

機関番号：3 2 6 6 7

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：2 0 5 9 2 1 5 8

研究課題名 (和文)

唾液腺におけるホルモン受容体の局在とホルモンによる受容体調節機構の解析

研究課題名 (英文)

Immunolocalization of hormone receptors and their regulatory system in the hormonally responsive ducts of the mouse salivary glands

研究代表者

倉淵 眞悟 (KURABUCHI SHINGO)

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号：9 0 1 7 0 0 7 6

研究成果の概要(和文): Androgen と Thyroid hormone の繰返し投与によって、顆粒性膨大部 (GCT) の存在しないマウス耳下腺にも、GCT 様細胞が出現した。この結果、ホルモン依存性 GCT はマウス三大唾液腺導管系における共通の個性であることを示唆する。唾液腺間の GCT 表現型の違いはホルモンに対する感受性の相違、すなわち、ホルモン受容体量の相違(顎下腺>舌下腺>耳下腺)によると考えられる。この仮説を基盤として、市販されている Androgen 受容体に対する抗体を用いた immunohistochemistry と Western blotting 法を試みたが、まだ結果を得ていない。精巣や付属性腺に存在する Androgen 受容体と唾液腺の Androgen 受容体とは分子構造が異なる可能性も考えられる。

研究成果の概要(英文): Granular convoluted tubule (GCT) -like cells in the submandibular gland (SMG), were induced in the striated ducts (SDs) of the parotid gland (PAG) of mouse after the repeatedly injections of androgen and thyroid hormone. This finding and our serial studies suggest that the hormone-dependent GCT is a common characterization in murine three major salivary glands. However, the process of cytodifferentiation from immature granular cells to GCT cells will be varying in each gland. This process is completed in a large population of SD cells in the SMG, with a small population restricted to the sublingual gland (SLG), but all of the SD cells maintain their original form in the PAG. The gland-specific GCT-phenotype might be caused by contents of hormone receptors. However, we have tried unsuccessfully to detect immunolocalization and western blotting of androgen receptor (AR) in the mouse salivary glands, using several commercially available antibodies for ARs. It is conceivable that molecular structures of ARs may be different between the salivary glands and the reproductive organs.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|------------|-----------|-----------|-----------|
| 2 0 0 8 年度 | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |
| 2 0 0 9 年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 2 0 1 0 年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,900,000 | 1,170,000 | 5,070,000 |

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 歯学・形態系基礎歯学

キーワード: 唾液腺、顆粒性導管、アンドロゲン、甲状腺ホルモン、ホルモン受容体、免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

顆粒性膨大部 (GCT) は齧歯類の顎下腺 (SMG) 線条導管 (SD) の特異な領域で、特にマウスでは、♀GCT細胞と比較すると、♂GCT細胞はより豊富な大型の分泌顆粒を含有し、著しく肥大、形態的性差を示す。この性差はAndrogenに依存する。舌下腺 (SLG) SDにも、GCT細胞に類似した顆粒性導管細胞が散在し、上皮成長因子 (EGF)、神経成長因子 (NGF)、Kallikrein、Renin等が免疫染色され (Kurabuchi et al. 2008)、分泌顆粒に含有されていることがわかった。さらに、*In Situ Hybridization*法によりそれら一部の mRNA の局在も報告されている。SLG・GCT様細胞は♂に数多く存在し♀には稀で、SMGと同様に性差を示す。しかし、耳下腺 (PAG) にはGCT様導管細胞は存在しない。

著者らは、SLGとPAGの線条導管に極めて小型の分泌顆粒を含有する領域をTEMで見出しSMG・GCTとの相同性を強調した。この領域は去勢によって消失する事実から、ホルモン依存性の領域であることを示唆した。

著者らの現在に至るSMGを主体とした研究報告から、GCTはマウス腺性Kallikrein (mK1)のみを産生する均一な腺細胞群で発生し、性成熟期を過ぎるとGCTの分泌成分と表現型が変わり少なくとも4種のサブタイプに分化すること、その分化の過程は主にThyroid hormoneとAndrogenに依存し、可逆的に変化すること等を明らかにした (Fig. 1)。成体♂でも、GCT細胞に混在して、未熟な形態を保持している細胞 (SG cell) が僅かながら存在することや、GCT細胞によって表現型が異なる理由は明確ではない。

