

学位論文題名

Immunohistochemical demonstration of acidic mammalian
chitinase in the mouse salivary gland and gastric mucosa

(マウスの唾液腺と胃粘膜における
acidic mammalian chitinase の免疫組織化学)

学位論文内容の要旨

キチンはN-アセチル-D-グルコサミンが結合した直鎖型の多糖類で甲殻類や節足動物の外骨格、菌類の細胞壁などを構成し、地球上に広く分布する生体高分子である。

一方、キチナーゼはキチンの加水分解酵素であり、それ自身はキチンを持っていない生物も含め生物界に広く分布している。

これまで哺乳類はキチナーゼを産生しないと考えられてきたが、近年、哺乳類において2種類のキチナーゼが同定された。一つは分子量約50kDのchitotriosidaseで、活性化されたマクロファージと好中球で産生されており、キチンをもつ病原体に対する防御の役割を果たしていると考えられる。二番目に同定されたacidic mammalian chitinase(以下AMCase)は、Northern blot解析より、主にヒトとマウスの消化管に存在し、消化酵素としての役割が考えられる(Boot RG et al., J. Biol. Chem., 2001; 276)。

また、ウシの肝臓で産生され血清中に分泌しているCBPb-04が同定された(Suzuki M et al., FEBS Lett., 2001; 506)。これはヒトAMCaseとアミノ酸塩基配列で83.7%と高いホモロジーを示していることから、CBPb-04はウシにおけるAMCaseといえる。

我々はマウスの消化管におけるAMCase mRNAの発現をin situ hybridization法を用いて検索し、耳下腺、エブネル腺および胃底腺に存在していることを報告した(Suzuki M et al., J. Histochem. Cytochem., 2002; 50)が、蛋白レベルでの検索はされていない。

本研究の目的はAMCase産生細胞を蛋白レベルで同定し、分泌液中の存在を検索することによりAMCaseの役割を明らかにすることにある。

【材料と方法】

・免疫染色法

8週齢成熟 ddY マウスを深麻酔後、左心室より4%パラホルムアルデヒドにて灌

流固定し、唾液腺、舌および胃から厚さ 4 μm のパラフィン切片を作製。すべての切片は、ウシ AMCase に対するポリクローナル抗体を用い、ABC 法に従い反応させ、観察した。免疫電顕は、包埋前銀増感金コロイド法を用いた。凍結切片を AMCase 抗体、または抗ヒト α -アミラーゼ抗体と反応させ、1.4nm 金コロイド標識抗ウサギ IgG とで反応させた後、銀増感を行った。

・ Western blotting

耳下腺液は、麻酔下でマウスの耳下腺導管にガラス管を挿入しカニュレーションを行い、無刺激下で採取した。胃液は、24 時間絶食させたマウスを用い、麻酔下で側腹切開後、カニュレを十二指腸から胃内に挿入、幽門部で結紮し、およそ 100 μl の胃液を採取した。また、ヒトの耳下腺液を、歯周病・唾液腺疾患を持たない 5 名の健康ボランティアより、3 %クエン酸を舌に滴下しながら採取用のキットにて耳下腺乳頭から採取し、胃液はファイバースコープにて採取した。ホモゲナイズされた組織から抽出した蛋白と各々の分泌液は、通法に従い Western blotting を行った。

【結果】

・免疫染色法

大唾液腺の中では、耳下腺にのみ強い陽性反応が認められた。全ての腺房細胞の細胞質が顆粒状に染まり、導管部の反応は陰性であった。また、舌においては、エブネル腺の終末部に陽性反応が見られたが、細胞によって反応の強さに差があった。

胃では、胃腺の底部に集中する主細胞が陽性反応を示し、管腔側細胞壁が顆粒状に染まった。

免疫電顕による細胞内局在の結果、耳下腺の腺房細胞では、腺腔付近に存在する分泌顆粒に AMCase 陽性の金コロイド粒子が集積しており、他の小器官や細胞質は標識されなかった。陽性反応を示す分泌顆粒においては、金コロイド粒子は顆粒と顆粒膜の間、つまりハロー部分に集まっていた。一方、唾液中の主たる酵素である α -アミラーゼについて検索した結果、AMCase と同様、顆粒のハロー部分に反応が認められた。

