

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791973

研究課題名（和文） Snail ファミリーを核とした唾液腺発生の分子機構の解明

研究課題名（英文） Study of molecular mechanisms of salivary gland development by Snail family genes.

研究代表者

谷口 佳孝 (TANIGUCHI YOSHITAKA)

大阪大学・歯学研究科・招聘教員

研究者番号：10551468

研究成果の概要（和文）：上皮間葉移行にかかわる遺伝子として同定された Snail, Slug などの Snail family 遺伝子は、発達過程の唾液腺上皮細胞に発現した。唾液腺発達を観察できる器官培養実験系での Snail family 遺伝子のノックダウン、および遺伝子導入実験の結果から、snail, slug 遺伝子は発達過程の唾液腺組織に発現し、唾液腺発達の分枝発達を促進することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Snail family genes, snail and slug, which were identified as a epithelial mesenchymal transition, were expressed in epithelial cells of developing salivary glands. We examined the effect of gene-knock down and over-expression of snail family genes on development of salivary gland in explant culture. We found that branching development was inhibited by Snail / Slug siRNA treatment and stimulated by Snail / Slug over-expression. These data suggested that Snail and Slug plays stimulatory roles in branching development of salivary gland.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科・外科系歯学

キーワード：唾液腺発達・Snail

## 1. 研究開始当初の背景

上皮間葉移行にかかわる遺伝子として同定された Snail, Slug などの Snail family 遺伝子は、個体の初期発生、器官形成、癌浸潤などに多様な作用をする転写因子群とされている。唾液腺発達においても上皮間葉移行が引き金となり、器官発達が進むことが報告

されている。Sakai らは唾液腺発達のイニシエーションである“くびれ (cleft)”の部位の唾液腺上皮細胞で上皮細胞マーカーである E カドヘリンの発現が低下し、間葉系細胞マーカーであるフィブロネクチン発現が上昇して“くびれ (cleft)”が生じ、その後の分枝発達 (Budding / Branching) が引き起こされることを報告している。すなわち、こ

れは唾液腺発達の初期段階で上皮間葉移行が行われていることを示している。また、今までの Snail, Slug の研究からは、Snail ファミリー遺伝子の上流や下流には、FGF, SHH, PTHrP, Wnt などすでに唾液腺発達に関与することが示されているサイトカイン分子群も研究されている。さらに、上記の上皮間葉移行に関与し、唾液腺分枝発達に関与するフィブロネクチンや E カドヘリンやタンパク分解酵素 (MMPs) も Snail ファミリーにより転写調節を受ける分子とされている。かかる研究背景から、唾液腺発達における Snail ファミリー遺伝子中心として、その機能を解析する研究に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、唾液腺発達の分子機構を明らかにすることを目的とし、そのうち上皮間葉移行に関与する Snail ファミリー遺伝子に焦点を絞り、それらが唾液腺発達に及ぼす影響をきたすかを明らかにする目的で行った。

## 3. 研究の方法

(1) 唾液腺発達での Snail ファミリー遺伝子の発現。

マウス胎仔顎下腺原基は胎生 E12.5 に口腔上皮から蕾状に膨らみ陥入し、その後は cleft, budding (branching) を繰り返し発達する。この E13.5 から E18 および生体マウス顎下腺から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR 法 (Real time PCR 法) でその発現量を検討した。また、その発現部位は免疫染色法および in situ hybridization 法で検討した。

(2) 唾液腺原基器官培養。

マウス胎仔 E13 日齢の顎下腺原基を分離し、ニトロセルロースメンブレン上で無血清 BGJb 培地と気相界面で培養した。分枝発達は位相差顕微鏡下で観察した。

(3) Snail ファミリー遺伝子ノックダウン法。

Snail および Slug 遺伝子に特異的な siRNA をそれぞれ合成し、リポフェクション法で顎下腺原基に遺伝子導入し、器官培養した。siRNA 導入による遺伝子発現低下は定量的 RT-PCR 法で確認した。

(4) Snail および Slug のアデノウイルス遺伝子導入。

全長の Snail および Slug 遺伝子を CMV プロモーター下流に組み込み、アデノウイルスベクターに組み込んだ。HEK293 細胞でアデノウイルス組み換え体を作成し、その細胞溶解液から濃縮した。アデノウイルス濃縮液の感染

効率は HEK293 細胞でのブランク形成率で算出し MOI 計算を行った。

作成された Snail および Slug を含むアデノウイルスを顎下腺原基に感染させて器官培養を行った。対象には LacZ 遺伝子を組み込んだウイルス組み換え体を用いた。導入した Snail および Slug の発現は免疫染色法で確認した。