さらに、この模式図はSLG、PAGにも適応できるが、腺に存在する腺細胞の数や腺細胞の表現型が腺によって異なること等、これらの理由は明確ではない。

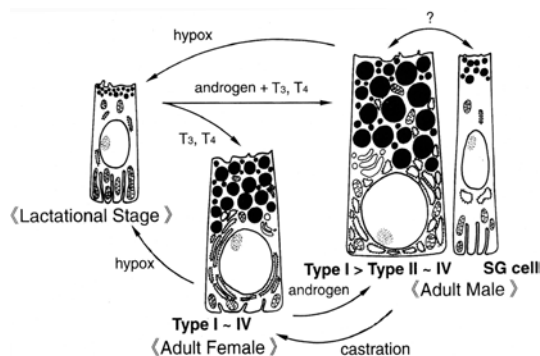


Fig.1 GCT cell phenotype regulated by androgen and thyroid hormone. (Kurabuchi & Hosoi, 日本咀嚼学会誌; 10:61-70, 2001)

2. 研究の目的

ホルモン投与によって、PAGに誘導されたGCT様細胞が含有する分泌成分について検討し、GCT表現型の成熟段階を決定する。さらに、三大唾液腺のGCT分泌機構を比較、検討するために、神経作動薬の作用を調べる。さらに、ホルモン受容体について、その局在と三大唾液腺の含有量を比較したい。これらを検討することによって、GCT細胞間、唾液腺間のGCT表現型の相違について、何らの糸口が得られると思われる。

3. 研究の方法

実験終了時、12週令となるSPF-ICRマウス♂♀を材料とした。すべての実験動物は、日本歯科大学生命歯学部が定めた指針「動物の愛護と管理に関する規定」に従って、飼育管理した。

Injection of hormones

3,5,3'-Triiodo-L-Thyronine (T₃, 1mg/kg 体重; 腹腔注射)、5 α -Dihydrotestosterone (DHT, 20mg/kg 体重; ゴマ油溶解、背面皮下注射)、Dexamethasone (Dex, 10mg/kg 体重; ゴマ油溶解、背面皮下注射)を単独、あるいは組み合わせて、隔日7回、2週間にわたってホルモン処理を施した。

Immunohistochemistry

(1) GCT 特異生理活性物質の検出

冷 2% Glutaraldehyde、2% Paraformaldehyde 混液で還流固定後、唾液腺を取り出し、細切してTechnovit-8100に包埋、2 μ m厚の隣接切片を作成した。

第一抗体; Rabbit Anti-Mouse EGF Antiserum (1:1,000), Upstate Biotech, New York; Rabbit Anti-Mouse NGF (1:2,000), Chemicon, Temecula, CA; Rabbit Anti-Renin Antiserum (1:30,000), a gift from Prof. H. Izumi, Health Sciences University of Hokkaido; Rabbit Anti-mK1 Antiserum (1:30,000), Kurabuchi et al. 1999.

これらの抗体を用いて、蛍光標識法により、免疫染色を施した。

(2) Androgen 受容体の局在

冷 PLP 液、冷 4% Paraformaldehyde 液、あるいは、冷 Zamboni 液で還流固定を施し、顎下腺摘出後、Paraplast 7 μ m厚切片を作成、あるいは、OCT compoundに包埋、凍結後、クリオスタット切片を作成した。免疫染色 (酵素抗体法、DAB 発色) に先だって、クエン酸バッファー (pH5.5) に入れマイクロウェーブ処理を行い、抗原の賦活化

処理を施した。

第一抗体 ; Rabbit Anti-Androgen Receptor Antiserum (1:50~200), Thermo Scientific, USA; Rabbit Anti-Androgen Receptor (C-19: sc-815) Antiserum(1:50~500), Santa Cruz Biotech, CA; Rabbit Anti-Androgen Receptor (ab74272) Antiserum (1:50~200), Abcam, Cambridge, MA.

