

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 11 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592768

研究課題名(和文)唾液腺の管腔構造形成・維持におけるHippoシグナル伝達経路の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of Hippo signaling pathway during salivary gland development in mice.

研究代表者

北川 道憲 (Michinori, Kitagawa)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教

研究者番号：30314496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、マウス唾液腺におけるHippoシグナル伝達経路介在因子の発現と機能を明らかにし、同経路の細胞増殖制御と上皮管腔構造維持機構を明らかにする事を目的とした。マウス唾液腺における各因子の発現解析から、転写共役因子Yapは、胎児唾液腺においては核内に多く局在する一方、成体唾液腺においては細胞質・細胞膜へ局在することが明らかとなった。胎児期唾液腺培養組織において、Yapの翻訳抑制が唾液腺組織の成長を経時的に抑制し、唾液腺の成長あるいは上皮の分枝が有意に低下したことから、Yapの分子機能が唾液腺組織の増殖において重要な役割を持つことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to clarify the role of Hippo signal transduction pathway for cell growth and maintenance of luminal structure in mouse salivary gland tissue. The analysis of gene expression of Hippo factors showed that transcription co-factor Yap protein localized in different manner between embryo and adult salivary gland cells. Inhibition of Yap protein translation decreased growth of salivary gland tissue and branching of epithelium in tissue culture system. The results suggest that Yap has an important role in growth of salivary gland tissue.

研究分野：分子生物学

キーワード：唾液腺 発生 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

唾液腺組織は成体における腺組織の中でも細胞分裂の繰り返しによる再生が高頻度に見られる組織で、適切な細胞増殖と腺構造の再構成が唾液腺組織の維持に重要であり、唾液腺の構造維持機構を分子レベルで解明することは、唾液腺構造の再構成を理解する上で特に重要である。これまでに、唾液腺幹細胞とその細胞分裂制御に関する細胞増殖関連因子の解析が多数報告されているが、胎児期から成体における唾液腺管腔構造の維持とその適切なサイズの制御機構については未だ解明されていない点が多い。

研究代表者は、近年明らかにされてきた Hippo シグナル伝達経路に着目し、唾液腺腺房と導管による管腔構造の形成・維持における同経路の機能解析を行っている。Hippo シグナル伝達経路は、複数のタンパク質リン酸化酵素・核細胞質間移行型の転写共役因子・転写因子によって構成され、細胞外における細胞密度・力学的ストレス等の刺激に応じたシグナルを核内へ伝達し、結合組織増殖因子 CTGF 等の遺伝子発現を調節することによって細胞増殖を制御すると考えられている。同経路はショウジョウバエの遺伝学的解析により発見されたが、哺乳動物においても相同な経路が存在する事が知られており、同経路のシグナル伝達因子の機能不全は様々な器官の構造・大きさの制御異常を示す事が報告されている。ショウジョウバエにおいては成虫原基や翅上皮細胞の増殖制御に関与し、哺乳動物においては、転写共役因子 TAZ の遺伝子破壊マウスが胎児期において腎嚢胞と肺中隔形成異常を示すことが報告されている。したがって、様々な組織に観察される上皮細胞層の伸展・陥入による管腔構造の形成には、Hippo シグナル伝達経路を介した適切な細胞増殖の制御が重要であると考えられる。

研究代表者はこれまでに Hippo シグナル伝達経路の下流に位置する Tead 転写因子の機能解析を進める過程で、その一つである Tead1 遺伝子がマウス胎児期から新生仔における眼の網膜色素上皮細胞層の細胞増殖に重要な役割を果たしている事と、ヒトの網膜色素上皮変性疾患である Sveinsson 脈絡網膜萎縮症(SCRA)の患者に見出された TEAD1 のミスセンス変異が Hippo シグナル伝達経路の介在因子である転写共役因子 YAP/TAZ との結合能損失に起因する事を明らかにしてきた。一方で、Tead1 を含む Tead 転写因子ファミリーは胎児期から成体にかけて様々な組織に広く発現しているが、幾つかの遺伝子破壊マウスは胎児致死を示し、成体における機能はほとんど報告されていない。研究代表者は研究開始前の予備的解析でマウスの唾液腺組織における Tead 転写因子ファミリーの発現について解析したところ、一部の Tead 転写因子ファミリーが唾液腺腺房上皮細胞と導管上皮細胞に発現している事