(5) 唾液腺組織での MMP 活性の測定は器官培養の培養上清を試料としてザイモグラフィで検討した。

(6) 上皮間葉移行は E カドヘリンとフィブロネクチンの免疫染色で検討した。

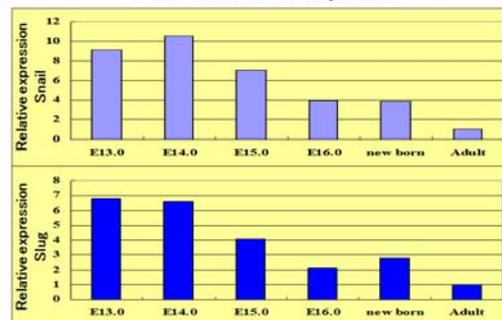
(7) 顎下腺器官培養での顎下腺上皮細胞の細胞増殖能は BrdU の取り込みと p53 タンパクを免疫染色法で評価した。

## 4. 研究成果

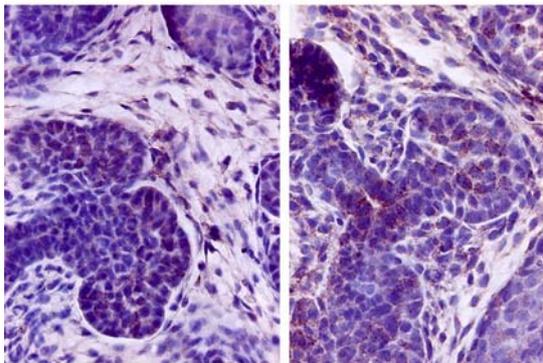
(1) Snail, Slug 遺伝子はともに、唾液腺の分枝発達 (Branching) が最も劇的に引き起こされる胎生 E13.0-E14.0 に最も高発現した。そして、その発現量は胎児期に漸減したが、成体マウス顎下腺においても発現が確認された (図グラフの上; Snail 発現量、下; Slug 発現量)。その遺伝子発現とタンパク発現を in situ hybridization 法と免疫染色法で検討した結果、Snail, Slug は E13.0, E14.0 では唾液腺上皮細胞に優位に発現し、唾液腺分枝発達が起こる“くびれ (cleft)” (IHC の図左) と導管が形成される部位 (IHC の図右) により強く発現した。

また、成体マウス顎下腺では Snail, Slug は導管上皮細胞に強い発現が認められた。

Expression levels of Snail and Slug genes during mouse SMG development

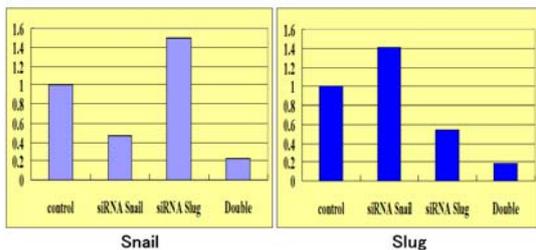


**Expression of Snail in developing SMG (E14.0; IHC)**



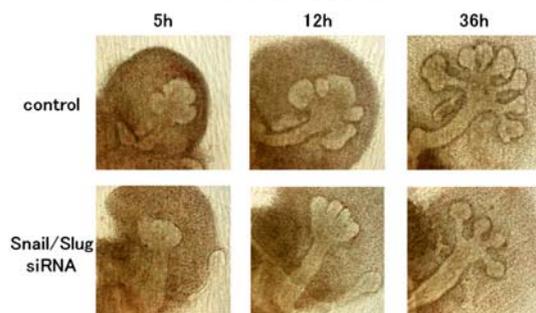
(2) snail, slug に特異的な siRNA をそれぞれ顎下腺原基に導入し器官培養すると、Slug siRNA 導入で Snail 発現が上昇し (左グラフ)、Snail siRNA 導入で Slug 発現上昇し (右グラフ)、それぞれの唾液腺組織での発現が相補的であることが示された。そして、双方の siRNA を導入すると Snail, Slug 遺伝子発現はともに減少した。

**Effects of siRNA for Snail and/or Slug on their gene expression levels**



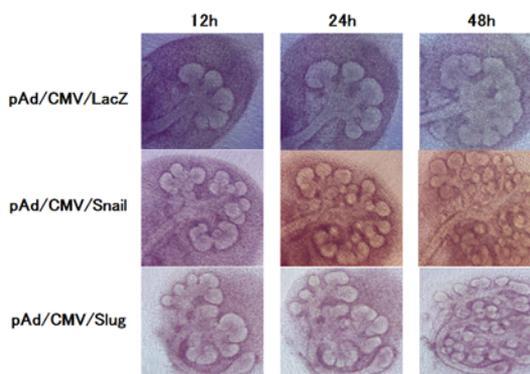
(3) 次に、Snail, Slug 双方に対する siRNA を同時に導入して培養すると、双方の遺伝子発現は約 40%に抑制され、その顎下腺の分枝発達は対照 siRNA 処理に比べて処理後 12 時間より有意に顎下腺発達は抑制された。特に分枝発達が抑制された。