Western Blottig Analysis

成体♂♀マウスから SMG、精巣、前立腺を取り出し、重量当たり、9 volume の Lysis buffer でホモジネート、遠沈後、上清を凍結保存した。電気泳動後、PVDF 膜に転写、上述の第一抗体を用いて Western Blot を行った。

4. 研究成果

PAG に誘導した GCT 様細胞の組織学的解析についての概要は、MINI-REVIEW (Kurabuchi et al. 2009) として総括した。

Repeated androgen and thyroid hormone injections modulate duct cells

Figs. 2, 3 に示すように、DHT+Dex+T₃ と DHT+T₃ との組み合わせで最も高い頻度で GCT 類似の細胞が PAG 線条導管 (SD) に誘導された。他のホルモン 2 種の組み合わせや単独の投与では誘導率は低い。また、Dex 単独では、全く GCT 様細胞は誘導されないことから、DHT と T₃ が、GCT 表現型の主体となるホルモンで、Dex は補助的な役割を担うと判断した。

これらの結果から、元来は PAG・SD には GCT

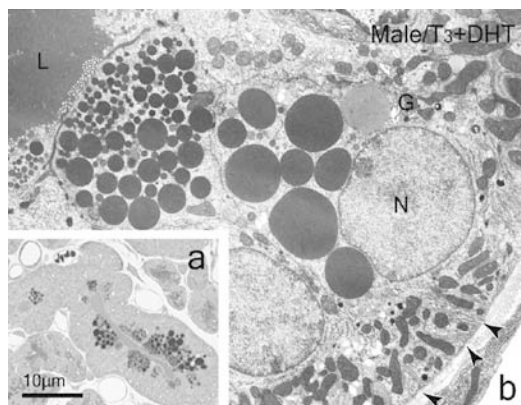


Fig. 2 Light microscopic (Heidenhain's iron hematoxyline staining) and TEM micrographs of hormone-modulated duct cells in PAGs from male mice. G, Golgi apparatus; L, lumen; N, nucleus of GCT-like cells. (Kurabuchi, Odontology; 10:61-70, 2006)

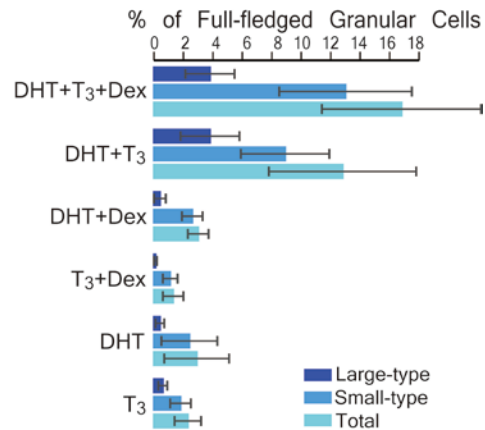


Fig. 3 Bar graph showing the percentage of full-fledged granular (GCT like) cells in the interlobular SD segments of PAGs from male mice injected with DHT, T₃, and Dex, either alone or in combination. (Kurabuchi, Odontology; 10:61-70, 2006)

細胞は存在しないが、Androgen と Thyroid hormone によって GCT 細胞の誘導が可能であることがわかった。この事実は、ホルモン依存性 GCT はげっ歯類三大唾液腺の導管系共通の個性であることが明らかとなった。唾液腺によって GCT 表現型が異なる理由は、ホルモン感受性の相違、すなわち、ホルモン受容体の量的な相違に因ることが考えられる。

Immunocytochemical characterization of hormone-induced granular duct cells

PAG・SD に誘導された GCT 様細胞の顆粒の含有物質を免疫組織学的技法で調べてみる (Fig. 4) と、最も表現型が向上した GCT 細胞の

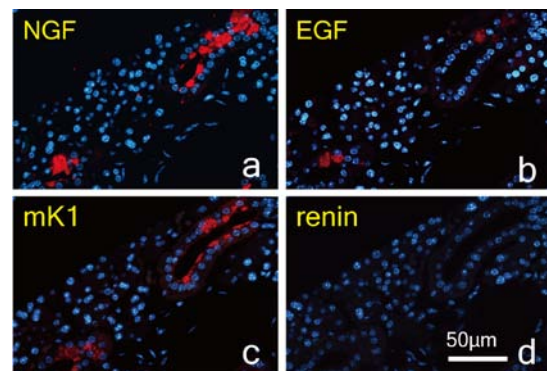


Fig. 4 Immunofluorescence micrographs (Cy3, red) for NGF (a), EGF (b), mK1 (c), and renin (d) in semi-serial sections of PAGs from male mice, injected with T₃+DHT. (Kurabuchi & Hosoi, Odontology; 97:57-61, 2009).