胃腺においては、主細胞の分泌顆粒は金コロイド粒子により顆粒の内容物まで均一に標識された。

・ Western blotting

Lane 1 はコントロールで、分子量約 50kD の精製された CBPb-04 (ウシ AMCase) を泳動したものである。Lane 2 から Lane 5 までの、耳下腺唾液、耳下腺組織、胃液、胃組織では、全て 50kD 付近に一本の強いバンドが現れた。また結果は示していないがヒトの耳下腺分泌液と胃液中にバンドは認められなかった。

【考察】

今回の CBPb-04 (ウシ AMCase) に対する抗体を用いて行った免疫組織化学は、AMCase の存在を細胞レベルで明確にした最初の研究である。免疫染色の結果は、す

でに報告している *in situ hybridization* の結果と完全に一致し、AMCase が耳下腺、エブネル腺および胃で産生されることが遺伝子レベルと蛋白レベルにおいて明らかとなった。

免疫電顕観察では、耳下腺の腺房細胞の分泌顆粒における AMCase と α -アミラーゼを比較したところ、金コロイド粒子は両者とも同様の部位、ハロー部分に集積していた。Marchetti L らは、包埋後金コロイド法を用いて観察した結果、 α -アミラーゼが分泌顆粒内部に集積していることを報告している (Marchetti L et al., *Histol. Histopathol.*, 2000; 15)。今回我々は包埋前金コロイド法を用いた。この方法は抗原性の保存の点では優れているが、抗体の浸透性が劣るという性質を有している為、このような染色像となった可能性が考えられる。

さらに Western blotting の結果より、耳下腺組織、胃粘膜組織、耳下腺液および胃液中におよそ 50kD の AMCase が存在していることが明らかになった。つまり、耳下腺や胃粘膜で産生された AMCase は、分泌顆粒内に存在し、開口放出により細胞外に消化酵素として分泌されることが示唆された。

コントロールであるウシ AMCase は約 50kD 付近に 3 本のバンドが認められる。このキチナーゼはウシの肝臓で産生され血清中に内分泌されている。恐らく血清中に存在しているキチン様の物質により modification または processing されている可能性が考えられる。しかし、耳下腺と胃粘膜の AMCase は一本の強いバンドであることから、耳下腺と胃で産生された AMCase は、このような修飾をほとんど受けることなく分泌されていることが明らかとなった。

また今回の研究ではヒトの耳下腺液と胃液において AMCase は検出されなかった。ヒトの耳下腺におけるキチナーゼ活性物質の存在を報告した論文では、分子量は 35kD とのべられている (Van Steijn GJ, *Eur. J. Oral. Sci.*, 1999; 107)。このことよりヒトの耳下腺は AMCase と異なったキチナーゼを産生しているか、またはヒトの耳下腺に AMCase が存在していても、その含有量が少ないために検出できなかった可能性がある。ヒトの胃での存在について Boot らは述べているが、やはり含有量の少なさから検出されなかった可能性が考えられる。いずれにしても、今後、ヒトにおけるさらなる研究が必要である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 崎 貴 生

副 査 教 授 吉 田 重 光

副 査 教 授 脇 田 稔

学 位 論 文 題 名

Immunohistochemical demonstration of acidic mammalian chitinase in the mouse salivary gland and gastric mucosa

(マウスの唾液腺と胃粘膜における
acidic mammalian chitinase の免疫組織化学)

