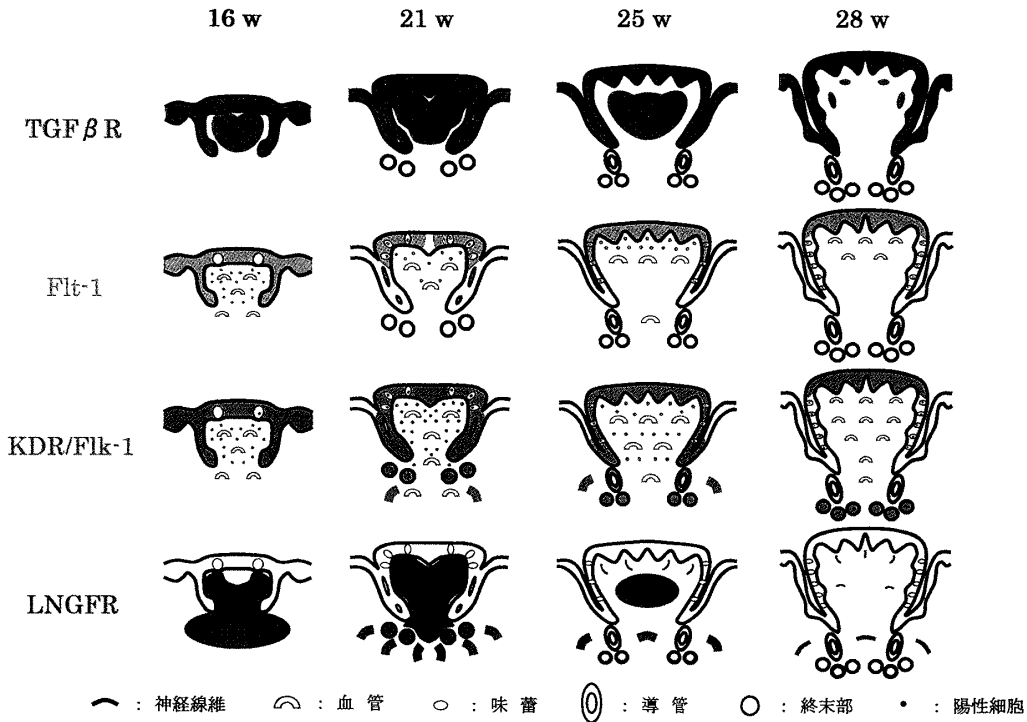


図9 ヒト有郭乳頭の発育に伴う各受容体の局在の推移

4. 各週齢におけるLNGFRの局在

胎生16週齢での抗LNGFRの反応は、乳頭上皮では認められなかったが、乳頭を含む舌背の粘膜固有層に広く陽性反応が観察され、特に乳頭下部や味蕾原基に近接する部位で強い傾向にあった(図7-a)。

胎生21週齢では、固有層内の陽性反応が乳頭上部にまで拡大していたが、乳頭上皮や血管では陰性であった(図7-b, 図8-a)。味蕾においては抗LNGFRの陽性細胞は認められなかったが、味蕾に近接する間葉組織では陽性反応がみられた(図8-b)。乳頭下部における抗LNGFRの反応は、エブネル腺原基周囲に分布する神経線維や間葉組織に強く観察され、エブネル腺原基の末端の細胞も陽性を呈していた(図8-c)。

胎生25週齢における抗LNGFRの反応は、固有層内では低下していたが、エブネル腺とその周囲では、強い陽性反応がみられた(図7-c)。

抗LNGFRの反応は胎生28週齢になると著しく低下し、固有層内に存在する太い神経線維にのみ弱陽性反応が観察された。また、エブネル腺においても反応性は低下しており、未分化な細胞集団とその周囲に局限した(図7-d, 図8-d)。

なお、増齢に伴うTGF β R, Flt-1, KDR/Flk-1, LNGFRの局在の推移を図9に示す。

考 察

1. TGF β Rの局在の推移について

TGF- β は胚発生と分化、生体では免疫系、創傷治癒や発癌などさまざまな環境で重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。TGF- β は数多くの転写因子と結合することから、その生理作用は多岐にわたる^{15,16)}。TGF- β の最も代表的な作用は細胞増殖のコントロールにあるが、前述のごとくTGF- β の作用は多彩であり、その他には細胞外マトリックスの産生が挙げられる。

