

ヒト有郭乳頭の成長発育におけるVEGFの局在

安部仁晴 茂呂祐利子 中川敏浩 山本茂久

Immunohistochemical Localization of VEGF in Developing Human Circumvallate Papillae

Kimiharu AMBE, Yuriko MORO, Toshihiro NAKAGAWA and Shigehisa YAMAMOTO

Expression of Vascular endothelial growth factor (VEGF) was investigated on the developing human circumvallate papillae by immunohistochemistry.

At fetal 16 weeks, immunoreactivity of VEGF was detected on many cells at epithelial and mesenchymal tissue in the circumvallate papillae. Immunoreactivity of VEGF weakened gradually in developing circumvallate papillae, and was restricted to epithelial tissue at the head of circumvallate papillae and some microvascular endothelial cells in fetal 28 weeks. On the other hand, the taste buds were observed at circumvallate papillae from fetal 16 to 28 weeks, and the immunoreactivity of VEGF was visible at a few cells in taste buds. With regard to the von Ebner's gland primordium, immunoreactivity of VEGF was found at all of the cells in glands.

These results suggest that VEGF is concerned with the morphogenesis including the angiogenesis on circumvallate papillae. In addition, VEGF may play an important role in the differentiation of taste buds.

Key words : VEGF, circumvallate papillae, human, immunohistochemistry

緒 言

Vascular endothelial growth factor (VEGF)は血管周囲の平滑筋細胞や周皮細胞で産生され、血管内皮細胞に特異的に作用すると考えられていたが、近年、肺¹⁾や腎臓²⁾、心臓³⁾、卵巣⁴⁾などさまざまな組織でその発現が観察され、VEGFの機能は単に血管新生や血管誘導にとどまらず、種々の細胞の増殖や分化にも関連する可能性が示唆されている。

一方、舌乳頭における血管の分布状況に関しては、光顕的ならびに血管鑄型法^{5,6)}により詳細な検索がなされ、舌乳頭には乳頭の外形に一致した複

雑な血管網が形成されることが判明している。しかし、血管網形成に関連する因子および血管新生に影響を及ぼす因子についての報告はほとんどない。

そこで本研究では、舌乳頭の発育過程にVEGFがどのように関与しているかを解明する目的で、ヒト有郭乳頭におけるVEGFの局在とその推移を免疫組織化学的に検索した。

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、胎齢16、

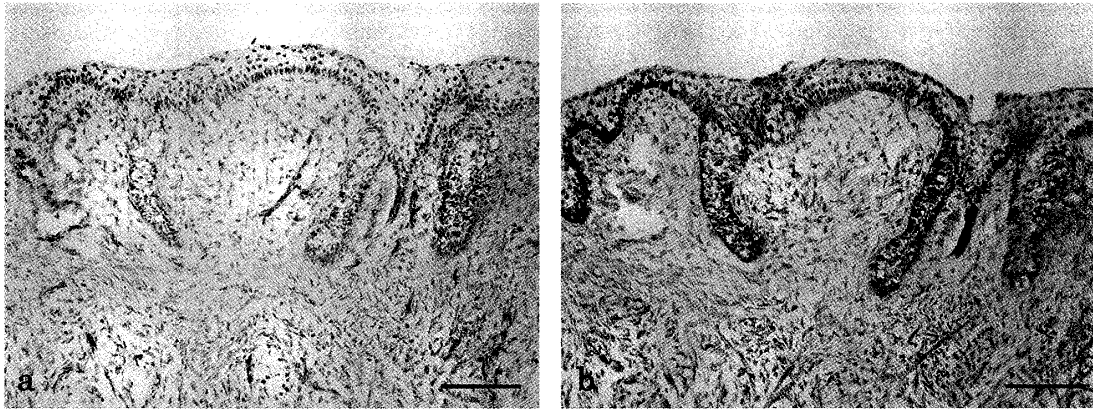


図1 胎生16週齢有郭乳頭 bar: 100 μ m

- a: 抗CD31抗体染色像 乳頭の周囲には口径の大きい血管が分布しており、乳頭内にも血管が侵入、分岐している。
- b: 抗VEGF抗体染色像 抗VEGFの反応は乳頭上皮で強く、粘膜固有層でも血管と間葉組織に広く陽性反応が認められる。

