

論文審査の要旨

報告番号	甲 第 3147 号	氏名	高松 弘貴
論文審査担当者	主査 教授 井上 富雄 副査 教授 中村 雅典 副査 教授 桑田 啓貴		
(論文審査の要旨)			
<p>学位申請論文「Aging-associated stem/progenitor cell dysfunction in the salivary glands of mice」について、上記の主査1名、副査2名が個別に審査を行った。</p> <p>近年、組織の老化に組織固有に存在する幹細胞の老化が関与していることが造血系や中枢神経系などで報告されているが、唾液腺組織においては不明である。そこで、若齢（6週）、壮齢（20週）、老齢（80週）マウスを用い、加齢による唾液腺幹・前駆細胞の数的・質的变化を解析した。80週齢のマウス顎下腺では、6週齢、20週齢と比較し、巣状に炎症細胞浸潤が認められ、軽度の腺房細胞の萎縮を伴った。唾液腺幹・前駆細胞マーカーのCD133を発現する細胞について蛍光抗体法を用いて可視化すると、CD133陽性細胞は、いずれの週齢においても介在部導管に局在した。フローサイトメトリーを用いて、顎下腺上皮細胞中のCD133陽性細胞の割合を求めると、6週齢マウスと20週齢マウスでは、それぞれ4.25%と4.09%であったのに対し、80週齢では2.04%に減少した。さらに、CD133陽性細胞のsphere形成能は、6週齢、20週齢と比較して80週齢マウスで著しく低かった。RNA-seqによる遺伝子発現プロファイルを調べると、CD133陽性細胞の遺伝子発現パターンは6週齢と20週齢マウス顎下腺で類似していたが、80週齢では異なる遺伝子発現パターンを示した。以上の結果より、老齢マウス顎下腺組織では、老化に伴い幹・前駆細胞の数的・質的な減弱が認められ、幹細胞老化の可能性が示された。</p> <p>本論文の審査において、副査の中村委員および桑田委員から多くの質問があり、その一部とそれらに対する回答を以下に示す。</p> <p>中村委員の質問とそれらに対する回答：</p> <ol style="list-style-type: none"> 耳下腺や舌下腺でも顎下腺と同様の結果が得られるか [加齢マウス顎下腺、耳下腺においては炎症性細胞浸潤を認めるが、舌下腺では認めない結果であった。しかし、最近行われている解析においては顎下腺を中心とした内容であり(Choi et al. Arch Oral Biol. 2013)、今後の検討課題である] C57BL/6マウスを使用した根拠は何か [今後CD133の遺伝子欠損マウスでの解析を想定しているため、C57BL/6マウスを使用した] 顆粒性導管ではどのような所見が得られたか [加齢マウス顎下腺組織において若齢マウスと比較して顆粒性導管の増生が認められ、炎症性細胞浸潤を認める箇所では導管の拡張が認められた] 加齢に伴い、Pillar cellには変化は見られたか [Pillar cellに関しては過去の報告でS-100, endothelin-1等の発現が認められることが報告されている(Takeyama et al. Acta Histochem. 2015)。本研究ではPillar cellに対する解析を行っていないため、今後蛍光抗体法等を用いた局在解析が必要と考える] Ki-67陽性細胞とCD133陽性細胞の局在は一致、あるいは異なるのか [本研究においてKi-67陽性細胞とCD133陽性細胞の局在解析に関わるデータは示していないが、それぞれ異なる局在を示すものと一致するものとに分けられると想定される] Ki-67陽性細胞とCD133陽性細胞の局在が異なる場合、どう理解するのか [Ki-67陽性細胞は増殖期細胞において陽性を示すため、CD133陽性細胞の中でも前駆細胞へと分化した細胞は陽性を示すと考えられる] 			

桑田委員の質問とそれらに対する回答：

1. 加齢マウス顎下腺での炎症所見が認められることの意義は何か

[今回の組織学的解析において老齢マウスにおいて一部に炎症巣を認めた。この所見はマウス唾液腺において老化に伴う退行性変化の一つという報告がある(Choi et al. Arch Oral Biol. 2013)。加えて全身的には加齢に伴う代謝経路の異常や酸化ストレスの影響に対して生じたものであると考えられる報告もみられる(Palomera-Avalos et al. Rejuvenation Res. 2017; Maillard et al. Nature 2015)]

