

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11281

研究課題名(和文) 唾液腺の形態形成現象の司令塔Shhシグナルの役割

研究課題名(英文) The Role of Shh in developing fetal mouse submandibular gland.

研究代表者

小山 典子 (Koyama, Noriko)

朝日大学・歯学部・准教授

研究者番号：60367563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、分枝形態形成を促進的に制御するShh/PtchとEGF/ErbB シグナルの関係に着目し検討を行った。その結果、Shhによる分枝形態形成促進効果はEGFRのタンパク質合成とリン酸化亢進によることが分かった。また、顎下腺原基をShhで処理するとErbB1、ErbB2およびErbB3が上皮で、Egf、Tgf- α およびNrg1が間葉で特異的に増加することが分かった。さらに、Shhシグナルの転写因子であるGli1のmRNAも増加していることが分かった。以上の結果より、ShhはEGF/EGFR(ErbB)シグナルの活性化を介して分枝形態形成を促進させることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The fundamental processes of epithelio-mesenchymal interactions depend both on a variety of growth factors and their receptors. Shh are well known as a morphogen that plays many important roles during development of numerous organs. In this study, we investigated the relationship between Shh/Ptch and EGF/ErbB signals of developing fetal mouse SMG. Shh stimulated BrM and induced phosphorylations of ErbB1 and ERK1/2 in SMG rudiments. Shh also significantly induced mRNA syntheses for EGF ligand and ErbB family. Induction of mRNA level of Egf was specific in mesenchyme and inductions of mRNA levels for ErbB1, ErbB2 and ErbB3 were specific in epithelium of SMG rudiments. Gli1 transcription factor level was elevated by administrations of Shh to cultured SMG rudiments. These results suggested that Shh stimulates BrM of fetal mouse SMG through an activation of EGF/ErbB/ERK1/2 signaling systems, and the stimulations by Shh may be regulated by the transcription factor, Gli1.

研究分野：歯科薬理学分野

キーワード：顎下腺 分枝形態形成 上皮間葉相互作用 Shh/Ptch EGF/ErbB

1. 研究開始当初の背景

(1) 顎下腺の分枝形態形成には、上皮間充織相互作用が関与していることが知られている。

(2) 現在までに、間充織から放出される EGF や FGF などの細胞成長因子群が連鎖的に作用することで、顎下腺の形態形成をコントロールしていることを明らかにしている。

(3) SHH は胎生期の発生段階において重要な morphogen であることが知られており、顎下腺の分枝形態形成にも重要な働きをもつとの報告がある。われわれの予備実験の結果、顎下腺原基自身に発現する HH ファミリーの発現量は非常に少ないにも関わらず、顎下腺原基に SHH を添加して 48 時間器官培養すると、顎下腺原基の小葉の数が増加すること、さらに、顎下腺原基の EGF 受容体の発現量が増加することを発見した。

2. 研究の目的

(1) SHH を作用させた時に生じる顎下腺分枝形態形成促進作用の機構を解明する。

(2) SHH 刺激によって EGF 受容体の発現誘導されるメカニズムとその意義を解明する。

3. 研究の方法

(1) 器官培養

胎生 13 日齢の ICR 系マウスより顎下腺原基を採取し、SHH (200, 500, 1,000, 2,500 ng/ml) を添加した DMEM/F12 無血清培地に浮かべたフィルター上で器官培養を行った。培養開始 24, 48h 後に形態変化を観察し、SHH の効果を検討した。また、EGF 受容体チロシンキナーゼの阻害剤 (AG1478), Hedgehog シグナルの阻害剤 (cyclopamine) を作用させたときの形態変化についても同様に観察を行った。

(2) イムノプロット解析

SHH (1,000 ng/ml) で、0h, 6h, 12h, 24h および 48h 刺激した顎下腺を回収し、タンパク質を抽出した。その後、ERK1/2, EGFR (ErbB1) の特異抗体を用いてイムノプロット解析を行った。同様に AG1478, cyclopamine を作用させた場合の変化についても検討した。