分泌顆粒には mK1、EGF、NGF が認められたが、renin は検出されなかった。SLG・GCT 細胞は、SMG・GCT 細胞と同様に、renin も産生するので、PAG に誘導された GCT 細胞は SLG の GCT 様細胞よりも、さらに未熟な段階の細胞であることが明らかとなった。

Discharge of secretory granules in response to autonomic agent

前述のごとく、DHT+T₃ との組み合わせ投与を施し、PAG に GCT 細胞を誘導した♂マウスを材料として、SMG・GCT 細胞の分泌顆粒の放出を誘導することが知られている、副交感神経作動性薬 pilocarpine と交感神経作動性薬 methoxamine の作用を調べた。pilocarpine、methoxamine ともに、注射後、5~10min に SMG では GCT 細胞と腺房細胞 (Fig. 5a)、および、PAG では GCT 様細胞と腺房細胞で、顆粒の分泌が認められた。30min~1h 後、SMG・GCT 細胞と腺房細胞では、分泌顆粒の著しい減少や消失、分泌された痕跡として、大きな空胞が目立った。PAG においても、導管の各所に空胞や少数の分泌顆粒の残存が認められ、腺房細胞も顆粒の消失と空胞が認められた (Fig. 5c, d)。

しかし、SLG では、GCT 細胞、腺房細胞ともに、両者の作動薬注射後、1h においても、分泌顆粒が放出された形跡は認められず、多くの分泌顆粒が注射前と同様に存在した (Fig. 5b)。

三大唾液腺の神経支配について、PAG の場

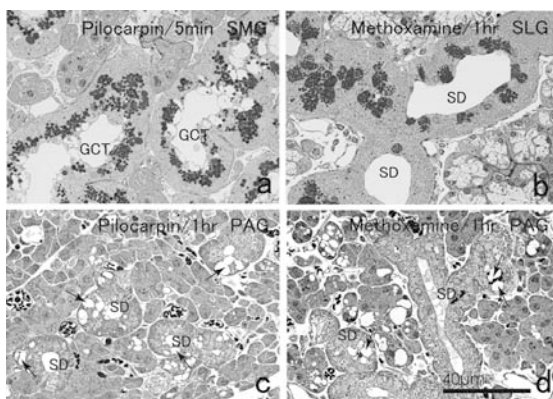


Fig. 5 Sections of the glands of mice, 5 minutes, and 1 hour following pilocarpine injection (a, b) or methoxamine injection (b, d). Any signs of discharging secretory granules are not seen in the granular cells in the SLG striated ducts (SDs) (b), whereas, discharging of secretory granules are prominent in the SMG GCT cells (a), and many vacuoles, suggesting the traces of discharging granules, were seen the PAG SDs (arrows).

合、下唾液核からの遠心路 (副交感神経系) は耳神経節を経て、PAG に至る。上唾液核からの遠心路 (副交感神経系) は顎下神経節を経て、SMG と SLG に至る。一方、遠心路 (交感神経系) は、上頸神経節を経て、三大唾液腺それぞれに至る。このように、SMG と SLG は同じ神経支配にもかかわらず、SLG の GCT 細胞は今回の神経作動薬には全く分泌反応はみられず、神経支配が異なる SMG と PAG の GCT 細胞、腺房細胞が同じ神経作動薬に反応することは、興味深い。

SLG の GCT 細胞と腺房粘液細胞の分泌調節機構については、今後とも検討する課題であろう。

次に、三大唾液腺における GCT 細胞の表現型の差異はホルモンに対する感受性の相違、すなわち、受容体量の相違 (SMG > SLG > PAG) による可能性が考えられる。この仮説に基づいて、ホルモン受容体の局在について検討した。

上述の市販されている 3 種類の Androgen 受容体に対する抗体を用いて、酵素抗体法による免疫染色を試みた。三大唾液腺について Androgen 受容体の局在を検討したが、目的の GCT 細胞の核には検出されなかった。凍結、クリオスタット切片、及び、パラプラスト切片において、抗原賦活処理を試みたが、現在に至るまで、全く受容体の局在は検出できない状態である。

