

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861547

研究課題名(和文)唾液腺上皮組織の発生および再生におけるWntシグナルの役割の解明

研究課題名(英文) Investigation of the effect of Wnt signaling on salivary gland development.

研究代表者

藤井 慎介 (FUJII, SHINSUKE)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教(常勤)

研究者番号：60452786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Wntシグナルが顎下腺上皮組織(導管および腺房)の形態形成(成長および分岐形成)に与える影響とその機構について明らかにした。

In vitro実験系としてのマウス胎児顎下腺由来上皮単独培養系において、Wnt分泌阻害剤存在下では、形態形成が抑制された。また、Wnt/ β -カテニン経路を活性化すると、導管において、前駆細胞数の増殖能(Ki67陽性細胞数の増加)が促進した。薬剤誘導性安定型 β -カテニン発現マウス(Cttnb1(Ex3) $^{-/-}$)由来の唾液腺上皮組織では内腔を伴う腺房数が減少し、AQP5およびPSP発現の減少、そして細胞内シグナル伝達AKTのリン酸化が抑制された。

研究成果の概要(英文)：In this study, it was shown how Wnt signaling controls epithelial morphogenetic changes, such as growth and branching, and differentiation using the salivary gland as a model. When mesenchyme-free submandibular salivary gland (SMG) epithelium at E13 was cultured with IWP2, a Wnt secretion inhibitor, growth and branching of SMG were suppressed. Activation of Wnt/ β -catenin signaling promoted proliferation of SMG duct progenitor cells which were positive for Ki67 staining. Experiments using genetically manipulated mice (Cttnb1(Ex3) $^{-/-}$) revealed that the numbers of multiple acinar-like structures, defined by the existence of a central lumen, in Cttnb1(Ex3) $^{-/-}$ mice were reduced compared with those of wild type mice. And protein levels of aquaporin 5, parotid secretory protein and phosphorylated AKT in Cttnb1(Ex3) $^{-/-}$ mice were suppressed.

研究分野：生化学

キーワード：唾液腺 Wnt 増殖 分化 マウス

1. 研究開始当初の背景

Wnt はリガンドとして機能する分泌性の蛋白質であり、線虫やショウジョウバエからヒトに至るまで保存されており、発生初期における体軸・体節や器官の形成、また細胞の増殖や分化の制御を介して形態形成に参与する。Wnt が細胞膜上の受容体に結合した後に活性化される細胞内シグナル伝達機構にはβ-カテニン経路とβ-カテニン非依存性経路が存在する。

近年、小腸上皮幹細胞の維持や網膜幹細胞の再生過程において Wnt シグナルの活性化が重要な役割を果たすことが明らかになってきた。唾液腺や肺、腎臓等の管腔臓器の発生過程において、上皮組織は間質組織中で伸長と分岐を繰り返し、分岐管腔形態形成が行われる。ノックアウトマウス(KO)を用いた解析から複数の Wnt リガンドが肺や腎臓、乳腺等の管腔臓器形成に参与することは明らかにされているが、唾液腺上皮組織の発生過程における Wnt シグナルの役割とその制御機構については不明である。

私共は、胎生 13 日目のマウスから顎下腺(唾液腺の一種)原基を摘出し、Wnt 分泌阻害剤存在下で 48 時間器官培養したところ、上皮組織のサイズ縮小および分岐形成が阻害されることを見出した。また、Wnt 分泌阻害剤処理によって顎下腺上皮組織前駆細胞マーカーであるサイトケラチン 5 (CK5)の遺伝子発現が抑制され、GSK-3 阻害剤(β-カテニン経路を活性化する)で処理することによって CK5 の遺伝子発現が促進されることを見出した(図 1 参照)。