有郭乳頭におけるTGF β Rの発現は、胎生16週齢では固有層内に広範囲にみられ、増齢に伴い固有層では消失した。舌乳頭の粘膜固有層には、I型コラーゲンを主体とする交織性の密な線維性結合組織が配列し、それぞれの形態に応じた固有の結合織芯を形成する^{6,9)}。有郭乳頭はその大きさから他の舌乳頭と比較して、発達した結合織芯を形成することが報告されている⁹⁾。本結果におけるTGF β R発現の推移は、乳頭の増大する時期と一致しており、固有層内におけるTGF- β の作用と

して、結合織芯の形成とその発達に関連することが示唆される。また、TGF β Rの局在は有郭乳頭に限局しており、乳頭周囲の固有層ではみられなかった。周囲固有層では有郭乳頭に比べ、結合織芯の形成も明瞭でないことから、TGF- β は線維芽細胞の機能を活性化し、コラーゲンやフィブロネクチン等の産生を促進、有郭乳頭の結合織芯を形成することが考えられる。

これまで、味蕾におけるTGF- β やVEGFおよびそれらの受容体の発現についての検索はみられない。本研究では、味蕾を構成する細胞にTGF β Rの発現がみられた。TGF- β には、前述の作用以外にも細胞の分化を調節する役割をもつ。TGF- β は、ケラチノサイトや小腸および呼吸器系の上皮細胞、軟骨細胞の分化を促進することが報告されている¹⁶⁾。本研究結果において、TGF β Rの局在は味蕾の成熟度に関わらず、すべての細胞にみられたことから、味蕾に存在するI~IV型細胞の分化にTGF- β のシグナルが関与することが考えられる。

2. Flt-1およびKDR/Flk-1の局在の推移について

Flt-1とKDR/Flk-1は一般に血管系に作用する因子として、種々の組織での発現や分化における役割について検索がなされている¹⁷⁻²⁰⁾。有郭乳頭の発育過程における血管の侵入と血管網の形成についての報告²¹⁾によると、胎生3ヶ月では乳頭固有層内に血管は存在せず、4ヶ月に微細な血管が侵入、その後乳頭形態に応じた複雑な血管網が構築される。一方、これまで舌乳頭の発育過程における血管新生と血管網の形成に関与する因子については検索されていない。

今回、本研究において胎生16週齢の乳頭固有層内に微細な血管の侵入が確認され、血管内皮細胞と周囲の未分化な細胞にFlt-1およびKDR/Flk-1の局在が観察された。その後両者の発現は発達する二次乳頭で強く、28週齢では乳頭上部の血管に限局する傾向を示した。このことは、有郭乳頭の発育に伴う血管新生において、Flt-1とKDR/Flk-1が関与することを示唆する結果であると考えられる。他の組織・器官の発生初期における血管新生においても、Flt-1とKDR/Flk-1は重要

な役割をもつことが報告¹⁷⁻²⁰⁾されており、ヒト有郭乳頭の形成過程においても両受容体が深く関連することが、本研究結果から明らかとなった。

*In vitro*の実験系²²⁾により血管新生において、初期にKDR/Flk-1が発現することで、内皮細胞は活発に増殖し、その後Flt-1の発現により管腔形成などの分化が起こることが判明している。*In vivo*では、肺¹⁷⁾や腎臓¹⁸⁾、歯胚²⁰⁾についてもこれを裏付ける結果が報告されている。しかし、今回の結果では、血管の侵入が開始した直後からFlt-1の発現が観察され、KDR/Flk-1の発現に比べ若干少ないものの、比較的早期より乳頭の各部位に局在が認められた。舌における血管分布を検索した報告²¹⁾によると、胎生3ヶ月の舌背粘膜の直下にはすでに口径の大きい血管が分布しており、有郭乳頭の形成に伴い血管は速やかに侵入、複雑な血管網を形成する。血管の分布状況と本結果から、有郭乳頭は血管が速やかに侵入できうる環境にあることから、他の組織よりもFlt-1の発現が早く、広範囲に観察されたものと考えられる。

味蕾においてFlt-1とKDR/Flk-1の発現は、一部の細胞に選択的にみられ、持続していた。味蕾内には神経線維は認められるが、血管は近接するものの侵入はしない。したがって、Flt-1、KDR/Flk-1は血管新生ではなく、味蕾内では特定の細胞の分化に関与するのではないかと考える。

一方、エブネル腺原基においてKDR/Flk-1の発現が観察され、28週齢においても陽性反応は持続していた。この点については、血管の誘導も考えられるが、VEGFは種々の細胞増殖にも作用することが示されている²²⁾ことから、エブネル腺原基の発育時期における細胞増殖においても、KDR/Flk-1が関与すると考えられる。なお血管の誘導に関しては、一般に、腺細胞の分化と唾液の分泌といった機能を営む時期において、最も血管分布や血液供給の必要性が高まる。本研究での検索はエブネル腺の発生初期に限定されているため、腺細胞の分化や腺房形成といった血管が密接に関係する時期でのFlt-1とKDR/Flk-1の発現についても検討する必要があると思われる。

