

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K08510

研究課題名(和文) マウス顎下腺の分化における細胞系譜の研究

研究課題名(英文) Study of cell lineage in the differentiation of mouse submandibular gland

研究代表者

井関 尚一 (ISEKI, SHOICHI)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：50167251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：出生時のマウス顎下腺の導管には末端導管細胞(TT細胞)があり、生後に減少または消失するが、その生理的役割は不明である。ゲノム編集により、SMGCの特異的産物である顎下腺C蛋白質(SMGC)の大部分が欠如するノックアウト(KO)マウスを作成した。KOマウスの顎下腺は成獣では腺房および導管系とも正常な形態を示したが、出生から生後初期においてSMGCが欠如するのみならず、特徴的な顆粒をもつTT細胞が存在しなかった。すなわち、SMGCという分泌蛋白質の欠如によりTT細胞の分化そのものが起こらないこと、またSMGCおよびTT細胞の欠如は顎下腺の生後発達に影響しないことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織の発生や生後発達、再生においては、元になる細胞(幹細胞)の増殖と分化により前駆細胞を経て成熟細胞が作られる。マウスの顎下腺は生後において神経系やホルモンの影響のもとにおこる細胞の増殖分化や組織形成を解析するのに適した器官である。本研究では遺伝子改変マウスを利用し、顎下腺に存在する特殊な細胞の組織形成における役割について新たな知見を与えると同時に、特定の分泌産物の欠如がそれを産生する細胞そのものの分化を抑制するという未知の現象を明らかにした。社会的には器官の再生の研究において意義があると期待される。

研究成果の概要(英文)：The duct system of the submandibular gland (SMG) of newborn mice contains terminal tubule (TT) cells. TT cells decrease in number or disappear postnatally, but their physiological roles are unknown. By means of genome editing, we produced a knockout (KO) mouse strain that lacks most portions of submandibular gland protein C (SMGC), a specific product of TT cells. The SMG of KO mice showed normal morphology of the acinar and duct systems in the adult age; however, through the neonatal and early postnatal stages, it was deficient not only in SMGC protein but also in TT cells with characteristic granules. These results revealed that the absence of the secretory protein SMGC inhibits the development of TT cells themselves and that the absence of SMGC and TT cells has no influence on the postnatal development of the SMG.

研究分野：医歯薬学 基礎医学 解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：顎下腺 導管系 細胞分化 性差 ホルモン 遺伝子改変 マウス

1. 研究開始当初の背景

マウスの顎下腺では、出生後にも神経やホルモンの影響のもとに細胞増殖と分化が進行する。出生時にはまだ腺房は存在せず、導管は分泌顆粒をもつ末端導管 (terminal tubule, TT) と、その他の未分化な導管部分からなる。生後 1~2 週に TT より遠位に腺房が発達し、導管は介在部導管、線条部導管、排出導管に分化する。生後 3~4 週以降、特に雄マウスにおいて線条部導管の大部分は分泌顆粒をもつ顆粒性導管に分化する。このうち腺房の増殖と分化は交感神経 (アドレナリン作動性) に、顆粒性導管の分化はホルモン (アンドロゲンと甲状腺ホルモン) に依存する。成獣の顎下腺では介在部導管に幹細胞が存在して腺房や導管系各部分に分化すると推測されているが、骨髓造血組織や消化管の場合と異なり、幹細胞の確かなマーカーは不明であり、幹細胞から前駆細胞を経て腺房や導管系各部分の細胞に至る細胞系譜 (cell lineage) も不明である。出生時のマウス顎下腺の導管系のうち、TT 細胞 (顆粒性介在部導管細胞とも呼ぶ) は分泌顆粒内に特異的マーカーとして顎下腺 C 蛋白質 (SMGC) をもち、またその他の導管の大部分では基底側の細胞が細胞質に特異的マーカーとしてケラチン 5 (K5) をもつ。我々は最近 SMGC と K5 をマーカーとして用いてマウス顎下腺の生後発達を形態学的、組織化学的に研究したところ、SMGC 陽性細胞は生後発達で減少し、雄では 4 週目以降に消失するが、雌では介在部導管遠位端の腺房に接する部分に成獣でも残ること、K5 陽性細胞は生後発達で線条部導管から消失して介在部導管に局限し、4 週目以降、排出導管の基底部のほか、雌では介在部導管近位端の線条部導管に接する部分、雄では顆粒性導管に接する部分に局在することを見出した。このことから、SMGC 陽性細胞は早期の腺房細胞の、K5 陽性細胞は導管系各部分の細胞の、それぞれ直接の前駆細胞である可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、SMGC および K5 を前駆細胞の組織化学的マーカーとして用い、まずそれぞれの陽性細胞の詳細な動態 (増殖、細胞死、局在や形態の変化) と、それに対するホルモン (アンドロゲンと甲状腺ホルモン) による影響を明らかにする。次に SMGC および K5 に関する遺伝子改変マウス (それらを欠損するマウス、それらのプロモータにより条件的に細胞が蛍光標識されるかあるいは致死に至るマウスなど) を作製する。改変マウスの生後発達の各時期および成獣において、SMGC および K5 陽性の前駆細胞とその系列 (子孫) 細胞の動態を腺房および導管系各部分で追跡し、交感神経およびホルモンによる影響を見る。またこれら前駆細胞を除去した際の顎下腺の組織構築の変化を見る。これらの解析により、マウス顎下腺の分化における細胞系譜とその制御機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

