

機関番号：34408
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20592167
 研究課題名（和文） 唾液腺上皮管腔形成におけるタイトジャンクション分子クロードインの役割
 研究課題名（英文） Roles of the claudin family of tight junction molecules in epithelial lumen formation of the submandibular gland
 研究代表者
 桧枝 洋記 (HIEDA YOHKI)
 大阪歯科大学・歯学部・准教授
 研究者番号：30243132

研究成果の概要（和文）：

マウス唾液腺の管腔構造形成過程におけるクロードインの役割や遺伝子発現変化について解析した。腺房特異的に発現しているクロードイン-10 についてその役割の解明を試みた。明確な結果を得ることはできなかった。管腔形成前後の唾液腺での遺伝子発現解析などから、これまで知られていなかったクロードイン-15 や形成初期の管腔面マーカー分子を同定した。また、数十種類の転写因子が管腔形成過程で発現が大きく上昇し上皮特異的に発現していた。これらの分子は管腔形成機構の解明に役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we investigated roles of claudins and gene expression profile in epithelial tube formation of the mouse submandibular gland. We tried to reveal the role of claudin-10 in tube formation of cultured glands by means of siRNAs, however, no clear results indicating the involvement of tube formation were obtained. In addition to the 8 members of the claudin family, claudin-15 was expressed in the mouse submandibular gland. We also identified apical membrane proteins and transcription factors that were up-regulated during tube formation. These molecules will give us clues to understanding mechanisms of epithelial tube formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：唾液腺、管腔形成、タイトジャンクション、極性、アピカル、転写因子

1. 研究開始当初の背景

多くの器官の上皮組織では、細胞シートが腔を取り囲んだ管腔構造をしている。分枝形態形成の分子・細胞生物学的機構については多くの知見が得られているのに比べて、管腔形成機構に迫る研究は非常に少ない。培養細胞

を用いた研究から、管腔形成が細胞極性の確立と密接に関連していることは明らかになっているが、生体組織の管腔形成については不明な点が多い。また、管腔形成に関わっている転写因子はほとんどわかっていない。マウス唾液腺の管腔形成は器官培養系で再現

できるため、生体組織の管腔形成機構を解析するための良いモデル系である。

2. 研究の目的

(1) 細胞極性の確立にはクローディンファミリー分子を介したタイト結合の形成が重要である。マウス唾液腺には少なくとも8種類のクローディンが発現している。腺房特異的なクローディン-10に着目して、唾液腺上皮組織とくに腺房での管腔形成における役割を解析する。

(2) クローディンファミリー分子は20種類以上のメンバーからなるが、すべてのメンバーが発現が唾液腺で解析されているわけではない。マウス唾液腺での発現が知られている8種類以外のメンバーの発現を解析する。

(3) 生体組織での管腔形成機構の解析が遅れている理由の1つは、形成初期の管腔面(=上皮細胞のアピカル面)を解析するためのマーカーが得られていないことにある。管腔形成前後のマウス唾液腺における遺伝子発現を調べて、管腔面形成のマーカー分子を同定する。

(4) 生体組織での管腔や細胞極性の形成を制御している転写因子はほとんどわかっていない。管腔形成前後のマウス唾液腺における遺伝子発現を調べて、管腔・細胞極性の形成を制御している転写因子候補を同定する

3. 研究の方法

(1) 顎下腺は成体および胎児マウス(ddY系統)から摘出した。

(2) 胎児マウスから摘出した唾液腺をフィルター上で培養した。siRNAは培養液に加えた。

(3) 胎児マウスの顎下腺から全RNAを抽出し、蛍光標識したプローブをDNAマイクロアレイ(Whole mouse Genome, Agilent社)にハイブリダイズさせた。読み取ったシグナル値を正規化およびバックグラウンド補正し、解析に用いた。

(4) 胎児マウスの顎下腺から抽出したRNAをcDNAに変換し、目的の遺伝子に相補的なDNAプライマーを用いてサーマルサイクラーにてPCRを行った。

(5) 顎下腺をOCTコンパウンドに包埋し、液体窒素で凍結した。厚さ6 μ mの凍結切片を作成し、4%パラホルムアルデヒド/PBSで10分(室温)あるいはメタノールで10分(-20 $^{\circ}$ C)固定した。1%牛血清アルブミン(BSA)/PBSで30分処理後、1次抗体で1時間そして蛍光標識2次抗体で1時間反応させた。蛍光顕微鏡(BX-50, オリンパス社)で観察および撮影した。画像処理はアドビフォトショップ(アドビ社)を用いて行った。