3. LNGFRの局在の推移について

これまで、舌乳頭におけるNGFとその受容体

の発現に関しては、味蕾の分化とシナプス形成の観点からも数多くの報告^{4,9)}がなされている。また、有郭乳頭における神経線維の分布²³⁾に関する詳細に観察されている。NGFはニューロンの生存促進、神経突起の伸長やシナプスの可塑性制御などの役割を担い、神経細胞には不可欠な因子である²⁴⁾。一方、NGFの受容体には高親和性レセプターであるTrkファミリーと低親和性レセプターであるLNGFRに分類される。LNGFRは胎生期に発現が高く、成熟とともに消失することやTrkとは異なる作用を担うことが示されている^{25,26)}。

本研究におけるLNGFRの局在は、有郭乳頭における神経線維の分布を検索した報告²³⁾、Trkファミリーの局在を検索したもの^{4,10)}を比較すると、明らかな差異がみられた。一つは、乳頭形成初期の発現が上皮とその直下にみられなかったこと、加えて、乳頭形成に伴い発現が減弱したことが挙げられる。これら一連の局在の推移と反応性の変化から、LNGFRは神経線維の標的部、細胞への誘導および神経線維の侵入経路、方向性を規制しているのではないかと考えられる。*In vivo*における検索において、LNGFRは軸索伸長の際に足場として機能している可能性が指摘されており²⁵⁾、本研究からもこの機能を支持する結果が導き出された。

味蕾を構成する細胞の分化や神経線維との関連性については、神経栄養因子⁹⁾とその受容体^{4,10)}および接着因子²⁷⁾、転写因子²⁸⁾などの解析が詳細に行われている。しかし、味蕾とLNGFRの発現に関する報告はない。本結果でのLNGFRの発現を考えると、味蕾を構成する細胞の分化やシナプス形成にLNGFRは関与せず、乳頭内に侵入した神経線維が味蕾へと到達するまでの経路を確保するのではないかと考えられる。したがって、味蕾の増殖と分化には、主としてTrkなどの高親和性レセプターが寄与すると思われるが、LNGFRの関与も否定できない。

エブネル腺原基でも、LNGFRの発現が観察された。LNGFRの発現は、エブネル腺原基と神経線維を含めた周囲組織に広範囲にみられ、増齢とともに、未分化な細胞集団にのみ限局して観察された。唾液腺におけるLNGFRの発現に関しては、

ラット耳下腺を用いた報告²⁹⁾がある。この報告²⁹⁾においても、発生初期には、LNGFRは腺原基周囲に広く発現しており、LNGFRは耳下腺への神経誘導と分化に関与することが示されている。本研究結果から、ヒトエブネル腺の発生においても、LNGFRは神経線維の誘導や細胞の分化に関連することが明らかとなった。

4. 各受容体の関連性について

乳頭上皮では、TGF β RとFlt-1、KDR/Flk-1の発現が認められた。上皮細胞におけるTGF- β の作用としては、細胞の増殖抑制とアポトーシス誘導が挙げられる。また、VEGFは血管内皮細胞にのみ作用するだけでなく、種々の細胞の増殖にも関与することが示されている²²⁾。これらのことから、本研究における乳頭上皮のTGF β RとFlt-1、KDR/Flk-1の発現は、上皮細胞の増殖にはFlt-1、KDR/Flk-1が関与し、その抑制にTGF β Rが関与する可能性を示唆する。しかし、乳頭上皮細胞の増殖という点では、EGF等の増殖作用の強い因子の関わりも深く関連していると思われる。さらに、今回の各受容体の発現の結果から、乳頭上皮の発育には、VEGFとTGF- β 両者による制御機構が働いている可能性がある。

神経と血管の侵入と分布については、細胞増殖因子の解析からも密接に関連することが報告されている。末梢感覚神経細胞と動脈系血管内皮細胞を用いた実験系から、神経細胞由来のVEGFが内皮細胞の分化を誘導することが示され、*in vivo*においても発生段階では神経細胞が周囲の細胞に比べ、強くVEGFを発現することが報告³⁰⁾されている。現在、神経由来のVEGFが周囲の血管網再構築を誘導し、血管がNGF、BDNF、NT3といった神経栄養因子を供給することで、神経の標的細胞への侵入経路を規制すると考えられている³⁰⁾。本研究においても、LNGFRとFlt-1、KDR/Flk-1の発現は初期では乳頭に広範囲にみられ、その後、乳頭上部に限局する傾向を示し、それらの消長はほぼ同様であった。この結果から、有郭乳頭における神経と血管の侵入と発達過程でも、NGFとVEGFの相互が作用している可能性が考えられる。