雌雄マウスの成獣および生後各齢において、顎下腺の組織形態を顕微鏡と電顕により観察し、また腺房系や導管系のマーカー遺伝子とその産物の発現と局在を PCR 法、Western プロット法、in situ ハイブリダイゼーション (ISH) 法、免疫組織化学法で解析して比較する。またこれらマウスにアンドロゲンや甲状腺ホルモンを投与したときの顎下腺の変化を調べ、発現が変化する mRNA をマイクロアレイ法により網羅的に解析する。ゲノム編集などの方法により導管系の前駆細胞候補のマーカー (SMGC と K5) を欠損するか、あるいはそれらで標識される遺伝子改変マウスを作成し、前駆細胞からの腺房あるいは導管系各部分への分化を追跡する。改変マウスと野生型マウスとの間での顎下腺の遺伝子発現の違いをマイクロアレイ法により網羅的に解析する。

4. 研究成果

セリンプロテアーゼ阻害物質である *Serp1b6a* について、その遺伝子と蛋白質が雄の顎下腺で優位に発現すること、導管系のうち雄で発達する顆粒性導管の細胞に蛋白質が局在することを示した。またセリンプロテアーゼの一種であり、顆粒性導管細胞の顆粒に存在するカリクレイン1関連ペプチダーゼ *b26* (*Klk1b26*) が *Serp1b6a* と特異的に結合することがわかり、*Serp1b6a* が顆粒性導管細胞をカリクレインから保護していることが示唆された (雑誌論文1、学会発表1、2)。

セカンドメッセンジャーの cAMP と cGMP を分解する酵素である phosphodiesterase 2A (*PDE2A*) について同様な解析を行い、*PDE2A* が雌の顎下腺で優位に発現すること、蛋白質は腺房細胞および導管系のうち介在部および線条部導管の細胞に局在するが、顆粒性導管細胞では非常に少ないことを示した。また cAMP と cGMP の標的である protein kinase A と G の発現も同様に顆粒性導管細胞で非常に弱いことがわかり、雄で発達する顆粒性導管ではシグナル伝達へのサイクリックヌクレオチドの関与が低いことが示唆された (雑誌論文3、学会発表3、4)。

マウス顎下腺の生後発達で見られる 2 種類の性差、すなわち雄における顆粒性導管細胞 (NGF 陽性) の優位な分化および顆粒性介在部細胞 (SMGC 陽性) の早期の消失におけるアンドロゲンおよび甲状腺ホルモンの役割を調べるため、正常およびアンドロゲン受容体欠損マウスに両ホルモンを投与して各細胞数を計測した。その結果、顆粒性導管細胞の性差はアンドロゲンと甲状腺ホルモンに依存するが、顆粒性介在部細胞の性差はアンドロゲンのみに依存することがわかり、両者は異なる分子メカニズムによることが示唆された (雑誌論文2)。

C57BL/6 系マウスの受精卵に対して CRISPR-Cas9 ゲノム編集を行い、第15染色体で顎下腺 C 蛋白質 (SMGC) をコードするエクソン 3 の一部に 7bp の遺伝子欠損を生じさせ、翻訳のフレームシフトにより SMGC の大部分が欠如する ノックアウト (KO) マウスの系統 (*d7-SMGC*) を作成した。これらの KO マウスのホモ接合体は特に異常なく生育し、生殖も可能であった。出生直後のマウス顎下腺導管の末端にはまだ腺房が形成されていないが、トルイジンブルーやアルシアンブルー-PAS 染色で染まり、電顕で暗く見える顆粒をもつ末端導管細胞 (TT 細胞) と、明るい顆粒をもつ前腺房細胞 (プロアチナー細胞) が存在する。このうち TT 細胞は顆粒中に SMGC をもち、生後 3 週以降に次第に数が減少し、雄では 5 週頃に完全に消失するが、雌では成獣に至るまで少数が導管系遠位端に存在する。TT 細胞の生理的役割は不明であるが、腺房あるいは導管系の前駆細胞である可能性