(6) 顎下腺を0.1% Triton X-100/Tris-HCl (pH7.4)でホモジナイズした。遠心して不

溶画分をSDS-PAGE電気泳動した。PVDF膜に転写したタンパク質を1%BSA/TBSでブロッキングした後、1次抗体で30分、アルカリリフォスファターゼ標識2次抗体そしてケミルミネセンス基質を反応させた後に画像を取得した。

4. 研究成果

(1) クローディンファミリー分子は20種類以上のメンバーからなる。マウス顎下腺ではこれまでに12種類(クローディン-1~12)の発現が調べられ、8種類(クローディン-3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11)が発現していることがわかっていて、クローディン-10は唾液を生成する腺房特異的に発現していることに着目して、クローディン-10の腺房形成における役割を解析することを試みた。腺房形成前の唾液腺をクローディン-10に対するsiRNA存在下で培養し、腺房形成や腺房マーカー分子AQP5の発現などに対する影響を解析した。しかしながら、明瞭な影響を認めることはできなかった。その原因としては、クローディン-10の機能を単独で阻害しても他のクローディンが補っていることが想像される。実際、腺房にはクローディン-10の他にも数種類のクローディンが発現しており、また、多くの細胞において1種類のクローディンの機能を阻害しても影響が出にくいことが知られている。今後、複数のクローディンのノックアウトマウスを用いて解析することが必要である。

(2) 本研究では他のクローディンメンバーの発現をマイクロアレイおよびRT-PCRで解析した。その結果、クローディン-15 mRNAの発現が認められた。しかし、市販の抗クローディン-15抗体を用いて異なる固定条件下で組織染色を行ったが、特異的な染色は得られなかったため、発現部位を特定することはできなかった。また、免疫ブロットでも検出できなかった。顎下腺ではクローディン-15タンパク質は発現していないか、あるいは、用いた抗体の反応性に問題があると考えられる。クローディン-15の発現を解析するには新しい抗体の作製が必要である。

(3) 唾液腺では細胞塊内部の細胞間隙が広がることによって腔が形成されて管腔構造になる。その機構を明らかにするためには形成初期の管腔面すなわち細胞のアピカル面の形成を検出する必要があるが、そのような管腔面マーカーは知られていなかった。本研究では、管腔形成前(胎齢13日)と形成後(胎齢17日)の顎下腺での遺伝子発現をマイクロアレイによって解析した(図1)。腺房細胞のアピカル面に局在しているAQP5などの発現が管腔形成後に大きく上昇していたことから、得られたマイクロアレイデータは信頼できると考えられる。少なくとも約3

0種類のアピカル膜タンパク質遺伝子の発現が管腔形成過程で3倍以上増加していた。それらの中のいくつかについて蛍光抗体染色を行ったところ、CD133 (Prominin-1)などが形成初期の管腔面で発現していた(図3矢印)。成体顎下腺の解析からこれらのタンパク質の発現パターンと唾液腺幹細胞/前駆細胞との関連が示唆され、現在解析中である。本研究の成果はその解析結果とともに論文公表する予定である。本研究で同定された管腔面タンパク質は管腔形成機構を解析するための有用なマーカーになる。

図1

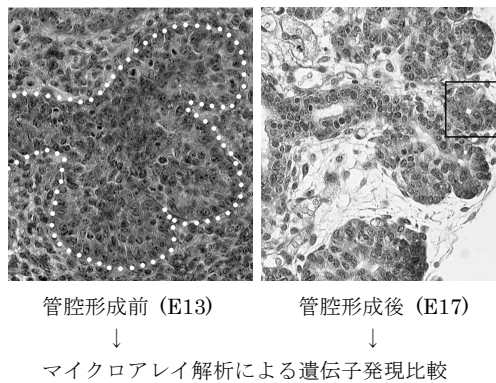
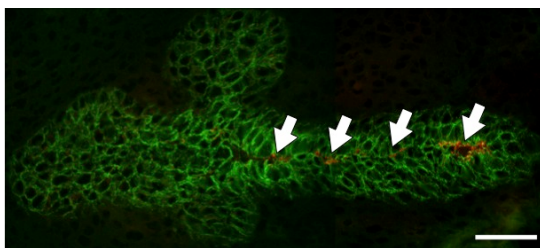