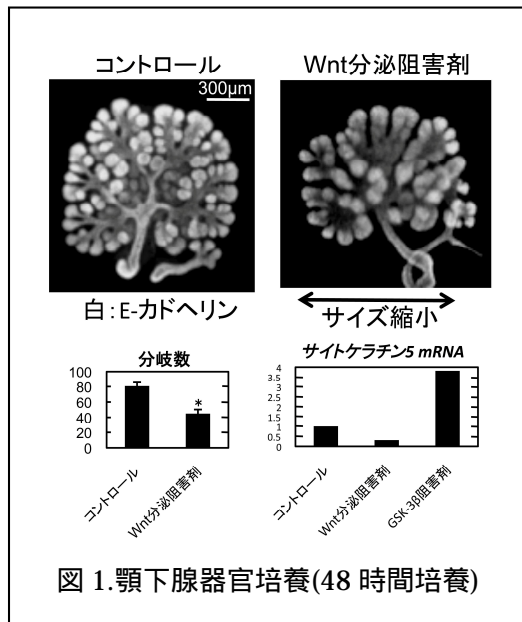


図 1. 顎下腺器官培養(48 時間培養)

これらの結果は内在性 Wnt シグナルが顎下腺上皮組織の形態形成(成長および分岐形成)に参与することを示唆しているが、β-カテニン経路またはβ-カテニン非依存性経路がどのように形態形成を制御するのか、そして、前駆細胞の動態(増殖・分化)をどのように制御しているのか不明である。

2. 研究の目的

本研究では、Wnt シグナルによる唾液腺上皮組織の発生機構を解明するために以下の 2 点を明らかにすることを目的とした。

(1) β-カテニン経路またはβ-カテニン非依存性経路の両経路による唾液腺上皮組織形態形成制御の分子基盤の解明

(2) 唾液腺上皮組織形態形成において Wnt シグナルが導管または腺房細胞の動態(増殖・分化)を制御する機構の解明

3. 研究の方法

(1) 唾液腺上皮単独培養系を用いた解析

In vitro で唾液腺上皮の形態形成を再現できる培養系として、マウス胎児顎下腺原基を胎生 13 日目に摘出し、間質組織をディスペーゼにより除去後、基底膜基質ゲル(マトリゲル)内に上皮原基を埋入して培養する上皮単独培養系を用いた。この培養系において Wnt 分泌阻害剤の存在下での培養または Wnt シグナルを活性化して、その影響について解析した。

(2) 遺伝子改変マウス由来の顎下腺上皮を用いた解析

Wnt5aKO マウスまたは薬剤誘導性安定型β-カテニン発現マウス(β-カテニン経路が活性化されたマウス)由来の顎下腺上皮単独培養を行い、上皮組織形態形成の違いについて対照マウスと比較した。

上記いずれの実験系においても、上皮組織のサイズ(伸長)および腺房の分岐数を経時的に計測した。また、Ki67 を指標とした細胞増殖や、分化に与える影響について各種分化マーカーの発現を定量的 PCR 法、免疫染色およびウエスタンブロット法により検討した。

4. 研究成果

(1) マウス胎児顎下腺上皮単独培養系において Wnt 分泌阻害剤存在下では形態形成(伸長と分岐)が抑制されたことから、顎下腺上皮から分泌される Wnt リガンドが形態形成に重要な役割を果たすと考えられた(図 2)。Wnt シグナルにはβ-カテニン経路とβ-カテ



図 2. 顎下腺上皮単独培養法 (72 時間培養)

ニン非依存性経路が存在する。そこで、顎下

腺上皮に対して、 β -カテニン経路を活性化するために Wnt3a または GSK-3 阻害剤 (CHIR99021)、または、 β -カテニン非依存性経路を活性化するために Wnt5a で刺激し培