21, 25, 28週齢とした。なお胎齢は体重を考慮のうえ、国友の座高表⁷⁾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10 μ m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除去、10%正常ヤギ血清 (HISTOFINE SAB-PO Kit, ニチレイ, 東京) にて10分間、ブロッキング処理を行った。次いで、一次抗体として、rabbit anti human VEGF (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Cat # sc-152, CA, USA) および血管の分布状況を検出するためにmouse anti human CD31 (CHEMICON, International, Inc. Cat # SCR023-2003788, CA, USA) をそれぞれ10時間反応させた。その後、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、peroxidase標識streptavidin (HISTOFINE SAB-PO Kit, ニチレイ, 東京) を15分間反応させた。発色には0.3% H_2O_2 を含む0.05% 3,3'-diaminobenzidinetetra-hydrochloride (DAB)

溶液 (0.05M Tris-HCL緩衝液pH7.6) を用い、5% methyl green (武藤化学薬品, 東京) にて核染色後、光顕観察を行った。また、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。

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. 胎生16週齢

有郭乳頭は舌背の粘膜上皮よりわずかに隆起し、上皮が乳頭の外形を形成するように増殖していた。乳頭の周囲には口径の大きい血管が分布しており、乳頭内にも血管が侵入、分岐していた (図1-a)。

抗VEGFの反応は、乳頭を含む舌背粘膜上皮に強い陽性反応がみられ、味蕾原基内にも陽性を呈する細胞が観察された。乳頭の粘膜固有層においても血管と間葉組織に広く抗VEGF陽性反応が認められた。しかし、乳頭周囲の血管では、抗VEGFの反応は陰性であった (図1-b)。