(3) リアルタイム RT-PCR

SHH (1,000 ng/ml) で 0h, 0.5h, 1h, 3h, 6h, 12h, 24h および 48h 刺激した顎下腺を回収し、total RNA を抽出した。その試料を用い、*Egf*, *Nrg1*, *Hb-egf*, *ErbB1-4* および *Gli1* の mRNA 発現レベルの変化ならびに、上皮および間葉それぞれの SHH 受容体 (*Patched-1*) の発現量について検討した。さらに、SHH 刺激 6 時間後の顎下腺上皮あるいは間葉における *Egf* の発現量について検討した。

(4) 分離上皮の培養

顎下腺原基をディスペラーゼ (500 U) で処理し、上皮と間葉を分離した。得られた上皮を 50%マトリゲル中で培養し、SHH の上皮に対する直接的な作用を検討した。

4. 研究の成果

(1) SHH を添加して培養すると、顎下腺の分枝形態形成が促進した。その促進効果は、1,000 ng/ml および 2,500 ng/ml の濃度で顕著であったが、200 ng/ml および 500 ng/ml の濃度では認められなかった。

(2) 現在までに、神経幹細胞の SHH による増殖が EGF/EGFR に依存しているとの報告があるため、SHH 刺激による EGF リガンドおよび EGF 受容体の mRNA の発現量をリアルタイム PCR 法にて検討した。SHH 刺激により、時間依存的な EGF リガンド、EGF 受容体および SHH の転写因子である *Gli* ファミリーの mRNA 発現量の相違が認められた。*Egf* は、刺激 6 時間後にピークを迎え、その後徐々に減少し、48 時間後には、コントロールのレベルにまで戻った (図 1Aa)。*Nrg1* は、刺激後 6 時間までコントロールのレベルを維持し、12 時間後に著しく発現が上昇し、24 時間後にピークを迎え、48 時間後には再び減少した (図 1Ab)。*Tgfa* は、刺激後 48 時間で発現量のピークを迎えた (図 1Ac)。しかしながら、*Hb-egf* は刺激後 3 時間から 48 時間にかけて、減少していた (図 1Ad)。

ErbB1 (図 1Ba), *ErbB2* (図 1Bb) および、*ErbB3* (図 1Bc) の発現量は、刺激 3 時間後から 24 時間にわたって上昇し、48 時間後にはコントロールレベルまで減少した。しかし、*ErbB4* (図 1Bd) では、有為な差が確認されなかった。

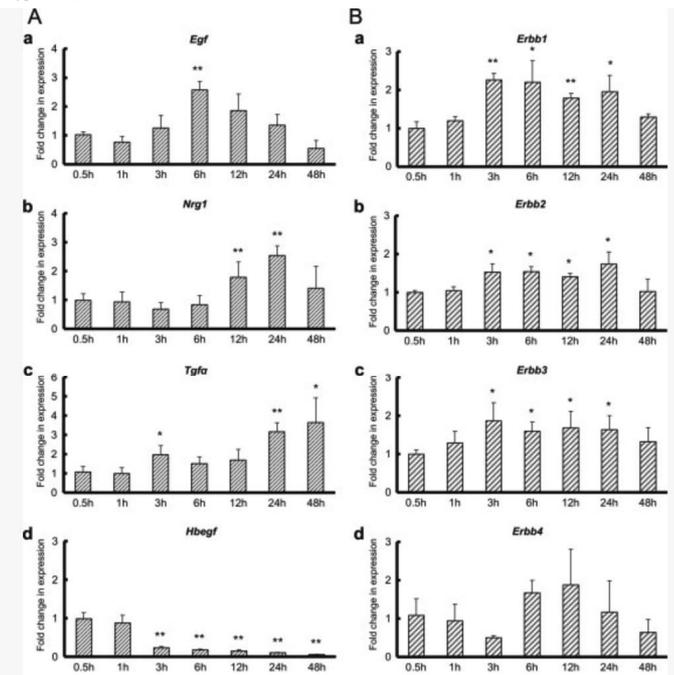


図 1 SHH 刺激による EGF リガンドファミリーおよび EGF 受容体ファミリーの mRNA 誘導パターンの相違

また、SHH の転写因子である *Gli1* は、刺激後 3 時間から 24 時間後にいたるまで、顕著に上昇した (図 2A a)。一方、*Gli2* および *Gli3* に関しては、有為な差は確認できなかった (図 2A bc)。