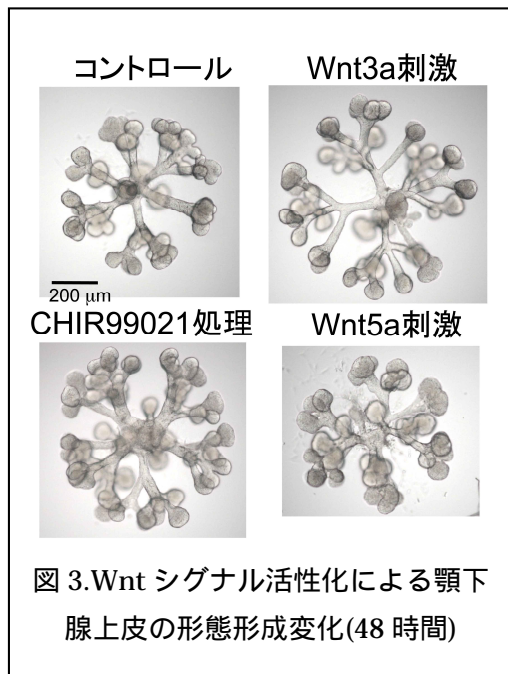


図 3. Wnt シグナル活性化による顎下腺上皮の形態形成変化(48 時間)

養したところ、 β -カテニン経路を活性化した場合にのみ形態形成(伸長と分岐)が促進した(図 3 参照)。

唾液腺上皮は腺房と導管から構成されており、導管において β -カテニン経路の標的遺伝子の発現が高かったことから、導管におい

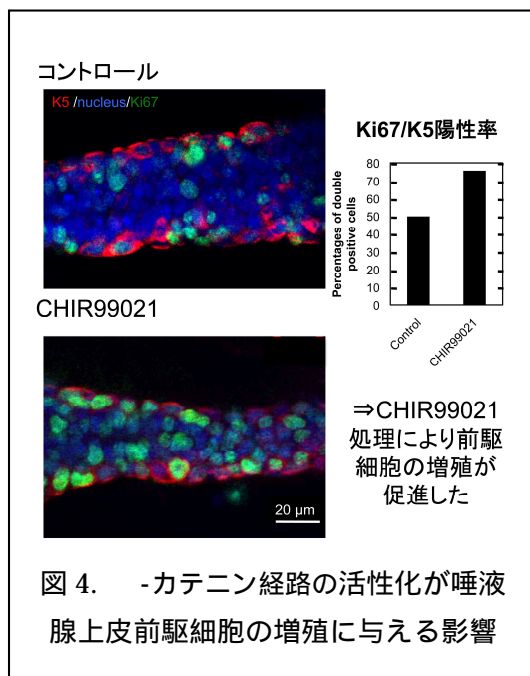


図 4. β -カテニン経路の活性化が唾液腺上皮前駆細胞の増殖に与える影響

て内在的に β -カテニン経路が活性化されていると考えられた。また、 β -カテニン経路を活性化すると導管において、顎下腺上皮組織前駆細胞のマーカである CK5 陽性細胞数の増殖能(Ki67 陽性細胞数の増加)が促進していた。これらの結果から、Wnt/ β -カテニン

経路が導管において前駆細胞の増殖を介して、形態形成を制御すると考えられた(図 4 参照)。

(2) β -カテニン非依存性経路のリガンドの一つである Wnt5a KO マウスから顎下腺上皮を胎生 13 日目に摘出し、コントロール群と比較したが、形態にほとんど影響がなかった。

薬剤誘導性安定型 β -カテニン発現マウス (*Ctnnb1*^{(Ex3) $\Delta\Delta$})由来の唾液腺上皮組織の形態形成の違いについて対照マウスと比較した。胎生 17 日目 *Ctnnb1*^{(Ex3) $\Delta\Delta$} マウス顎下腺では腺房の細胞において細胞質内において β -カテニンの蓄積および標的遺伝子 *Lef1* が顕著に発現上昇した。また、顎下腺全体の大きさには変化はないが、内腔を伴う腺房数が *Ctnnb1*^{(Ex3) $\Delta\Delta$} マウスにおいて減少した(図 5 参照)。このことから β -カテニン経路が腺房細胞の分化に影響を与えていることが予測されたため、分化マーカーの発現について検討したところ、アクアポリン 5(AQP5)が対照群