2. 胎生21週齢

乳頭側面に輪状溝の形成が開始され、基底側にはエブネル腺原基もみられた。乳頭内の血管は分岐を繰り返す、乳頭上皮直下にまで分布していた (図2~4-a)。

抗VEGFの反応は16週齢と同様に、乳頭上皮に強い陽性反応がみられ、固有層内の血管や間葉組

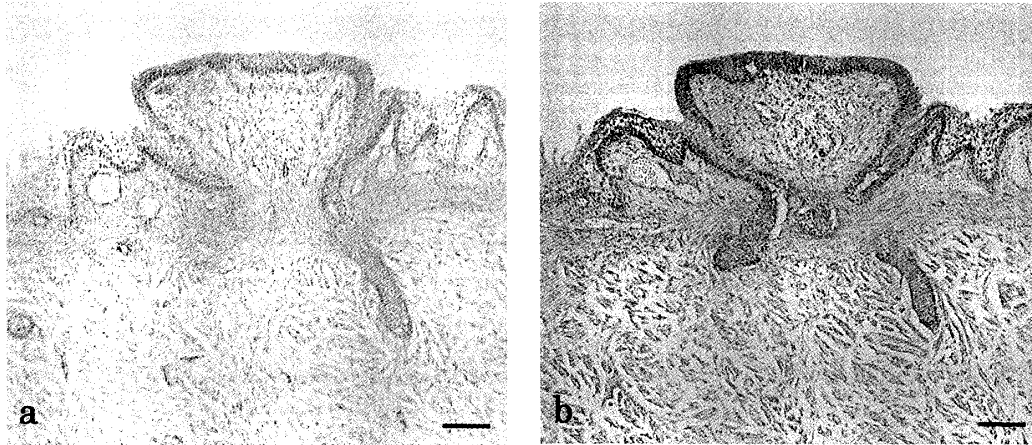


図2 胎生21週齢有郭乳頭 bar: 100 μ m

a: 抗CD31抗体染色像 乳頭内の血管は分岐を繰り返し、乳頭全体に分布している。

b: 抗VEGF抗体染色像 抗VEGFの反応は16週齢と同様に、乳頭上皮で強く、固有層内の血管や間葉組織でも陽性反応が観察される。

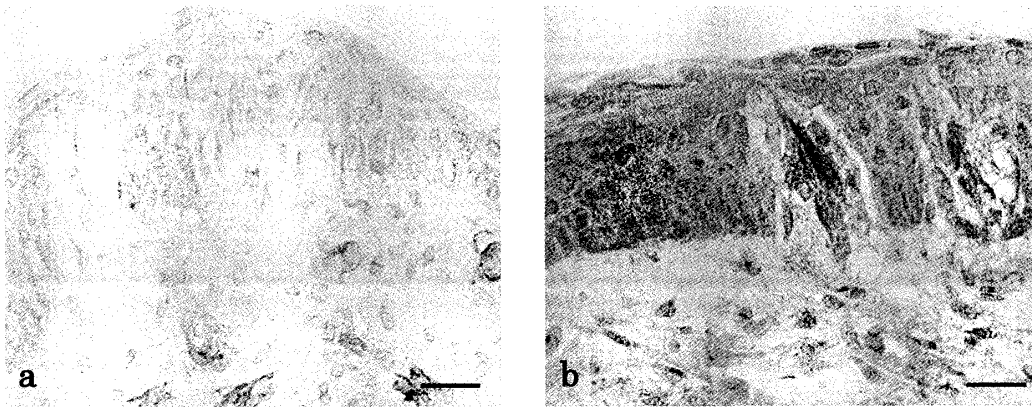


図3 胎生21週齢味蕾の拡大像 bar: 10 μ m

a: 抗CD31抗体染色像 血管は乳頭上皮直下にまで多数分布している。

b: 抗VEGF抗体染色像 抗VEGFの反応は乳頭上皮で強く、固有層内でも陽性反応が観察される。味蕾の一部の細胞は抗VEGF陽性を呈している。

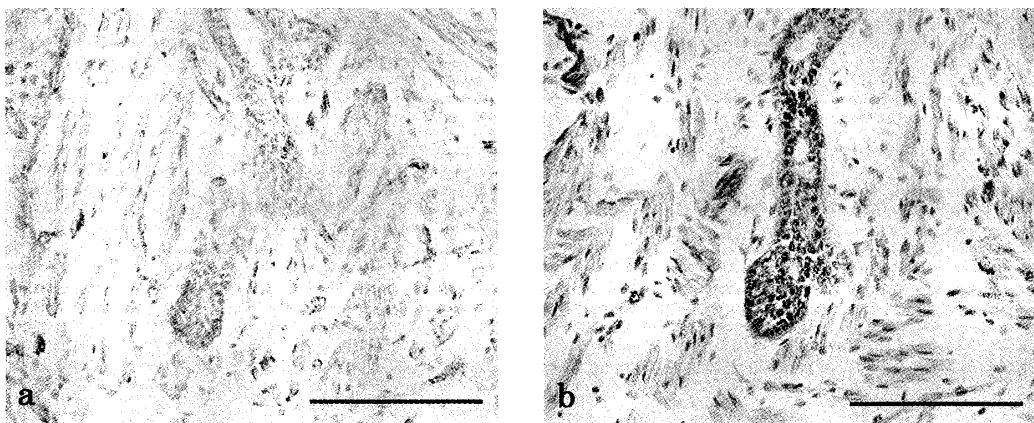


図4 胎生21週齢エブネル腺の拡大像 bar: 100 μ m

a: 抗CD31抗体染色像 エブネル腺原基周囲には微細な血管が数多く分布している。

b: 抗VEGF抗体染色像 エブネル腺原基を構成する細胞すべてに抗VEGF陽性反応がみられ、周囲に分布する血管や筋線維でも陽性反応が観察される。

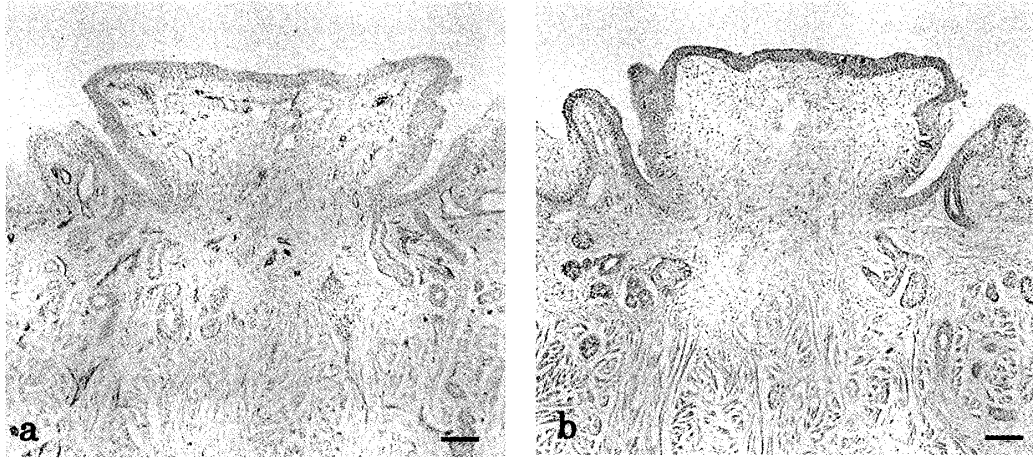


図5 胎生25週齢有郭乳頭 bar: 100 μ m

- a: 抗CD31抗体染色像 乳頭内の血管は21週齢に比べ口径を増し、複雑に分布している。
 b: 抗VEGF抗体染色像 乳頭周囲の上皮で強い陽性反応が観察されるが、固有層では反応性が若干低下している。