を見出していた。ショウジョウバエの唾液腺においては、正常な細胞増殖停止に Hippo 経路の介在因子である Warts が重要な役割を果たしている事が報告されているが、哺乳動物の唾液腺における Hippo 経路の役割は明らかとなっていなかった。また、Tead 転写因子を活性化する Hippo シグナル伝達経路の上流は、細胞密度や細胞外基質との接着から受ける力学的ストレスである事が報告されているが、いずれも培養細胞レベルでの解析に留まっていた。

2. 研究の目的

本研究は、マウス胎児期および成体の唾液腺における Hippo シグナル伝達経路介在因子の発現と機能を明らかにし、これらの介在因子とその活性変異体の唾液腺組織への導入、あるいは遺伝子発現を抑制することにより、同経路の細胞増殖制御と上皮管腔構造維持機構を分子レベルで明らかにする事を目的とした。他の研究グループによる同経路介在因子の遺伝子改変マウスの解析では、胎児期から出生前後に致死等の異常を示し、唾液腺の発生過程における Hippo シグナル伝達経路の役割は不明な点が多く存在するが、本研究においては胎児期マウスより摘出する唾液腺組織の培養システムを用いることにより、細胞増殖と管腔形成・維持過程を経時的に観察可能である事、さらに遺伝子発現抑制因子やシグナル伝達経路阻害剤を外来的に添加することにより、同過程における導入因子の機能解析が可能である。これらの手法を用いて、唾液腺組織における各介在因子の分子機能を解明できれば、唾液腺組織の管腔構造維持における同経路の役割を明らかにする上で重要な知見となる事が予想された。

3. 研究の方法

マウス胎児期において唾液腺組織が出現する E12.5 から出生直前の E18.5 まで、あるいは成体マウスの顎下腺組織を用いて、Hippo シグナル伝達経路の転写共役因子 Yap/TAZ、Tead 転写因子ファミリーの発現パターンを、同組織より抽出した mRNA を鋳型とした RT-PCR 法、同組織の凍結薄切片を用いた in situ hybridization 法・免疫染色法により検出する。唾液腺における Hippo シグナル伝達因子の機能解析を目的として、シグナル伝達経路の中心的役割を果たす転写共役因子 Yap/TAZ の遺伝子発現抑制 siRNA, shRNA もしくは翻訳抑制として細胞透過型モルフォリノを設計し、これらの分子の抑制機能を培養細胞系において確認する。マウス胎児より摘出した唾液腺の液性因子透過膜上における培養系を用い、リポフェクションによる各因子を標的とした siRNA の導入、センダイウイルスベクターによる恒常的活性型・優性阻害性変異型因子の導入、細胞透過型モルフォリノの導入および遺伝子

発現の抑制・内在性タンパク質の発現抑制を検証する。 Hippo シグナル伝達経路因子を外来的に活性化あるいは抑制することを目的として、転写共役因子である Yap/TAZ のリン酸化部位をアミノ酸置換する変異を導入し、核内に局在する恒常的活性化型タンパク質を発現するベクターを構築する。 また、Tead 転写因子ファミリーについては、YAP/TAZ との結合能を失う変異型タンパク質を発現するベクターを構築する。 これらの遺伝子発現調節を行った際と同培養系における組織の経時的变化を透過型倒立顕微鏡により観察し、得られた画像データを用いて唾液腺組織・上皮組織の変化を定量的に解析する。 また、Hippo シグナル伝達経路の活性化・不活性化の指標として、既知の Tead 転写因子標的遺伝子の発現量変化を各唾液腺組織より抽出した mRNA を鋳型として定量 PCR することにより求める。