さらに、血管新生にはTGF- β も少なからず働

くとされているものの、本結果では内皮細胞に TGF β R の発現はみられなかった。初期の血管の誘導という点で TGF- β の関与は否定できないが、今回の観察期間における血管新生に関しては、TGF- β の関連性は少ないと思われる。

結 論

胎生16週齢から28週齢までのヒト有郭乳頭の成長発育における TGF β R, Flt-1, KDR/Flk-1 および LNGFR の局在について免疫組織化学的に検索し、以下の結論を得た。

1. TGF β R の局在は、胎生16週齢では乳頭上皮、粘膜固有層に広範囲に観察されたが、発育に伴い反応性は低下し、28週齢の固有層ではほとんどみられなくなった。また、味蕾ではすべての細胞が陽性を呈した。

2. Flt-1 と KDR/Flk-1 の局在はほぼ類似し、乳頭上皮と固有層内の血管、間葉組織に陽性反応がみられた。乳頭の発育に伴い、両者の発現は二次乳頭で増強したものの、28週齢では血管のみ陽性であった。また、味蕾の一部に Flt-1, KDR/Flk-1 陽性を示す細胞が認められた。

3. LNGFR の局在は、乳頭下部の間葉組織に陽性反応がみられ、21週齢では乳頭上部にまで拡大したが、その後低下し神経線維に局限した。また味蕾は陰性であったが、エブネル腺原基は陽性を示す細胞がみられた。

以上のことから、ヒト有郭乳頭の発育には TGF- β , NGF, VEGF の受容体が深く関連することが示唆された。特に TGF β R は結合織芯の形成、LNGFR は神経線維の誘導、Flt-1 と KDR/Flk-1 は血管新生に関与すること、ならびに有郭乳頭の発育過程には各受容体の相互作用が関連することが示された。加えて、TGF β R と Flt-1, KDR/Flk-1 は、乳頭の発育以外にも味蕾を構成する細胞の分化に関連性をもつことが考えられた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました奥羽大学歯学部生体構造学講座口腔組織学分野山本茂久教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を遂行するにあたり、御協力をいただいた教室員各位に感謝い

たします。

本論文の要旨は、第43回奥羽大学歯学会（平成19年6月 郡山市）、日本解剖学会第53回東北・北海道連合支部学術集会（平成19年9月 札幌市）において発表した。

文 献

- 1) Shimizu, Y. : A histomorphometric study of the age-related changes of the human taste buds in circumvallate papillae. *Oral Med Pathol* **2** ; 17-24 1997.
- 2) Arvidson, K. : Location and variation in number of taste buds in human fungiform papillae. *J Dent Res* **87** ; 435-442 1979.
- 3) Witt, M. and Reutter, K. : Embryonic and early fetal development of human taste buds : A transmission electron microscopical study. *Anat Record* **246** ; 507-523 1996.
- 4) Kawakoshi, K., Suzuki, Y., Okumura, K., Shibata, T. *et al.* : Expression of nerve growth factor and neurturin, and their receptors in mouse taste buds. *J Oral Biosci* **47** ; 157-167 2005.
- 5) Morris-Wimam, J., Brinkley, L. and Sego, R. : An *in vitro* model for the study of the role of innervation in circumvallate papillae morphogenesis. *Dev Brain Res* **116** ; 141-150 1999.
- 6) Kobayashi, K., Kumakura, M., Shinkai, H. and Ishii, K. : Three-dimensional fine structure of the lingual papillae and their connective tissue cores in the human tongue. *Acta Anat Nippon* **69** ; 624-635 1994.
- 7) Yamamoto, T., Kondo, S. and Nagai, H. : On the distribution of elastic fibers in the filiform papillae of *suncus murinus*. *Jpn J Oral Biol* **31** ; 379-384 1989.
- 8) 佐々木崇寿, 澤江佳子, 佐原貴子, 城戸 衛ほか : 舌背粘膜・有郭乳頭における粘膜固有層の微細構造観察. *昭歯誌* **19** ; 353-360 1999.
- 9) Chou, H. C., Chien, C. L. and Lu, K. S. : The distribution of PGP9.5, BDNF and NGF in the vallate papilla of adult and developing mice. *Anat Embryo* **204** ; 161-169 2001.
- 10) Uchida, N., Kanazawa, M., Suzuki, Y. and Takeda, M. : Expression of BDNF and TrkB in mouse taste buds after denervation and in circumvallate papillae during development. *Arch Histo Cyto* **66** ; 17-25 2003.
- 11) Takeda, M., Suzuki, Y., Obara, N., Uchida, N. *et al.* : Expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and GDNF family