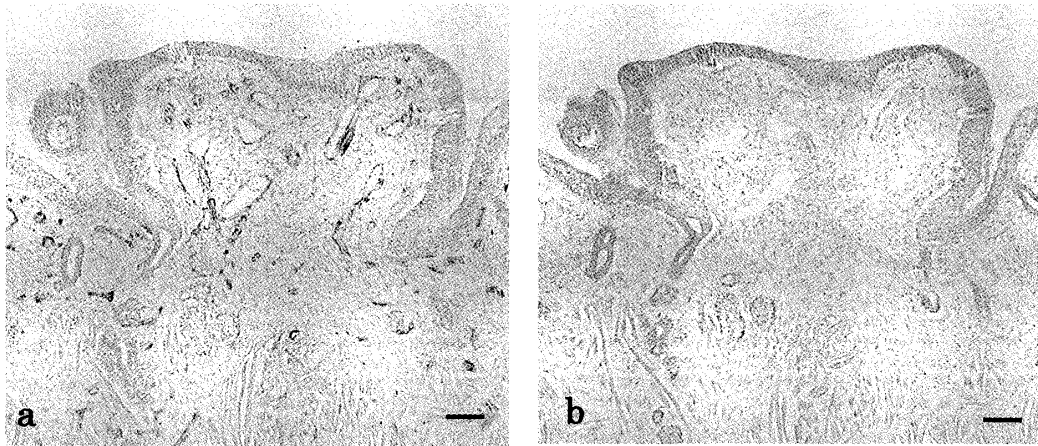


図6 胎生28週齢有郭乳頭 bar: 100 μ m

- a: 抗CD31抗体染色像 乳頭内には多くの血管が密集している。
 b: 抗VEGF抗体染色像 乳頭側面の上皮および乳頭固有層では低下し、乳頭上部の上皮に限局している。多くの血管でも抗VEGF抗体陰性である。

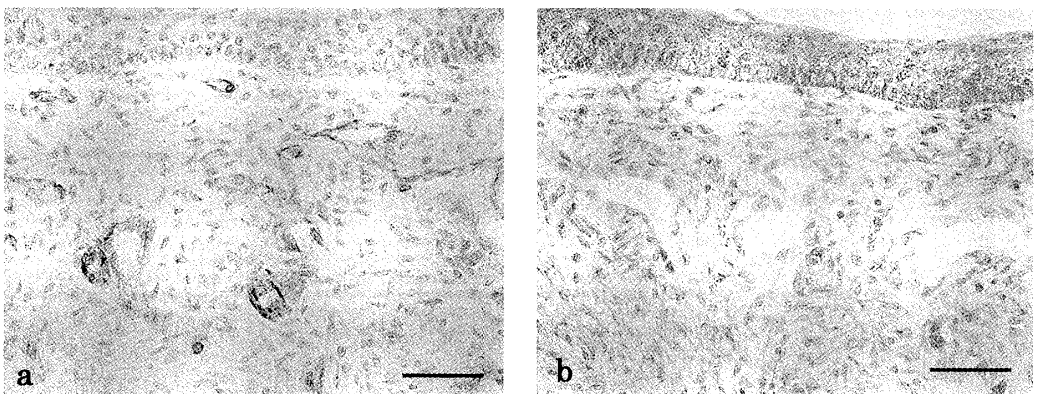


図7 胎生28週齢有郭乳頭上部拡大像 bar: 100 μ m

- a: 抗CD31抗体染色像 25週齢に比べ、上皮直下にも口径の大きい血管が分布している。
 b: 抗VEGF抗体染色像 抗VEGFの反応は上皮で陽性であるものの、固有層では低下している。口径の大きい血管では抗VEGF抗体陰性であるが、微細な血管では陽性である。

織でも陽性反応が観察された。また、味蕾においても一部の細胞に抗VEGF陽性反応が観察された(図2-b, 3-b)。乳頭の基底側では、エブネル腺原基を構成する細胞すべてに抗VEGF陽性反応がみられ、周囲に分布する血管や筋線維にも抗VEGF陽性反応が強く観察された(図4-b)。