2. CD133 の機能を説明せよ

[CD133 とは 5 つの細胞膜貫通ドメインを持つ細胞膜タンパク質であり、癌幹細胞マーカー、組織幹細胞マーカーとして報告されている。CD133 ノックアウトマウスでの造血幹細胞において、CD133 欠損マウスと野生型マウスを比較したところ血球分化に差を生じなかったことが報告されている(Arndt et al. PNAS 2013)。この結果より CD133 幹細胞維持に関わる機能を有していないことが推測される]

3. FoxO3 の幹細胞における機能とは何か

[FoxO3 は転写因子の一つであり細胞の恒常性維持や老化に関与する因子として報告されている。造血幹細胞では ROS の発現を調節しミトコンドリアの機能を維持する因子として報告され、FoxO3 ノックアウトマウスでは ROS の蓄積量が増大し DNA 修復機構に影響を与える因子として報告されている(Bigarella et al. J Biol Chem. 2017)。また、神経幹細胞においても FoxO3 ノックアウトマウスにおいて PIK/Akt 経路の抑制に伴う神経幹細胞数の減少が報告されており、幹細胞維持に必要な因子であるといえる(Ahlenius et al. PNAS 2016; Renault et al. Cell Stem Cell. 2009)。本研究においても加齢に伴い FoxO3 の発現が低下していることから、PIK/Akt 経路の抑制に伴い CD133 陽性細胞も変化を起こしている可能性があるため、今後の研究課題である]

両副査は、上記を含めた質問に対する回答が、いずれも満足のいくものであることを確認した。

主査 井上委員の質問とそれらに対する回答：

1. 若齢マウスと比べた 80 週齢マウスの唾液分泌量がどの程度低下するか

過去の報告を参考にすると、若齢マウスと比較し 90w マウス唾液分泌量は約 2.5 倍、72w マウス唾液分泌量は約 2.0 倍の差が生じていることが報告されている(Choi et al. Arch Oral Biol. 2013; Yoshitaka et al. J Clin Biochem Nutr. 2017)]

2. 80 週齢マウスにおける P16 の発現の著しい上昇と Ki-67 の著しい減少は何を反映すると考えられるか

[P16 は DNA 損傷が起こると活性化し細胞周期停止に関与する分子であり、老化細胞において発現上昇が認められる(Hara et al. Mol Cell Biol 1996)。Ki-67 は増殖期細胞マーカーであり主に増殖期細胞での発現を認める。80w マウス唾液腺において加齢に伴い DNA 損傷が生じ、細胞増殖が停止し P16 が高発現となり、唾液腺組織のターンオーバーが低下した結果 Ki-67 陽性率が減少していることが考えられる。

3. 80 週齢マウスで sphere 形成能が全く観察されなかった原因は何だと考えられるか

[本研究では加齢に伴い ROS の発現を調節する転写因子である FoxO3 の発現低下を認めた。その結果、80 週齢 CD133 陽性細胞では細胞内 ROS 発現が増加し、細胞内ミトコンドリア機能が低下した結果 sphere 形成能に差が生じたと考えられる(Bigarella et al. Development 2014; Ahlenius et al. PNAS 2016)]

4. CD133 陽性細胞の数的・質的变化以外で、80 週齢マウスの唾液分泌能に影響すると考えられる要因はあるか。あるとすれば何が考えられるか

[第一に考えられる要因としては加齢マウスに認められる局所の炎症性細胞浸潤である。その結果、腺房細胞が萎縮し唾液分泌量の減少へと繋がるのが想定される(Bookman et al. Arthritis Rheum. 2011)。その他の要因としては代謝系の変化が挙げられる。糖尿病モデルマウスを用いた解析では加齢に伴い老齢マウスにおけるミトコンドリア内の ATP 産生が若齢マウスよりも低下した場合、唾液分泌量の減少を生じる可能性が挙げられる(Xiang et al. J Cell Physiol. 2020)]

主査の井上委員は、両副査の質問に対する回答の妥当性を確認するとともに、本論文の主張をさらに確認するために上記の質問をしたところ、明確かつ適切な回答が得られた。

以上の審査結果から、本論文を博士(歯学)の学位授与に値するものと判断した。

(主査が記載)