4. 研究成果

マウスの胎児・成体唾液腺組織における Hippo シグナル伝達経路構成因子の発現を RT-PCR 法、in situ hybridization 法、免疫染色法により解析した。 シグナル伝達経路の核内標的因子である Tead 転写因子ファミリーの発現に関しては、Tead1/3 については発現部位・時期ともに普遍的にそれらの発現が認められた一方で、Tead2 は胎児・成体ともに発現が無く、Tead4 は成体のみ発現が無い等、発現する遺伝子に差異が見られた。 また、転写共役因子である Yap/TAZ については、胎児期の唾液腺組織においては、RT-PCR 法により間葉組織と上皮組織の両者に各因子の発現が確認されたが、免疫染色法により転写活性領域を有する転写共役因子 Yap タンパク質の発現は胎児唾液腺においては核内に多く局在する一方で、成体唾液腺においては細胞質・細胞膜への局在が顕著に観察された。 これらの結果は、唾液腺における Yap タンパク質の分子機能が胎児期と成体期の間で異なることを示唆する。 Tead1/2/3/4 の分子間ではアミノ酸配列の相同性が高く、免疫染色による発現の解析は困難であった。 また、液性因子透過性の膜上において培養を継続した胎児由来唾液腺組織においても、Yap タンパク質は通常の胎児期唾液腺組織と同様に、間葉・上皮組織細胞の核内へ局在する発現パターンを示すことが確認された。 次に、胎児期唾液腺培養組織における Hippo シグナル伝達因子の機能抑制を目的とし、同因子を標的とした siRNA の導入、恒常的活性化型・優性阻害性変異型因子の発現ベクターの導入、mRNA の翻訳阻害を目的とした細胞透過型モルフォリノの導入を検討した。 Hippo シグナル伝達経路因子を外来的に活性化あるいは抑制することを目的として、転写共役因子である Yap/TAZ のリン酸化部位をアミノ酸置換する変異を導入し、核内に局在する恒常的活性化型タンパク質を発現する

ベクターを構築する。 また、Tead 転写因子ファミリーについては、YAP/TAZ との結合能を失う変異型タンパク質を発現するベクターを構築した。 リポフェクション法による siRNA の導入、あるいはセンダイウイルスを用いた発現ベクターの導入は、唾液腺細胞の増殖に及ぼす影響が強く、同培養系においては不適であった。 一方、細胞透過型モルフォリノは低濃度の添加により内在性 Yap/TAZ タンパク質の翻訳を効果的に抑制することが培養細胞において確認されたため、胎児唾液腺培養系への導入を試みた。 Yap/TAZ を標的とする細胞透過型モルフォリノを用いたところ、Yap タンパク質の翻訳抑制が唾液腺組織の成長を経時的に抑制し、また、組織全体・上皮組織の成長あるいは上皮の分枝も有意に低下することが確認された。 また、近年他の研究グループより報告された Yap-Tead 結合阻害分子 Verteporfin を添加した場合にも Yap タンパク質発現抑制時と同様の唾液腺成長阻害が確認されたことから、Hippo シグナル伝達経路の転写共役因子 Yap の分子機能が唾液腺組織の増殖において重要な役割を持つことが示唆された。 次に、モルフォリノによる Yap/TAZ タンパク質翻訳抑制時、あるいは Verteporfin 添加時の培養胎児唾液腺における Tead 転写因子標的遺伝子の発現量を定量 PCR により比較したところ、標的遺伝子の一つである Ankrd1 の発現量は Yap/TAZ の抑制に共通して減少していた。 また、他の標的遺伝子として知られている Ctgf, Cyr61 については減少傾向が見られたものの統計的に有意な変化が見られなかった。 以上の結果から、胎児期唾液腺において核内の Yap タンパク質を介して発現制御されている標的因子の中で、胎児期唾液腺の成長に関与する因子は既知のもの以外である、あるいは Yap タンパク質を介した別の分子メカニズムによって制御されていることが考えられる。

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)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 北川道憲、マウス胎仔唾液腺の発生過程における Hippo シグナル伝達経路の機能解析、第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2014 年 9 月 27 日、福岡国際会議場 (福岡)

〔その他〕

ホームページ等

<http://seeds.hiroshima-u.ac.jp/soran/dhb3c2h/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北川 道憲 (MICHINORI KITAGAWA)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助

教

研究者番号：30314496