も指摘されている。今回のKOマウスの顎下腺においては、出生直後からTT細胞の顆粒に本来発現するSMGCは当然ながら欠如していたが、雌雄とも成獣に至るまで腺房および導管系の発育は一見正常であった。しかしさらに光顕的組織化学により顎下腺の形態を詳細に解析すると、KOマウスでは出生直後からトルイジンブルーやアルシアンブルーPASで染まる顆粒を持ったTT細胞そのものが欠落していた。出生時の顎下腺の電顕観察では、TT細胞が欠如して未分化に見える導管細胞に置き換わっていた。一方、明るい顆粒をもつ前腺房細胞は存在し、そこから正常な腺房が分化することが示唆された。すなわち、マウス顎下腺においてTT細胞の産物であるSMGCという生理機能不明の分泌蛋白質が欠如すると出生前にTT細胞の分化そのものが停止すること、またSMGCおよびTT細胞の欠如は腺房および導管系の生後発達に影響しないこと、がわかった。TT細胞が前腺房細胞に分化するという可能性は、先行する電顕形態学的研究において出生前の時期から両者が独立して存在し、移行型が見られないことからある程度否定されていたが、本研究によりさらに完全に否定された（雑誌論文4、学会発表5、7）。

SMGC-KOマウスはSMGC遺伝子の一部しか欠損していないので、SMGCのmRNAの大部分を転写するはずであるが、ISHで調べると生後1～2週頃までは本来TT細胞のある介在部導管末端部分の細胞に弱いmRNAシグナルが存在したが、雌においても4週頃までに消失した。すなわちこれらの細胞は自身で作るはずのSMGCという分泌蛋白質の欠如により分泌顆粒を持つTT細胞の表現形質を出生時まで失い、続いてSMGC遺伝子の転写能も失ったことになるが、そのメカニズムは不明である。次にSMGC以外のTT細胞特異的な産物の探索のため、またSMGCやTT細胞の欠如が顎下腺における遺伝子発現に及ぼす影響を見るため、生後2週と4週において野生型とSMGC-KOの雌マウス顎下腺の間で発現量に差のあるmRNAをマイクロアレイ法により比較してみた。しかし残念ながら両者で発現に差のある遺伝子はわずかであり、その産物であるmRNAや蛋白質で顎下腺のTT細胞やその他の細胞に明確に局在するものは見つからなかった（本研究を含むマウス顎下腺研究の総説として雑誌論文5、学会発表6）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 井関尚一	4. 巻 63
2. 論文標題 総説 マウス顎下腺導管系のホルモン依存性分化	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本唾液腺学会誌	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Nakata H, Terakawa J, Horike S, Daikoku T, Iseki S	4. 巻 381(2)
2. 論文標題 The lack of terminal tubule cells in the submandibular gland of mice deficient in submandibular gland protein C	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 229-237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-020-03205-w	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 -

1. 著者名 Nakata H, Yamamoto M, Kumchantuek T, Adhapanyanich K, Nishiuchi T, Iseki S	4. 巻 369
2. 論文標題 Synthesis, localization and possible function of serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 6a (Serpinb6a) in mouse submandibular gland.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 513-526
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-017-2620-1	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 Yamamoto M, Nakata H, Kumchantuek T, Adhapanyanich K, Iseki S	4. 巻 371
2. 論文標題 Distinct hormonal regulation of two types of sexual dimorphism in submandibular gland of mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 261-272
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-017-2719-4	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 Adthapanyawanich K, Nakata H, Iseki S	4. 巻 90
2. 論文標題 Expression and localization of phosphodiesterase 2A in the submandibular gland of mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 91-99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2018.03.009	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 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 井関尚一、仲田浩規、寺川純平、大黒多希子、堀家慎一
2. 発表標題 顎下腺C蛋白質 (SMGC) 欠損マウスにおける末端導管 (TT) 細胞の欠如
3. 学会等名 第60回日本組織細胞化学会総会・学術集会、神戸
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井関尚一
2. 発表標題 特別講演：マウス・ラット顎下腺導管系の分化機構
3. 学会等名 第64回日本唾液腺学会学術集会、東京(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井関尚一、仲田浩規、寺川純平、堀家慎一、大黒多希子
2. 発表標題 顎下腺C蛋白質 (SMGC) 欠損マウスにおける末端導管 (TT) 細胞の欠如
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会、誌上開催
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井関尚一、仲田浩規
2. 発表標題 マウス顎下腺におけるホスホジエステラーゼ2A(PDE2A)の発現と局在
3. 学会等名 第59回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井関尚一、仲田浩規
2. 発表標題 マウス顎下腺におけるホスホジエステラーゼ2A(PDE2A)の発現と局在
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井関尚一、仲田浩規
2. 発表標題 マウス顎下腺におけるセルピンb6aの発現、局在と機能
3. 学会等名 第58回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井関尚一、仲田浩規
2. 発表標題 マウス顎下腺におけるSerpinb6aの発現、局在と機能
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018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	仲田 浩規 (Nakata Hiroki) (80638304)	金沢大学・医学系・講師 (13301)	

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
---------	---------