さらに、Western Blotting 法にて抗体の良否を検討した。Rabbit Anti-Androgen Receptor (AR) Antiserum (Santa Cruz Biotech, CA) においては、250 倍希釈で、精巣、前立腺に複数のバンドが認められるが、どれが特異的であるのか、特定できず、また、SMG においては、特異的バンドは検出できず、この抗体はマウスの組織を認識するのか疑わしい。Rabbit Anti-Androgen

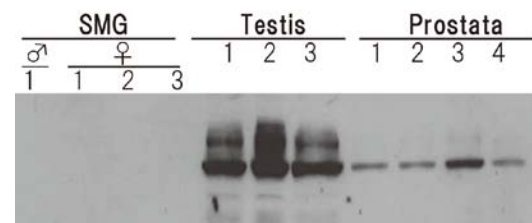


Fig. 6 Characterization of anti-androgen receptor (AR) (Thermo Scientific, USA) by Western Blotting analysis. AR-immunoreactive bands are seen at 110 kD in the extracts of testis and prostate, but not in those of male and female SMGs.

Receptor Antiserum(Thermo Scientific, USA)については、精巣、前立腺で Androgen 受容体を検出したが、顎下腺では目的の位置 110kD には何らのバンドも検出できなかった (Fig. 6)。

マウス SMG では、市販抗体を用いて、免疫組織学的に AR を検出した一つの報告がある (Sawada, Noumura, Zool Sci, 12:243-248, 1995)。GCT の核に AR の局在を認め、GCT 細胞の一部には AR の局在しない細胞核も認められると報告している。著者らも、成体♂GCT は均一な細胞で構成されているのではなく、未熟な形態を保持している細胞や、表現型が異なる細胞の混在を認めている。しかし、残念なことに、上述のごとく、今回購入した市販抗体では、AR の局在と GCT 細胞の表現型を比較、検討することは、現在のところ、成功していない。

生化学的技法を用いて、マウス SMG において、Androgen-binding protein を調べている報告は多い。また、Androgen receptor と記載はあるが、実際は、”the binding of [3H] methyltrienolone to cytosol receptors”を調べているにすぎない。すなわち、精巣とその付属腺の Androgen 受容体と唾液腺のそれが同一のものかは全く記述がないように思われる。今回、試験的に行った Western Blotting の結果 (Fig. 6) が本当たとすると、唾液腺における Androgen 受容体の問題は、さらなる再検討を加える必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

①Sato S, Nakamura T, Ogushi Y, Akabane G, **Kurabuchi S**, Suzuki M, Tanaka S (2011); Expression of a mammalian aquaporin 3 ho-molog in the anterior pituitary gonadotrophs of the tree frog, *Hyla japonica*. Cell tissue Research 343;595-603

②相山誉夫、倉淵眞悟、池田理恵、菊池憲一郎、高田清美、佐藤住美江 (2010); 唾液腺の細胞組織学的研究と臨床応用. 歯学特集号「研究成果と臨床応用」p182-185

③**Kurabuchi S**, Matsuoka T & Hosoi K (2009); MINI-REVIEW: Hormone-induced granular

convoluted tubule-like cells in mouse parotid gland. J Medical Investigation 56;290-295

④**Kurabuchi S**, Hosoi K (2009);

Immunocytochemical study of granular duct cells with a hormonally enhanced granular cell phenotype in the mouse parotid gland. Odontology 97;57-61

⑤**Kurabuchi S**, Gresik EW, Yao C, Hosoi K (2008); Hypophysectomy and hormonal therapy modulate mK1-immunoreactive duct cells in the mice sublingual glands. J Molecular Histology 39;499-507.

[学会発表] (計 1 件)

①**Kurabuchi S**, Hosoi K (2009);

Characterization of hormone-responsible GCT-like cells in the parotid gland of mice. The 11th International Symposium on Exocrine Secretion “Exocrine Secretion — Mechanism and Disease” in Tokushima, July 23~25

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉淵 眞悟 (KURABUCHI SHINGO)
日本歯科大学・生命歯学部・准教授
研究者番号: 90170076

(2) 研究分担者

細井 和雄 (HOSOI KAZUO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
研究者番号: 10049413