3. 胎生25週齢

有郭乳頭は増大し、輪状溝も明瞭となった。エブネル腺原基は分岐を繰り返す、導管の形成もみられた。乳頭内の血管は21週齢に比べ口径を増し、複雑に分布していた(図5-a)。

抗VEGFの反応は、これまでと同様に乳頭上皮で強い陽性反応が観察されたが、固有層では反応性が若干低下していた。また、味蕾は乳頭側面にも形成されており、味蕾に抗VEGF陽性を示す細胞が存在していた(図5-b)。

4. 胎生28週齢

乳頭はさらに発育し、頭部が平坦な広い形態を呈するようになった。乳頭内には多くの血管が存在し、乳頭上部の上皮直下にも口径の大きい血管が分布していた(図6-a, 7-a)。

乳頭上皮における抗VEGFの反応は、乳頭周囲および側面では低下しており、乳頭上部の上皮に限局していた。しかし、味蕾ではこれまでと同様に一部の細胞に抗VEGF陽性反応がみられた。固有層における抗VEGFの反応性も低下しており、口径の大きい血管は陰性であったが、上皮直下に分布する微細な血管では陽性反応が持続していた(図6-b, 7-b)。

考 察

VEGFは血管新生の中心的役割を担い、さまざまな組織、器官の形態形成における血管誘導と血管網の構築に重要であることが報告されている^{8,9)}。

有郭乳頭におけるVEGFの局在は、胎齢16週齢では乳頭固有層内に広範囲に発現しており、25週齢で減弱、28週齢では乳頭上部に限局する傾向を示した。また、連続切片により同部位における血管の分布状況を検索した結果、胎齢16週齢で乳頭内に口径の小さな血管が侵入しており、その後乳頭内の血管は分岐を繰り返す、28週齢では乳頭内には多くの血管が観察され、口径の大き

い血管が上皮直下にまで分布していた。これらのことから血管の侵入領域においてはVEGFの発現が強く、血管の口径の増大に伴いVEGFの発現は減弱し、消失する結果が導き出された。したがって、本研究よりVEGFが有郭乳頭の血管新生に重要な役割をもつことが明らかとなった。

また、胎齢25週齢から乳頭固有層内におけるVEGFの発現が減弱する傾向に転じたことは、25週齢で乳頭内の血管網の外形が完成することと関連すると考える。ヒト有郭乳頭に分布する血管網の形成、発達過程を観察した検索^{5,6)}から、胎齢6ヶ月で乳頭形態に応じた複雑な血管網が構築され、9ヶ月では乳頭外側に多数の小ループを形成することが報告されている。この報告^{5,6)}では胎齢の詳細な週齢は記載されていないが、乳頭外形に応じた血管網が形成される胎齢6ヶ月は、胎齢25週齢の本結果とほぼ一致する。その後の微細なループ状の血管が形成される部位と時期についても本研究におけるVEGFの局在と類似していた。これらの結果からもヒト有郭乳頭において、VEGFが血管の誘導および血管網形成に深く関連することが明らかとなった。

今回、VEGFの発現は胎齢16週齢より舌背粘膜上皮に広範囲に観察され、その後も有郭乳頭の上皮に持続していた。周知のごとく上皮組織に血管は存在せず、発生過程においても血管の上皮組織内への侵入はみられない。基底膜の存在や上皮を構成する細胞の多くにVEGFの局在が認められた点から、乳頭上皮細胞が産生するVEGFが、固有層内の血管新生に影響を及ぼす可能性は考えにくい。近年、VEGFの作用は血管新生のみならず種々の細胞の増殖や分化に関与することが肺¹⁾や腎臓²⁾、歯胚¹⁰⁾などで報告された。今回、上皮でのVEGFの発現は、発生初期には乳頭を含む舌背粘膜上皮に強く広範囲にみられ、発育と共に乳頭周囲および輪状溝に面する上皮で減弱、乳頭上部に限局する傾向を示した。以上の結果および他の組織での報告^{1,2,10)}から、有郭乳頭の上皮細胞の増殖や分化にはVEGFが関与することが示唆される。さらに、VEGFが種々の細胞の増殖・分化に影響を及ぼすことは、乳頭上皮のみならず乳頭固有層内に分布する血管以外の線維芽細胞等の増殖・分化に