審査は、吉田、脇田および川崎の各審査担当者が個別に、学位申請者に対して提出論文の内容ならびにそれに関連する学科目について口頭試問により行った。

キチンは昆虫の外骨格、甲殻類の甲羅、菌類の細胞壁などに含まれる多糖類である。多くの生物がこれを分解する酵素であるキチナーゼを持っていることが知られているが、哺乳類では2種類のキチナーゼが同定されている。1つはヒトの活性化したマクロファージや未成熟の好中球が放出するchitotriosidaseで、もう1つはヒトとマウスの消化管において初めて同定された、哺乳類由来のキチン分解酵素であるAcidic mammalian chitinase (AMCase) である。

これまでに、学位申請者らの研究グループは、マウスの唾液腺と胃、およびヒトの胃でAMCase mRNAの発現が高いことを明らかにしているが、蛋白レベルでの発現は未だ確認されていない。そこで学位申請者は、マウスの唾液腺と胃におけるAMCase産生細胞の蛋白レベルでの同定、ならびにマウスとヒトの唾液と胃液中におけるAMCaseの存在を検索した。

AMCase産生細胞の蛋白レベルでの同定は、抗ウシAMCase抗体を用い、灌流固定した8週齢成熟ddYマウスから唾液腺、舌および胃を摘出し、パラフィン切片により光顕的に、また包埋前銀増感金コロイド法により電顕的に観察した。また、唾液と胃液中におけるAMCaseの検索は、マウスの耳下腺液と胃液、ホモゲナイズされたマウスの耳下腺と胃組織から抽出した蛋白、およびヒトの耳下腺液と胃液について、抗ウシAMCase抗体を用いたWestern blottingにより行った。

免疫染色による検索の結果、学位申請者は、唾液腺におけるAMCase陽性反応は、漿

液腺である耳下腺とエブネル腺の腺房細胞のみに認められ、顎下腺や舌下腺、あるいは他の小唾液腺では認められないこと、および胃では胃粘膜基底部の成熟した主細胞のみで認められることを明らかにした。なお、これらの結果は、すでに学位申請者らの研究グループが報告している *in situ* hybridization 法による mRNA の発現と一致していた。一方、Western blotting による検索の結果では、マウスの耳下腺唾液、胃液、耳下腺組織、および胃組織では分子量 50 kDa 付近に一本の強いバンドが観察されたが、ヒトの耳下腺液と胃液では反応は認められなかった。

以上の結果、マウスでは耳下腺の腺房細胞と胃の主細胞において AMCase が産生され、それぞれ唾液中と胃液中に分泌されることが明らかになったことから、学位申請者は、マウスは難消化性のキチンを十分消化できることが示唆されたと述べている。また、ヒトの耳下腺液と胃液の Western blotting による検索で AMCase が検出されなかったことについては、分子量の違いや分泌量の違い、あるいはウシ AMCase 抗体との交叉性などが考えられるので、今後さらなる検討が必要であると述べている。

なお、学位申請者は、ウシでは AMCase が血中に存在することや、ヒトの歯周病ではキチナーゼ活性が高くなるという報告などを引用し、キチナーゼが生体防御に関わっている可能性があるのではないかと推測している。

これに対し、各審査担当者から

1. pepsin 処理が免疫反応に与える影響
2. 胃粘膜における AMCase の反応が成熟した主細胞のみに限られる理由
3. Western blotting でウシ AMCase のバンドが 3 本見られることの意味
4. 他の動物とは異なり、ウシでは AMCase が血中に存在することの意味
5. 歯周病においてキチナーゼ活性が高いことの意味
6. chitinase 発現の比較解剖学
7. 本研究の発展性ならびに将来展望

などに関する口頭試問が行われたが、いずれの質問に対しても明快な回答が得られたことから、学位申請者は本研究に直接関係する事項のみならず、関連分野全般に亘って広い学識を有していると認められた。また、本研究は、哺乳類におけるキチナーゼの役割を明らかにするための一連の研究の中で重要な位置を占めるものであり、研究の将来性も十分に高いと評価された。

そこで主査ならびに副査は、学位申請者は博士（歯学）の学位を授与されるにふさわしいと認めた。