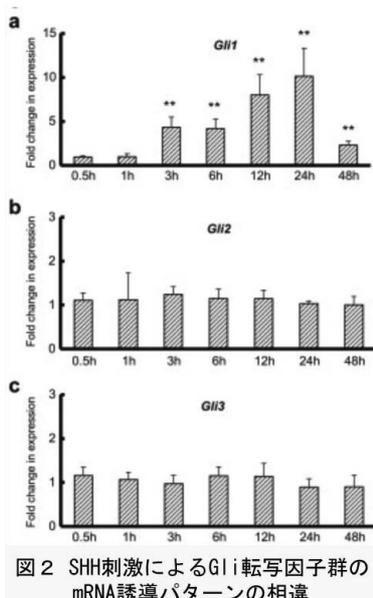


図2 SHH刺激によるGli転写因子群のmRNA誘導パターンの変遷

(3)(2)の結果より, EGF/ErbB シグナル伝達経路がSHHによる分枝形態形成促進作用に関与していることが示唆されたため, 次に, SHH刺激によるEGF受容体のタンパク質合成の変化ならびにEGF受容体のリン酸化状態の変化, および, EGF/ErbBの下流に存在することが知られているERK1/2のリン酸化状態についてイムノプロット法を用い検討した(図3). ErbB1のリン酸化は, SHH処理後6h以降で亢進した. 同時に, ErbB1タンパク質量も増加が認められた(図3A). ERK1/2のリン酸化は, SHH刺激6時間後に上昇し, 12時間まではコントロールレベルにまで戻ったが, その後12時間, 48時間後に再びリン酸化状態が亢進する**二相性**の変化を示すことがわかった(図3B). この**二相性**の変化は, (2)に示したSHH刺激により誘導される, EGFリガンドやErbB受容体ファミリーのmRNA発現量の相違に関与していることが示唆された.

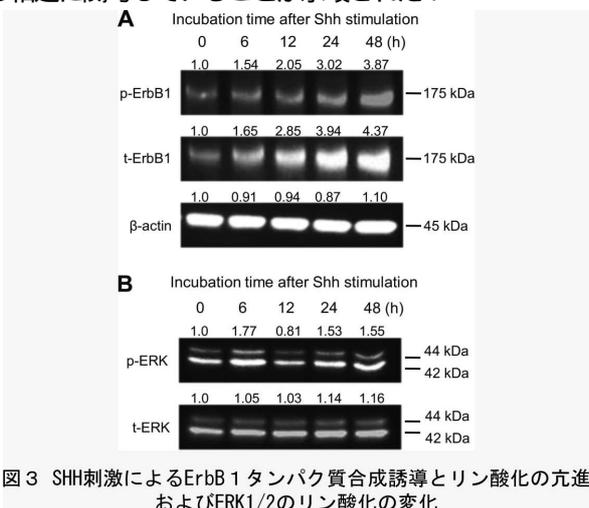


図3 SHH刺激によるErbB1タンパク質合成誘導とリン酸化の亢進およびERK1/2のリン酸化の変化

(4)次に, ErbBあるいはPtchシグナルを阻害することにより, SHHによる分枝形態形成作用にどのように影響するのか検討した. SHHとともにErbB1チロシンキナーゼ阻害剤であるAG1478(10μM)を加えた培養液中で, 胎生13日齢の顎下腺を培養すると, 分枝形態形成が抑制された

(図4A). 同様に, AG1478の処理によりErbB1タンパク質の発現やリン酸化(図4B), ERK1/2のリン酸化が抑制された(図4C).