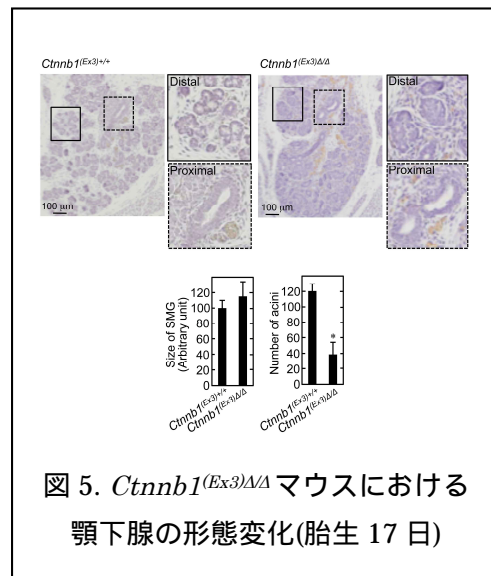


図 5. *Ctnnb1*^{(Ex3) $\Delta\Delta$} マウスにおける顎下腺の形態変化(胎生 17 日)

では頂端部に認めるが、*Ctnnb1*^{(Ex3) $\Delta\Delta$} マウスでは細胞内に不均一に拡散していた。また、

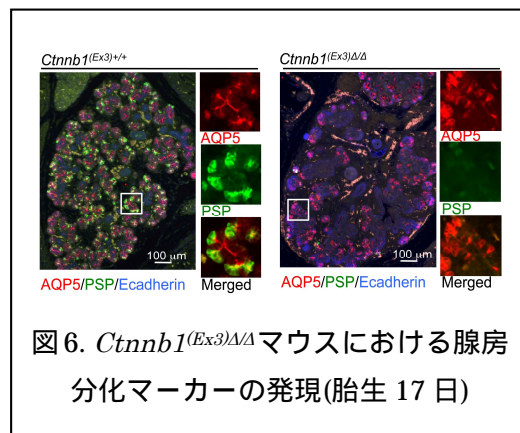


図 6. *Ctnnb1*^{(Ex3) $\Delta\Delta$} マウスにおける腺房分化マーカーの発現(胎生 17 日)

Ctnnb1^{(Ex3) $\Delta\Delta$} マウスにおいて Parotid secretory protein (PSP)の発現が減少していた(図 6 参照)。そこで顎下腺組織におけるタ

ンパク質の発現量について検討したところ、PSP および AQP5 の減少、そして細胞内シグナル伝達の一つ AKT のリン酸化が抑制されていた。これらの結果から、腺房細胞において β -カテニン経路の活性化により AKT シグナルを抑制することにより腺房分化が抑制されたと考えられた(図 7 参照)。

本研究の結果から、Wnt/ β -カテニン経路が導管において前駆細胞の増殖、また、腺房において AKT シグナルを介した分化の制御、これらの機構により顎下腺の形態形成を制御することが明らかとなった。今後、 β -カテニン経路が増殖および AKT シグナルの活性化を制御するメカニズムの解明を行ってきたい。

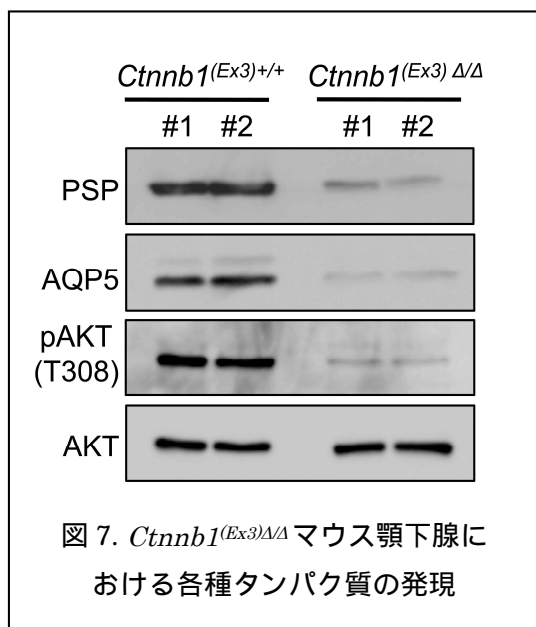


図 7. *Ctnnb1*^{(Ex3) Δ/Δ} マウス顎下腺における各種タンパク質の発現

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 7 件)

Matsumoto S., Kurimoto T., Taketo M., Fujii S., and Kikuchi A. The Wnt-Myb pathway suppresses KIT expression to control the timing of salivary proacinar differentiation and duct formation. *Development*. In press. 査読あり

PII: dev.134486. [Epub ahead of print]

Fujii S., Matsumoto S., Nojima S., Morii E., and Kikuchi A. (2015): Arl4c expression in colorectal and lung cancers promotes tumorigenesis and may represent a novel therapeutic target. *Oncogene*. 34: 4834-4844. 査読あり

DOI: 10.1038/onc.2014.402.

Ibuka S., Matsumoto S., Fujii S., and Kikuchi A. (2015): The P2Y2 receptor promotes Wnt3a- and EGF-induced epithelial tubular formation by IEC6 cells by binding to integrins. *J Cell Sci*.128: 2156-216.8 査読あり

DOI: 10.1242/jcs.169060.

Yuda A., Maeda H., Fujii S., Monnouchi S., Yamamoto N., Wada N., Koori K., Tomokiyo A., Hamano S., Hasegawa D., and Akamine, A.(2015): Effect of CTGF/CCN2 on osteo/cementoblastic and fibroblastic differentiation of a human periodontal ligament stem/progenitor cell line. *J. Cell. Physiol*. 230: 150-159. 査読あり

DOI: 10.1002/jcp.24693.

Matsumoto S., Fujii S., Sato A., Ibuka S., Kagawa Y., Ishii M., and Kikuchi A. (2014): A combination of Wnt and growth factor signaling induces Arl4c expression to form epithelial tubular structures. *EMBO J*. 33: 702-718. 査読あり

DOI: 10.1002/embj.201386942.

Koori K., Maeda H., Fujii S., Tomokiyo A., Kawachi G., Hasegawa D., Hamano S., Sugi H., Wada N., and Akamine A.(2014): The roles of calcium-sensing receptor and calcium channel in osteogenic differentiation of undifferentiated periodontal ligament cells. *Cell Tissue Res*. 357: 707-718. 査読あり

DOI: 10.1007/s00441-014-1918-5.

〔学会発表〕(計 2 件)

Shinsuke Fujii, Shinji Matsumoto, Akira Kikuchi. Arl4c expression is involved in tumorigenesis of colorectal cancer, lung adenocarcinoma and lung squamous cell carcinoma. 第 74 回日本癌学会学術大会、平成 26 年 10 月 10 日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

Shinsuke Fujii, Shinji Matsumoto, Akira Kikuchi. Arl4c expression is involved in tumorigenesis of colorectal and lung cancers. 第 73 回日本癌学会学術大会、平成 26 年 9 月 27 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: Arl4c 遺伝子の発現を抑制する物質又はタンパク質の活性を抑制する物質を含む、癌の治療の為に医薬組成物(核酸を含む)

発明者: 菊池 章、松本真司、藤井慎介

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 2014-99735

出願年月日: 平成 26 年度 5 月 13 日

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
大阪大学医学系研究科・分子病態生化学
<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molbiobc/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 慎介 (FUJII, Shinsuke)
大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)
研究者番号：60452786