**Effects of Snail/Slug siRNA on SMG development in explants**



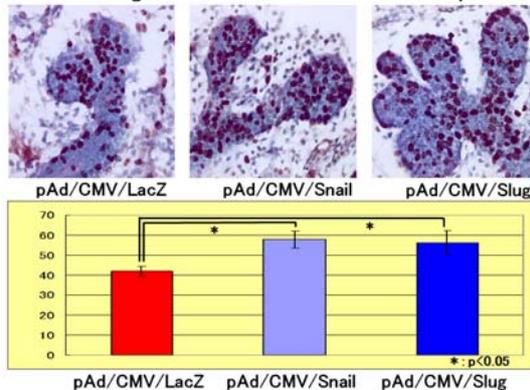
(4) Snail, Slug を組み込んだアデノウイルスをマウス顎下腺の器官培養で顎下腺原基にウイルスを感染させると、導入遺伝子のタンパクは唾液腺上皮細胞と間質細胞に強く発現され、顎下腺の発達、分枝発達が促進された。その発達促進は感染ウイルス量 MOI 依存的であった。snail と slug を導入した顎下腺は、遺伝子導入後 1 2 時間から分枝発達が促進された。図ではそれぞれ、pAd/CMV/LacZ, pAd/CMV/Snail, pAd/CMV/Slug, と示す。

**Effects of Snail/Slug gene transfection on SMG development in explants**

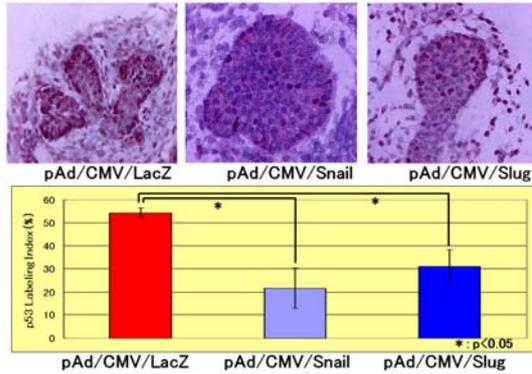


(5) Snail, Slug を導入した顎下腺上皮細胞の BrdU 陽性率は約 60 %で、対照の約 1.5 倍に上昇した。逆に、細胞増殖を抑制する p53 タンパクの陽性率は約 20~30%で対象の約 50%以下に減少した。Snail, Slug が細胞増殖を促進させることが明らかとなった。図は BrdU 取り込みの免疫染色 (上) と p53 タンパクの免疫染色 (次頁) を示す。

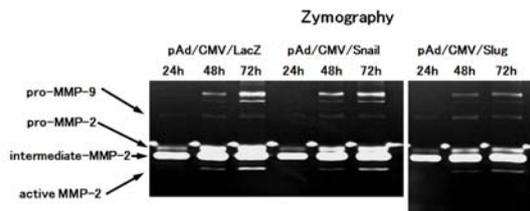
**BrdU labeling in adenoviral transfected SMG explants**



### p53 expression in adenoviral transfected SMG explants



(6) 顎下腺分枝発達のイニシエーションである、E カドヘリン、フィブロネクチンのタンパク発現には影響しなかった。また、snail, slug の下流因子である MMP-2, MMP-9 の活性にも影響しなかった。図は MMP-2, MMP-9 活性を検討したザイモグラフィーの結果を示す。



以上より、マウス顎下腺発達において、Snail family 遺伝子は顎下腺上皮細胞の細胞増殖を促進し、その結果、分枝発達を促進することが明らかとなった。Snail 下流因子として、p53 タンパクが動くことが示唆された。その過程で、snail, slug の古典的な下流因子である E カドヘリン、フィブリネクチン、MMP などへの影響は見られず、それ以外の下流因子を経て顎下腺発達を制御する可能性が示唆された。その一つの候補が p53 であることも示唆された。

今後も Snail family 遺伝子で制御される遺伝子発現について検索を行い、顎下腺発達の分子機序を明らかにできるものと考えている。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

谷口 佳孝 (TANIGUCHI YOSHITAKA)

大阪大学・歯学研究科・招聘教員

研究者番号：10551468