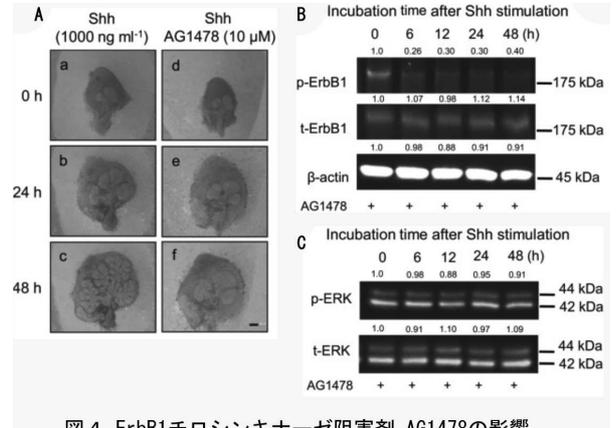


図4 ErbB1チロシンキナーゼ阻害剤AG1478の影響

同様に, ヘッジホッグシグナル阻害剤であるcyclopamineも濃度依存的に分枝形態形成を抑制し, その効果は10μMで顕著であった(図5A). ErbB1タンパク質の発現量やリン酸化, ERK1/2のリン酸化が抑制されることがわかった(図5BC).

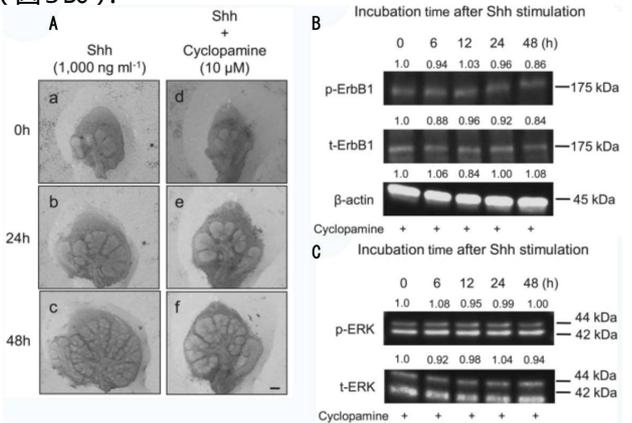


図5 ヘッジホッグシグナル阻害剤cyclopamineの影響

(5)SHHの上皮への直接的な影響を検討するために, 上皮の三次元培養を行なった(図6). EGF(20ng/ml)を添加して培養した顎下腺は, 分枝形成が促進したが, SHH(1,000ng/ml)を添加して培養したものでは, 変化が起らないことがわかった.

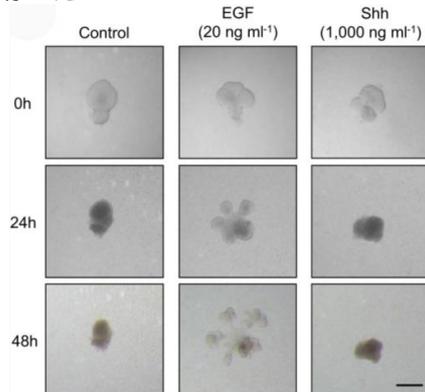


図6 SHHの顎下腺上皮組織に対する影響

(6)(5)の結果より, SHHの顎下腺上皮に対する直接作用は見られなかったことから, SHHは間葉を介して作用している可能性が示唆されたため, SHHの受容体である

Ptch1 がどこに発現しているのか、リアルタイム PCR 法を用いて検討した。その結果、*Patched-1* は上皮および間葉の両方に発現しており、その発現量に有意差は認められなかった。

(7)(2) で、SHH 刺激により顎下腺で EGF リガンドファミリーや ErbB 受容体ファミリーの mRNA の発現量が増加することを確認したが、それら mRNA の発現が上皮あるいは間葉どちらで生じているのか検討を行った。SHH で 6 時間刺激したのち顎下腺を回収し、上皮と間葉を分離した。分離した、上皮と間葉それぞれから RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法にて検討した。その結果、EGF は間葉で顕著な発現上昇が認められた (図 7A)。一方、*ErbB1*、*ErbB2* および *ErbB3* は刺激に回答した上皮組織での顕著な発現上昇が生じることが確認された (図 7B-D)。