図2

管腔形成過程で発現上昇する遺伝子の例

遺伝子	発現比 (E17/E13)
AQP5	2,388
Slc5a1	103
Slc5a8	98
TMEM16a	16
Kcnma1	13
Slc9a3	9
CD133	9

図3



(4) 上皮管腔形成がどのような転写因子によって制御されているのかはほとんどわかっていない。管腔形成前後の顎下腺を用いてマイクロアレイ解析を行ったところ、約80種類の転写因子の発現が管腔形成過程で2.5倍以上上昇していた。その中には上皮細胞の接着や分化を制御していることが知られて

いるGrhファミリー(図4)や上皮組織特異的なEtsファミリーなどが含まれていた。In situ hybridizationデータベースGenePaintを用いてマウス胎児顎下腺での発現を調べたところ、管腔形成過程で発現上昇する転写因子の多くが上皮組織特異的に発現していることが明らかとなった。そのような転写因子の1つSox9の発現パターンを免疫染色で詳細に解析したところ、顎下腺形成過程で発現パターンが徐々に限定され成体では介在部導管で強く発現していた(図5矢印)。本研究で同定した転写因子は唾液腺の管腔形成や分化の制御に関わっていることが示唆される。また、介在部導管には唾液腺幹細胞(前駆細胞)が存在すると考えられていることから、Sox9と唾液腺幹細胞の維持や分化に関わっていることが示唆され、Sox9遺伝子改変マウスを用いて現在解析を進めている。これらのデータを含めて本研究の成果を論文発表する予定である。

図4

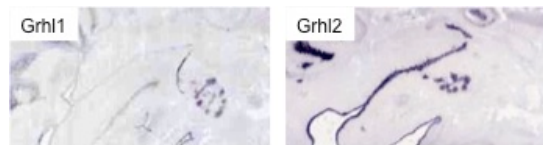
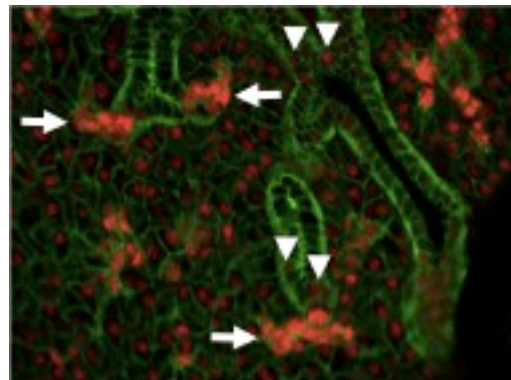


図5



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1件)

- ① 桧枝洋記, Tube formation in developing mouse submandibular gland. J. Med. Invest. 査読有. Vol. 56, Suppl., 2009, pp. 239-240.

[学会発表] (計6件)

- ① 桧枝洋記, Expression profile of transcription factors in developing submandibular gland. The Gordon

Research Conference on Salivary Glands and Exocrine Biology. 2011年2月8日, Galveston(米国).

- ② 桧枝洋記, マウス顎下腺における転写因子Sox9の発現パターン, 第52回歯科基礎医学会, 2010年9月22日, 東京.
- ③ 桧枝洋記, Tube formation in developing mouse submandibular gland. The 11th International Symposium on Exocrine Secretion. 2009年7月23日, 徳島.
- ④ 桧枝洋記, マウス顎下腺における幹細胞マーカー分子Prominin-1の発現パターン. 第50回歯科基礎医学会, 2008年9月24日, 東京.
- ⑤ 桧枝洋記, 唾液腺形態形成: 再生医療に向けての基礎研究. 第6回日本再生歯科医学会. 2008年9月12日, 東京.
- ⑥ 桧枝洋記, Prominin-1 expression in developing submandibular gland. 86th General Session & Exhibition of the IADR, 2008年7月3日, Toronto (カナダ).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桧枝 洋記 (HIEDA YOHKI)
大阪歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 30243132

(2) 研究分担者

橋本 典也 (HASHIMOTO YOSHIYA)
大阪歯科大学・歯学部・助教
研究者番号: 20228430

川合 進二郎 (KAWAI SHINJIRO)
大阪歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 70131381

(3) 連携研究者

なし