も、VEGFが作用するものと考えられる。

一方、有郭乳頭は発生初期より上皮内に味蕾原基が存在し、発育に伴い輪状溝に面する上皮内に多数の味蕾が形成される^{11,12)}。有郭乳頭の発生初期である胎齢16週齢で、乳頭の上皮内に数個の味蕾原基が観察され、抗VEGF陽性の細胞がみられた。その後、乳頭の発育に伴い味蕾の数も増加したが、いずれにおいても抗VEGF陽性細胞は存在していた。これまで、味蕾の形成における細胞増殖因子の影響に関しては数多く報告されているが、VEGFについて検討した報告はみられない。本結果での味蕾におけるVEGFの局在は、数個の細胞に局限しており、味蕾を構成する細胞における抗VEGF陽性細胞が占める割合は、味蕾の発達に関わらずほぼ一定であった。この結果は、味蕾を構成する一部の細胞の分化に、VEGFが関与するものと考えられる。味蕾には4種の細胞が存在しているが、抗VEGF陽性細胞の形態は扁平形を呈しており、味孔に近い部位に存在していたことから、抗VEGF陽性細胞は少なくとも味蕾を構成する細胞の増殖を担う基底細胞ではないものと推察される。そして、抗VEGF陽性細胞が味蕾のⅠ～Ⅲ型細胞のいずれの細胞であるかという点は、今後、免疫電顕により詳細に検討したい。

有郭乳頭の基底部分には漿液性の唾液を分泌するエブネル腺が開口する。胎齢21週齢において、エブネル腺原基が乳頭基底部分に観察され、増齢に伴い原基は深部に増殖、分岐を繰り返し、28週齢では導管系と腺房様の細胞集団の形成がみられた。このエブネル腺においてもVEGFの発現が認められ、発生初期より導管系と腺房様の細胞集団が形成される過程で多くの細胞にVEGFが発現していた。これらの結果からエブネル腺の発生初期の細胞増殖においてもVEGFが関与することが考えられた。なお、エブネル腺原基の細胞が産生するVEGFが血管を誘導するという点については、連続切片による血管の分布状況からみて可能性は低いと考える。また、本研究における観察期間では、腺細胞の分化および唾液の産生と血管新生におけるVEGFの関与について明確な結論を得るまでに至らなかったが、エブネル腺の初期増殖にVEGFが作用することが明らかとなった。

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VEGF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. VEGFの局在は、胎生16週齢では乳頭上皮、血管を含む固有層内に広範囲に観察されたが、発育に伴い減少、28週齢では乳頭上部の上皮とその直下に分布する微細な血管に局限した。

2. 観察期間を通して乳頭上皮には味蕾がみられ、味蕾の一部に抗VEGF陽性を示す細胞が認められた。

3. 胎生21週齢ではエブネル腺の形成がみられ、多くの細胞にVEGFの局在が観察され、28週齢においても持続していた。

以上のことから、ヒト有郭乳頭の血管新生にはVEGFが深く関連することが示唆された。また、乳頭上皮や乳頭固有層の細胞増殖や分化にもVEGFが作用し、有郭乳頭の成長発育に関連する可能性が示された。加えて、味蕾を構成する細胞の分化にVEGFが関連性をもつことが考えられた。

本論文の要旨は、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)において発表された。

文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 石井康徳: ヒト卵巣腫瘍ならびに類腫瘍病変における血管内皮増殖因子(VEGF)の発現とそのサブタイプの発現様式およびその受容体について. *日産婦人科誌* **47**; 133-140 1995.
- 5) Yu, Q. X., Ran, W., Pang, K. M., Philipsen, H. P. *et al.*: The microvasculature of human oral

- mucosa using vascular corrosion casts and india ink injection I. Tongue papillae. *Scanning Microscopy* **6**; 255-262 1992.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Dumont, D. J., Fong, G. H., Puri, M. C., Gradwohl, G. *et al.* : Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Dev Dyn* **203**; 80-92 1995.
- 10) 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.
- 11) 武田正子：ヒト胎児有郭乳頭味蕾の微細構造。解剖誌 **47**; 325-337 1972.
- 12) 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.
- 著者への連絡先：安部仁晴, (〒963-8611)郡山市富田町字三角堂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 : Kimiharu AMBE Division of Oral Histology, Department of Morphological Biology, Ohu University School of Dentistry
31-1 Misumido, Tomita, Koriyama 963-8611, Japan