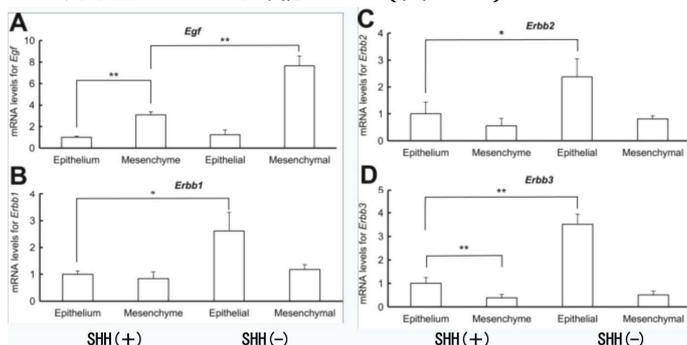


図 7 SHH 刺激による上皮および間葉での EGF, ErbB ファミリー mRNA 発現量の相違

以上研究の成果より、SHH は顎下腺に対する直接的な作用はないが、間葉における EGF ligand の発現上昇と上皮での ErbB 量の増加により EGF/EGFR (ErbB) シグナルの活性化を介して分枝形態形成を促進させていることが明らかになった。これは、現在までに顎下腺の発生過程において明らかにされていなかった HH ファミリーと細胞成長因子 (EGF) との相互作用を解明できたという点で重要な意味をもつ。

引用文献

Borghese, E., The development in vitro of the submandibular and sublingual glands of mus musculus. J. Anat. 84, 1950. 287-302.

Nakanishi, Y., Sugiura, F., and Hayakawa, T., Collagenase inhibitor stimulates cleft formation during early morphogenesis of mouse salivary gland. Dev. Biol. 113(1), 1986, 201-206.

Kashimata, M., Gresik, E.W., Epidermal growth factor system is a physiological regulator of development of the mouse fetal submandibular gland and regulates expression of the alpha6-integrin subunit. Dev. Dyn. 208, 1997, 149-161.

Koyama, N., Hayashi, T., Kenji, Ohno, Larry, Siu, Gresik, E.W. and Kashimata, M., Signaling pathways activated by epidermal growth factor receptor or fibroblast growth factor receptor differentially

regulate branching morphogenesis in fetal mouse submandibular glands. Dev. Growth Differ. 50, 2008, 565-576.

Jaskoll, T., Leo, T., Witcher, D., Ormestad, M., Astorga, J., Bringas Jr., P., Carlsson, P., and Melnick, M., Sonic hedgehog signaling plays an essential role during embryonic salivary gland epithelial branching morphogenesis. Dev. Dyn. 229, 2004, 722-732.

Hashizume, A., Heida, Y., Hedgehog peptide promotes cell polarization and lumen formation in developing mouse submandibular gland. Biochem. Biophys. Res. Commun. 339, 2006, 996-1000.

Reinchisi, G., Parada, M., Lois, P., Oyanadei, C., Shaughnessy, R., Gonzalez, A., and Palma, V., Sonic hedgehog modulates EGFR dependent proliferation of neural stem cells during late mouse embryogenesis through EGFR transactivation. Front. Cell. Neurosci. 7, 2013, 166.

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 3 件)

Masanori Kashimata, Shh and EGF systems cooperatively regulate branching morphogenesis of fetal mouse submandibular glands., SDB 75th Annual Meeting ISD 19th International Conference, 2016

水越堅詞, EGF/ErbB/ERK は Shh/Ptch/Gli システムを介して顎下腺の分枝形態形成を調節する, 第 58 回 歯科基礎医学会学術大会, 2016 年

水越堅詞, Shh は EGF/ErbB カスケードを介して分枝形態形成を調節している, 第 57 回 歯科基礎医学会学術大会, 2015 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 典子 (KOYAMA, Noriko)

朝日大学・歯学部・歯科薬理学分野・准教授
研究者番号: 60367563

(2) 研究分担者

水越 堅詞 (MIZUKOSHI, Kenji)

朝日大学・歯学部・歯科薬理学分野・助教
研究者番号: 90631565

佐藤 慶太郎 (SATO, Keitarou)

朝日大学・歯学部・歯科薬理学分野・講師
研究者番号: 10549041

(3) 研究協力者

柏俣 正典 (KASHIMATA, Masanori)

グレシック エドワード (GRESIK Edward)