


学位論文内容の要旨

受付番号	第355号	氏名	柏原祥顕 
論文題名	マウス有郭乳頭における活性酸素合成酵素(Nox)の発現		
指導教員	渡邊弘樹		

論文内容の要旨(2,000字程度)

I 研究目的(300字程度)

活性酸素は、生体の数多くの細胞で常に産生されており、細胞増殖や分化、アポトーシスなど種々の生理学的機能に関与している。この活性酸素を合成する酵素として活性酸素合成酵素(Nox)があるが、器官・組織や細胞種により発現する種類が異なり、その性状の違いも注目されている。

一方舌乳頭は、活性酸素を主とする口腔内ガス環境にさらされており、味蕾におけるシグナル伝達をはじめとする様々な機能は、これらの影響を受けやすいと考えられる。しかしながら、舌背粘膜や味蕾における活性酸素の発生、その合成酵素の発現や動態について詳細に検討した報告は、現在まで認められない。そこで本研究では、マウス有郭乳頭と味蕾における活性酸素の産生有無と、合成酵素のホモログの特徴を知る目的で、各Noxの発現と局在を免疫組織化学的に検索した。

II 研究方法(500字程度)

実験動物には8週齢、雄性C57BL/6NCr1系マウスを用いた。実験方法は、まずマウスをペントバルビタールNaにて腹腔内麻酔後、開胸し生理的食塩水の灌流、4%パラホルムアルデヒド液にて灌流固定を行った。その後舌を摘出、浸漬固定後、パラフィンに包埋、ミクロトームにて連続切片を作製した。切片は脱パラフィン後、0.3% H₂O₂含有メタノール溶液にて15分間処理し、内因性ペルオキシダーゼを不活性化し、ブロッキング、一次抗体、二次抗体による反応を行い、免疫組織化学的観察を行った。一次抗体としてNox1, Nox1, Nox1, Nox2, Nox3, Nox4 抗体、さらに味蕾のII型細胞とIII型細胞を鑑別するため、II型細胞のマーカーである gustducin抗体とIII型細胞のマーカーである SNAP-25抗体を用いた。ABC法を施した後、DABにて発色を行い、5% methylgreenによる核染後、光学顕微鏡にて観察した。加えて、II型とIII型細胞が発現する Noxの種類を判別するため、各Nox抗体と味蕾細胞マーカーを用い二重染色を行い、蛍光顕微鏡にて観察した。なお、実験は奥羽大学動物実験委員会の承認を得て、奥羽大学実験動物指針を遵守し行った。

Ⅲ 研究結果(600字程度)

有郭乳頭の上部上皮において、Nox1, Nox2, Nox3, Nox4およびNoxo1, Noxa1の陽性反応が観察されたが、側方では Nox1, Nox4 および Noxo1, Noxa1に陽性、Nox2では弱陽性、Nox3は陰性であった。乳頭上部上皮におけるNox1, Noxa1の反応は、基底細胞層、有棘細胞層、顆粒細胞層で陽性を呈し、角化層では陰性であった。さらにNox3, Nox4, Noxo1では、基底細胞層で弱陽性、有棘細胞層で陽性、顆粒細胞層で強陽性を示したが、角化層では陰性であった。また、Nox2の反応は、基底細胞層と角化層では陰性であったが、有棘細胞層の一部から顆粒細胞層にかけて陽性を示した。有郭乳頭の粘膜固有層にみられる線維芽細胞、血管内皮細胞では、Nox1, Nox2, Nox4, Noxo1, Noxa1に陽性を示したが、Nox3の陽性反応はみられなかった。

さらに味蕾では、すべての Nox種の発現が観察されたが、その発現パターンは細胞種により異なっていた。Nox1の陽性反応は味細胞に多くみられ、Noxo1は、味細胞と支持細胞に陽性、基底細胞の一部で陽性を示した。Noxa1においては、陽性を示す細胞は少なく、一部の味細胞で陽性であった。Nox2については、陽性を示す細胞は少なく、一部の味細胞に限局していた。Nox3の反応は、味細胞と支持細胞に強陽性であった。Nox4については、味蕾を構成する細胞すべてに陽性反応がみられた。

二重染色から、Ⅱ型細胞が Nox1, Nox3, Nox4および Noxo1, Noxa1を発現する結果が得られ、Ⅲ型細胞では、Nox1, Nox3, Nox4およびNoxo1, Noxa1に加えて、Ⅱ型細胞ではみられなかったNox2が特異的に発現することが判明した。

Ⅳ 考察及び結論(600字程度)

これまで Nox1, Nox3を介した活性酸素の合成にはNoxa1とNoxo1の発現が必要であることが知られており、本研究においても Nox1, Nox3の発現部位とNoxo1, Noxa1の発現部位は、一致していた。このことは、有郭乳頭に発現していたNox1, Nox3は、Noxo1, Noxa1を介して、活性酸素を産生していることを示唆する結果である。また、Nox1とNoxo1, Noxa1が有郭乳頭の各部位で発現していたことから、多量の活性酸素が常に産生されており、活性酸素が何らかの機能に関連することが伺われた。

有郭乳頭の上皮組織における各Noxの発現は、乳頭の特に上部に共通して観察され、いずれの Noxも角化層では陰性であり、基底細胞層から有棘、顆粒細胞層にかけて、徐々に反応性が増強する傾向を示した。この結果は、より表層に近い顆粒細胞層で、Noxを介した活性酸素の合成が活発となり、この活性酸素は生体防御や角化の過程に関与する可能性が考えられた。

さらに、味蕾でも各種Noxの発現が観察され、その発現は味蕾の構成細胞種により異なっていた。味細胞では、多くのNox種が発現し、特にNox1は味細胞に発現が限局していた。この味細胞におけるNox1の機能をNox1 KOマウスの報告から考えれば、Nox1は味覚情報の感受性を高めるために特異的に発現するものと思われた。加えて、味細胞のⅡ型細胞よりもⅢ型細胞において、多くのNox種の発現が観察されたことは、神経線維とシナプス形成をもつⅢ型細胞で、より多くの活性酸素が必要とされる結果であると考えられた。この味覚情報の伝達には、Nox2を介したシグナルが重要な役割を担う可能性が示された。