- receptor $\alpha 1$ in mouse taste bud cells after denervation. *Anat Sci Int* **80** ; 105-110 2005.
- 12) Jung, H. S., Oropeza, V. and Thesleff, I. : Shh, Bmp-2, Bmp-4 and Fgf-8 are associated with initiation and patterning of mouse tongue papillae. *Mech Dev* **81** ; 179-182 1999.
 - 13) Kim, J. Y., Mochizuki, T., Akita, K. and Jung, H. S. : Morphological evidence of the importance of epithelial tissue during mouse tongue development. *Exp Cell Res* **290** ; 217-226 2003.
 - 14) 国友 鼎 : 日本人胎児の月経年齢 身長および体重について. *日学術協報* **4** ; 670-674 1928.
 - 15) 鈴木裕之, 宮園浩平 : TGF- β シグナル伝達と疾患. *実験医学* **21** ; 184-189 2003.
 - 16) 安部まゆみ, 佐藤靖史 : 4章TGF- β スーパーファミリー TGF- β (宮園浩平, 菅村和夫編) 第2版 ; 138-1409 2001.
 - 17) Marszalek, A., Daa, T., Kashima, K., Nakayama, I. *et al.* : Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the developing rat lung. *Jpn J Physiol* **51** ; 313-318 2001.
 - 18) 黒田忠敏, 茂呂修啓, 根本則道, 牛山 寿ほか : ヒト胎児腎の形態形成とbasic Fibroblast Growth Factor(bFGF), FGF-receptor(FGFR)及びVascular Endothelial Growth Factor(VEGF)の発現. *日臨電顕誌* **31** ; S94 1998.
 - 19) 飯田みどり, 平家俊男, 吉本桃子, 中畑龍俊 : マウス胚性幹細胞を用いた心筋細胞分化機構解明の試み. *炎症・再生* **22** ; 145-151 2002.
 - 20) 月田秀夫, 安部仁晴, 中川敏浩 : 歯胚の発育におけるVEGFとその受容体の発現. *奥羽大歯学誌* **34** ; 75-91 2007.
 - 21) 深瀬公彦 : ヒト胎児舌背における微細血管の変化. *奥羽大歯学誌* **21** ; 29-47 1994.
 - 22) 渋谷正史 : 血管内皮増殖因子VEGFの作用機構. *実験医学* **22** ; 1056-1062 2004.
 - 23) Witt, M. and Reutter, K. : Innervation of developing human taste buds. An immunohistochemical study. *Histochem Cell Biol* **109** ; 281-291 1998.
 - 24) 増山典久, 後藤由季子 : 神経系細胞の生存シグナル. *実験医学* **21** ; 258-264 2003.
 - 25) 古川美子, 林 恭三 : 高親和性NGF受容体と原癌遺伝子trk. *細胞* **24** ; 260-263 1992.
 - 26) Yan, Q. and Johnson, E. M. Jr. : An immunohistochemical study of the nerve growth factor receptor in developing rats. *J Neurosci* **8** ; 3481-3498 1988.
 - 27) Takeda, M., Suzuki, Y., Obara, N. and Nagai, Y. : Neural cell adhesion molecule of taste buds. *J Electron Microsc* **41** ; 375-380 1992.
 - 28) Miura, H., Kusakabe, Y., Kato, H., Miura-Ohnuma, J. *et al.* : Coexpression pattern of Shh with Prox1 and that of Nkx2.2 with Mash1 in mouse taste bud. *Gene Expr Patterns* **3** ; 427-430 2003.
 - 29) 安部仁晴 : ラット耳下腺の成長発育に伴う神経分布の免疫組織化学的研究. *奥羽大歯学誌* **24** ; 45-58 1997.
 - 30) 向山洋介 : 末梢神経により誘導される血管網再構築. *細胞工学* **21** ; 862-863 2002.
- 著者への連絡先 : 田中三千三郎, (〒963-8611)福島県郡山市富田町三角堂31-1 奥羽大学歯学部生体構造学講座口腔組織学分野
Reprint requests : Michisaburoh TANAKA, Division of Oral Histology, Department of Morphological Biology, Ohu University School of Dentistry
31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan