

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10054

研究課題名(和文) 唾液腺の発生におけるp130Casの生理的役割の解明

研究課題名(英文) The physiological role of p130Cas in salivary gland development

研究代表者

高 靖 (Gao, Jing)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：40585882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は上皮組織特異的p130Cas欠損マウスを用いて、唾液腺におけるp130Casの生理的役割を解明することを目指した。p130Cas欠損マウスの顎下腺における顆粒性導管(GCT)の未熟な発達が示され、更にGCT細胞で核局在アンドロゲン受容体(AR)が特異的に減少することが示された。ARシグナルの標的遺伝子の発現量がp130Cas欠損マウスで顕著に減り、ARシグナルが抑制されたことが分かった。以上の結果より、p130CasがARシグナル伝達を調節することにより、アンドロゲン依存性顎下腺GCTの発達に重要な役割を果たすことを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唾液の正常な分泌は口腔の組織と機能だけでなく、全身の健康維持に寄与する。唾液分泌の減少は、舌、口腔粘膜を乾燥させ、咀嚼、嚥下、発音や味覚に障害を生じる。現在、口腔乾燥症に対する治療法は根本的なものがなく、組織再生療法など新しい治療法の開発が望まれる。私たちの結果は、唾液腺の発達に関する新たな洞察を提供し、機能低下した唾液腺の回復を促進する治療戦略の提案につながる。さらに、p130Cas はほかの疾患における性差の制御に関連し、p130Cas 関連シグナル伝達は創薬の新たな標的として機能する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We aimed to elucidate the physiological role of p130Cas in salivary glands using epithelium-specific p130Cas-deficient mice. Premature development of granular ducts (GCTs) in the submandibular gland of p130Cas-deficient mice was shown, and nuclear-localized androgen receptors (ARs) were specifically reduced in GCT cells. We found that the expression levels of target genes for AR signaling were markedly reduced in p130Cas-deficient mice, indicating that AR signaling was suppressed. These results suggest that p130Cas plays an important role in the development of androgen-dependent submandibular GCTs by regulating AR signaling.

研究分野：生化学

キーワード：顎下腺 顆粒性導管 AR signaling

## 1. 研究開始当初の背景

p130Cas は v-crk や v-src でトランスフォームされた細胞でチロシンリン酸化された 130kDa のタンパク質として同定された。p130Cas は成長因子やインテグリンシグナルによって細胞内で Focal Adhesion Kinase (FAK) などの様々なタンパク質と複合体を形成するアダプタータンパク質である。p130Cas はアクチンの再構成、細胞の運動能、浸潤性や細胞の生存などに深く関わる。

我々は p130Cas を破骨細胞特異的に欠損したマウスを作製したところ、破骨細胞は波状縁を形成できないことで骨吸収できず、大理石骨病を呈することを報告した。この結果は p130Cas が破骨細胞の「極性化」に必須であることを意味する。p130Cas がアクチンの再構成に深く関係することに加えて、唾液腺や腎臓などの上皮管腔組織に強く発現することから、上皮管腔組織の形態形成・分化に重要な分子の一つである可能性を考えた。

## 2. 研究の目的

我々は上皮特異的なプロモーターであるケラチン 14 の K14-Cre マウスを用いて、上皮組織特異的 p130Cas 欠損 (p130Cas cKO) マウスを作製した。このマウスを用いて、唾液腺の形態形成及び分化における p130Cas の生理的役割を解明することを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) p130Cas の発現細胞の同定: 生後 2 週、3 週および 8 週齢の野生型マウスの顎下腺および舌下腺の組織切片を作製し、抗 p130Cas 抗体を用いた免疫染色を行い、p130Cas の発現する時期と細胞を調べた。

(2) 組織学的解析: 8 週齢の野生型および p130Cas cKO マウスの顎下腺および舌下腺の組織切片を作製し、ヘマトキシリン & エオジン (H&E) 染色した。腺房及び導管系細胞分化マーカー (AQP5 や EGF など) の発現をそれぞれの特異抗体を用いて免疫染色した。形態学的な違いがあるかどうか検討した。

(3) 唾液分泌および成分解析: 機能的な違いがあるかどうか検討するために、野生型および p130Cas cKO マウスをピロカルピンで刺激し、唾液分泌を誘導し、唾液の分泌量とその成分を比較した。

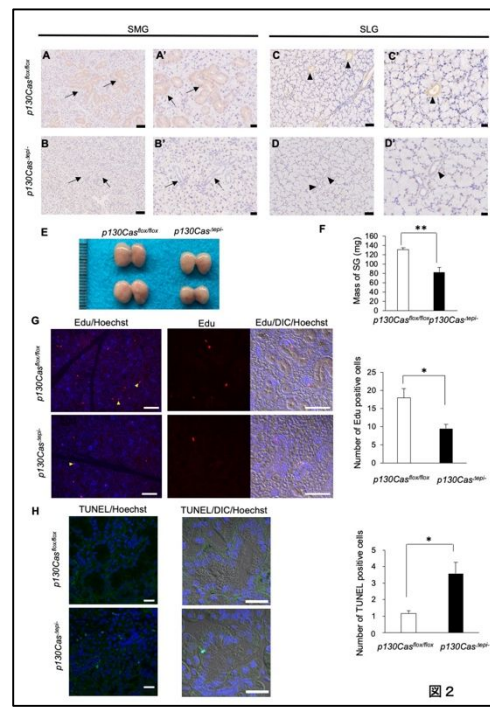
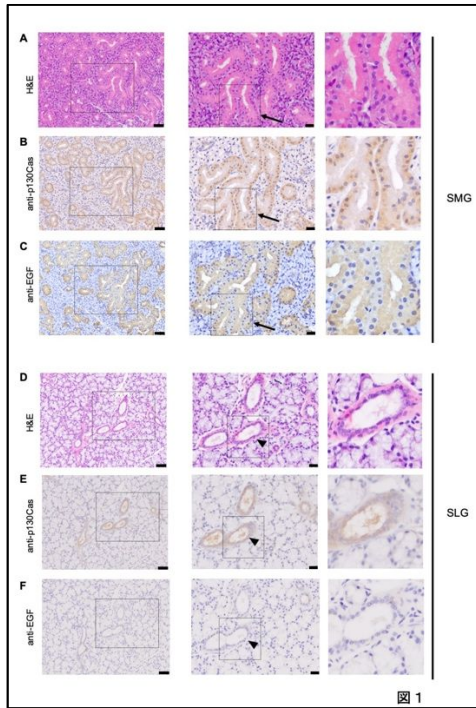
(4) p130Cas cKO マウス唾液腺細胞の細胞増殖とアポトーシスの検討: 野生型および p130Cas cKO マウスに EdU を腹腔内注射し (50 mg/kg)、8 時間後マウスを解剖して、顎下腺および舌下腺の組織切片を作製し、Click-iT Plus Alexa Fluor Picolyl Azide Toolkit を用いて EdU 陽性細胞を。細胞のアポトーシスを検討するために、TUNEL 染色を行う。

(5) 男性ホルモンシグナルと p130Cas の関係の解明: 顎下腺および舌下腺においてアンドロゲン受容体経路のバイオマーカーである Crisp3 や Pmepa1 の mRNA 発現量を検討する。野生型及び p130Cas cKO マウスの血中 testosterone や dihydrotestosterone の濃度を測定する。

## 4. 研究成果

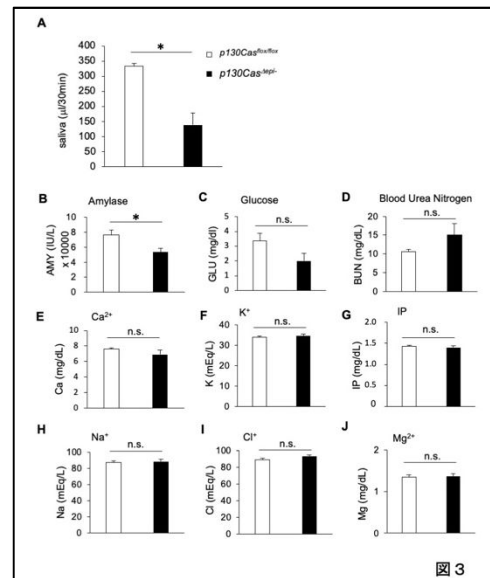
(1) 唾液腺における p130Cas の発現: 生後 (P)42 日目のマウスで抗 p130Cas 抗体を用いて免疫組織化学を行った。p130Cas の発現は、SMG と SLG の両方の導管細胞で観察されが、腺房細胞では観察されなかった。特に、EGF の発現を特徴とする顆粒性導管において p130Cas

が発現することが分かった(図1)。



(2) 上皮組織特異的 p130Cas 欠損 ( p130Cas cKO) マウスは顎下腺と舌下腺の大きさは、コントロールである p130Cas<sup>flox/flox</sup> マウスより小さいことが分かった。唾液腺細胞の増殖とアポトーシスを調べたところ、EdU で標識された細胞の数は、p130Cas cKO マウスでは減少しており、細胞増殖が低いことが示されていた。一方、TUNEL 陽性細胞が cKO で観察されたが、p130Cas<sup>flox/flox</sup> マウスではほとんど検出されなかった(図2)。

(3) 唾液の分泌量と成分分析 : p130Cas<sup>flox/flox</sup> マウスと p130Cas cKO マウスにピロカルピンを腹腔内注射し、30分以内の唾液を採取した。p130Cas<sup>flox/flox</sup> マウスと比較して、p130Cas cKO マウスでは 58%減少した。唾液成分の分析により、p130Cas cKO マウスではアミラーゼレベルが大幅に低下していたが、ほかの無機成分や有機成分には変化が見られなかった(図3)。



(4) p130Cas cKO マウスにおいて顆粒性導管の形成が損なわれた: P42雄マウスの顎下腺と舌下腺の組織学分析を行った。顎下腺組織切片の(H&E)染色により、雄の p130Cas<sup>flox/flox</sup> マウスでは多数の顆粒性導管がよく発達していることが観察されたに対して、p130Cas cKO マウスの顆粒性導管の細胞が小さくて、占める面積は大幅に減少したことが分かった(図4)。

顆粒性導管の発達はアンドロゲン依存性であるため、血清テストステロンレベルと顎下腺におけるアンドロゲン受容体 (AR) mRNA 発現量を調べたが、p130Cas<sup>flox/flox</sup> マウスと p130Cas cKO マウスの間に差は認めなかった。次に、抗 AR 抗体を用いた免疫蛍光染色により、AR のシグナル活性を示す重要な細胞局在を調べた。AR は、p130Cas<sup>flox/flox</sup> マウスの腺房細胞と顆粒性導管細胞の両方の核に局在しているが、p130Cas cKO マウスでは、顆粒性導管の AR 陽性核が劇的に減少していたが、腺房における AR の核の局在は変化しなかった(図4)。

(5) p130Cas cKO マウスの顆粒性導管における AR シグナル経路が損なわれた: 顆粒性導

管に特異的発現しかつ AR 経路の下流標的遺伝子の mRNA レベルを調べた。EGF、NGF、KLK1、Crisp3、Pmepa1、Cftr 及び Runx1 の mRNA レベルは、p130Cas cKO マウスでは大幅に低下していたことがわかった。更に、EGF 及び E-カドヘリンに対する抗体を用いた免疫蛍光染色により、EGF 陽性顆粒が p130Cas<sup>flx/flx</sup> マウスの顆粒性導管細胞の管腔側に豊富に存在することが示されたが、これらの顆粒が p130Cas の欠損により劇的に減少していた。更に、ELISA 法で唾液中の EGF 量も、p130Cas cKO マウスでは減少していた(図5)。これらの結果は、顆粒性導管における p130Cas の欠損が AR シグナル経路の抑制と、その後の顆粒性導管の発達異常を引き起こすことを示した。

以上の結果より、p130Cas が AR シグナル伝達を調節することにより、アンドロゲン依存性顎下腺顆粒性導管の発達に重要な役割を果たすことを示唆された。

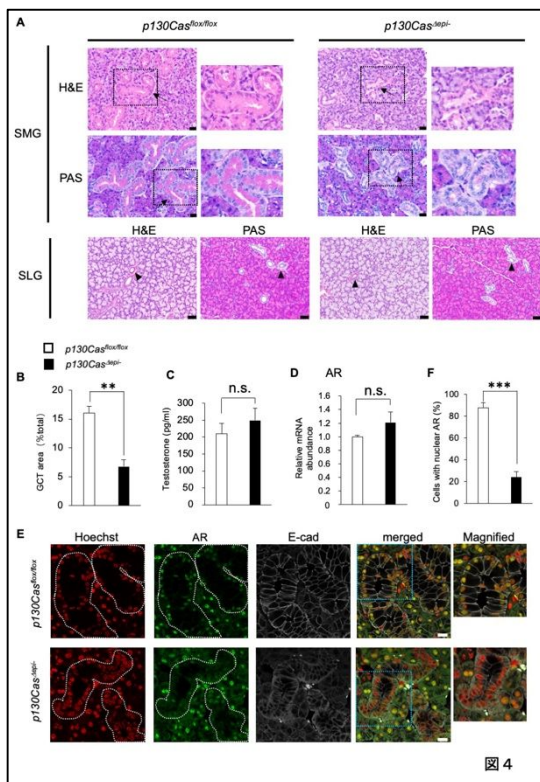


図 4

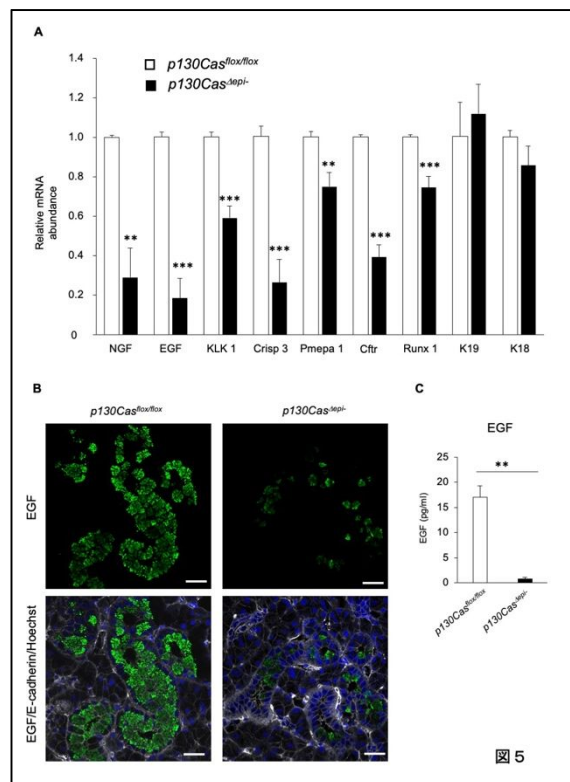


図 5

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 8件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Gao J, Li A, Fujii S, Huang F, Nakatomi C, Nakamura I, Honda H, Kiyoshima T, Jimi E	4. 巻 13
2. 論文標題 p130Cas is required for androgen-dependent postnatal development regulation of submandibular glands	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-32390-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Gao J, Mizokami A, Takeuchi H, Li A, Huang F, Nagano H, Kanematsu T, Jimi E, Hirata M.	4. 巻 135
2. 論文標題 Phospholipase C-related but catalytically inactive protein acts as a positive regulator of insulin signalling in adipocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.258584.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Inoue A, Kiyoshima T, Yoshizaki K, Nakatomi C, Nakatomi M, Ohshima H, Shin M, Gao J, Tsuru K, Okabe K, Nakamura I, Honda H, Matsuda M, Takahashi I, Jimi E.	4. 巻 154
2. 論文標題 Deletion of epithelial cell-specific p130Cas impairs the maturation stage of amelogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2021.116210.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Gao J, Muroya R, Huang F, Nagata K, Shin M, Nagano R, Tajiri Y, Fujii S, Yamaza T, Aoki K, Tamura Y, Inoue M, Chishaki S, Kukita T, Okabe K, Matsuda M, Mori Y, Kiyoshima T, Jimi E.	4. 巻 101
2. 論文標題 Bone morphogenetic protein induces bone invasion of melanoma by epithelial-mesenchymal transition via the Smad1/5 signaling pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 1475-1483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-021-00661-y.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Mukai S, Mizokami A, Otani T, Sano T, Matsuda M, Chishaki S, Gao J, Kawakubo-Yasukochi T, Tang R, Kanematsu T, Takeuchi H, Jimi E, Hirata M.	4. 巻 296
2. 論文標題 Adipocyte-specific GPRC6A ablation promotes diet-induced obesity by inhibiting lipolysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of biological chemistry	6. 最初と最後の頁 100274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100274.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yaginuma T, Gao J, Nagata K, Muroya R, Fei H, Nagano H, Chishaki S, Matsubara T, Kokabu S, Matsuo K, Kiyoshima T, Yoshioka I, Jimi E.	4. 巻 -
2. 論文標題 p130Cas induces bone invasion by oral squamous cell carcinoma by regulating tumor epithelial-mesenchymal transition and cell proliferation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/carcin/bgaa007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Mizokami A, Mukai S, Gao J, Kawakubo-Yasukochi T, Otani T, Takeuchi H, Jimi E, Hirata M.	4. 巻 -
2. 論文標題 GLP-1 signaling is required for improvement of glucose tolerance by osteocalcin.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/JOE-19-0288.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Touyama K, Khan M, Aoki K, Matsuda M, Hiura F, Takakura N, Matsubara T, Harada Y, Hirohashi Y, Tamura Y, Gao J, Mori K, Kokabu S, Yasuda H, Fujita Y, Watanabe K, Takahashi Y, Maki K, Jimi E.	4. 巻 120
2. 論文標題 Bif-1/Endophilin B1/SH3GLB1 regulates bone homeostasis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 18793-18804
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcb.29193.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する



[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 李傲男, 高靖, 藤井慎介, 清島保, 自見英治郎
2. 発表標題 p130cas plays a crucial role in ER-Golgi network formation for cell differentiation of granular convoluted tubules in mouse submandibular glands.
3. 学会等名 第 64 回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高靖, 李傲男, 藤井慎介, 清島保, 自見英治郎
2. 発表標題 マウス唾液腺の機能発現におけるp130Casの役割
3. 学会等名 第94回日本生化学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Aonan Li, Jing Gao, Shinsuke Fujii, Tamotsu Kiyoshima, Eijiro Jimi
2. 発表標題 p130Cas is involved in the development of granular convoluted tubule of submandibular gland in mice
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fei Huang, Jing Gao, Eijiro Jimi
2. 発表標題 The role of serine 536 phosphorylation of NF-kB p65 in the bone loss and obesity in postmenopausal women
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上茜、高靖、吉崎恵悟、進正史、中富千尋、中富満城、岡部幸司、大島勇人、高橋一郎、自見英治郎
2. 発表標題 p130Casのエナメル質形成過程における役割
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高靖、溝上顕子、竹内弘、自見英治郎、平田雅人
2. 発表標題 脂肪細胞のインスリンシグナリングの調節におけるPRIPの役割
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 室屋 龍佑、高 靖、中富 千尋、藤井 慎介、清島 保、自見英治郎
2. 発表標題 唾液腺の形態形成及び機能発現における p130Cas の役割
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	藤井 慎介  (Fujii Shinsuke)  (60452786)	九州大学・歯学研究院・助教    (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件



8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------