

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月17日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592054

研究課題名（和文） HGFによる顎下腺原基のEGF受容体トランスアクチベーションの機構

研究課題名（英文） Mechanisms of transactivation of EGF receptor in submandibular gland rudiments by HGF

研究代表者

柏俣 正典（KASHIMATA MASANORI）

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：30152630

研究成果の概要（和文）：HGFは顎下腺原基の分枝形態形成を促進させることが知られている。しかし、その機構の詳細は不明である。本研究で我々はHGFが弱いながらも培養顎下腺原基の分枝形態形成を促進すること、および顎下腺の小葉の形態に変化を生じさせることを明らかにした。また、顎下腺原基から上皮を分離して用いる培養系を用いて、HGFが顎下腺上皮にクレフトの形成を誘導させることを明らかにした。HGFを顎下腺に処理するとEGF受容体のリン酸化の亢進が確認された。以上の結果から、EGF/EGF受容体の経路はHGFの顎下腺原基に対する分枝形態形成促進効果と顎下腺上皮に対するクレフト形成効果に関与していると考えられた。

研究成果の概要（英文）：HGF is known to regulate branching morphogenesis of fetal mouse submandibular gland (SMG). However, the mechanisms of regulation of branching morphogenesis are largely unknown. HGF weakly stimulates branching morphogenesis and induced morphological changes of surface of buds of SMG rudiments. By using mesenchyme-free epithelial culture system, we could observe that HGF stimulate cleft formation of SMG epithelium. HGF also induced EGF receptor (ErbB1) phosphorylation by treatment of cultured SMG rudiments with HGF. These results imply that EGF/EGF receptor system is responsible, at least in part, for the stimulatory effect of HGF on branching morphogenesis of cultured SMG rudiments and cleft formation of SMG epithelium.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：上皮間葉相互作用、分枝形態形成、EGF、HGF、器官培養、顎下腺原基、唾液腺

## 1. 研究開始当初の背景

（1）マウス顎下腺原基は胎生11日目に間葉組織に落ち込んだ上皮組織によって発生が始まる。その後、落ち込んだ上皮の先端が二方向に分割して伸長し、その先端が再び分

割することで、まるで木の枝が成長するように唾液腺の導管系が形成される。この現象は分枝形態形成とよばれ、唾液腺などの外分泌腺と肺や腎臓などの形成に重要な役割を果たしている。顎下腺原基に見られる分枝形態

形成は培養下でも観察可能である。また、胎生 13 日目の顎下腺をディスペルゼ処理した後に機械的に上皮と間葉に別けること、さらに上皮をマトリゲル中で三次元培養することも可能である。すなわち顎下腺原基全体への作用と顎下腺上皮への各種因子の作用を識別可能である。

(2) 分枝形態形成の制御には上皮と間葉の組織間コミュニケーションが重要であることが推察されている。例えば間葉組織から合成される細胞成長因子が上皮組織の細胞成長因子受容体と結合して上皮の形態等の変化を誘導することなどが知られている。これらの細胞成長因子には、上皮成長因子 (epidermal growth factor: EGF)、線維芽細胞成長因子 (fibroblast growth factor: FGF)、血小板由来成長因子 (platelet derived growth factor: PDGF) 等の存在が明らかにされている。また、細胞成長因子以外にも間葉組織に発現している細胞外マトリクスや細胞接着因子の関与なども顎下腺原基の分枝形態形成を制御していることが報告されている。

(3) マウス顎下腺原基は胎生 11 日目に発生が開始されてから、およそ 9 日後には顎下腺の導管系の基本構造が構築される。このように急速に形成される顎下腺形態形成を調節している上皮間葉相互作用は、複数の細胞成長因子をはじめ他の調節因子が連鎖的・連携的に機能していると考えられる。したがって各々の細胞成長因子が及ぼす影響を網羅的に検証することが上皮間葉相互作用のメカニズムを説き明かすと考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究では顎下腺原基に対する肝細胞成長因子 (hepatocyte growth factor: HGF) の作用について解明することである。

(2) HGF によって活性化されることが解っている顎下腺原基に発現している ErbB (EGF 受容体) の活性化のメカニズムと役割について明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 顎下腺原基をメディアムに浮かべたフィルター上で培養を行い、メディアム中に HGF を添加した場合の変化について観察する。

(2) ディスペルゼ処理した顎下腺原基から上皮を取り出し、マトリゲル中で三次元培養を行う。HGF を添加して培養することで上皮の形態が変化するか否かについて観察する。

(3) HGF を添加して培養を行った顎下腺原

基を経時的に回収する。顎下腺のホモジネートを作成し、抽出した試料に含まれる ErbB 受容体のリン酸化状態をウエスタンブロット法によって検討する。また、細胞成長因子等によって活性化されることが知られているシグナル分子 (MAPK: ERK1/2) の状態についてもウエスタンブロット法によって検討を行う。

(4) (3) と同様の処理をした顎下腺試料から total RNA を抽出し、cDNA を合成した後、リアルタイム RT-PCR を実施して、試料内の EGF ファミリー (EGF, *neuregulin*: NRG, *heparin binding EGF*: HB-EGF) と ErbB ファミリー (*ErbB1*, *ErbB2*, *ErbB3*, *ErbB4*) の mRNA の相対定量を行う。

## 4. 研究成果

(1) 胎生 13 日目の顎下腺原基を HGF (5 ng/ml, 20 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml) 含有のメディアムを用いて器官培養を行った。48 時間後の顎下腺の形態を観察したところ、20 ng/ml の濃度以上で分枝形態形成の促進が確認された。しかし、促進の程度はわずかであった。HGF によって誘導される上皮は小葉の小型化を起こしていることが分かった。さらに、間葉の過密化がみられ、腺全体の容積が小さくなっていることが観察された。この現象は HGF の濃度に依存して観察されたことから、HGF の作用を反映したものであると考えられた。

(2) 胎生 13 日目の顎下腺上皮をマトリゲル中で三次元培養した。メディアムに HGF (50 ng/ml) を添加して観察を行ったところ、培養 24 時間目にクレフト形成が誘導されることを観察した。誘導される形態は FGF によって誘導される伸長反応に類似した変化であった。しかし、その程度は強力なものではなかった。これらの結果から、少なくとも顎下腺原基の上皮には HGF 受容体 (c-Met) が発現しており、HGF によって上皮形態を変化させる機構が存在していることが明らかになった。

(3) 胎生 13 日目のマウス顎下腺原基を HGF (50 ng/ml) とともに器官培養を行った。培養 0 時間、1 時間、6 時間、12 時間および 24 時間の時点で顎下腺原基を回収して、細胞ライセート液にてホモジネートを作成した。一定量のタンパク質を含む試料を SDS-PAGE で分離した後、PVDF 膜に転写してウエスタンブロット解析を行った。その結果、顎下腺原基に発現している ErbB1 受容体のリン酸化反応が顕著に亢進していることが分かった。ErbB1 のリン酸化 (Tyr 1068) は HGF の投与後 6 時間以降で見られた。EGF を作用させた

場合に見られる ErbB1 のリン酸化反応は通常 5 分後には確認できる。したがって HGF によって亢進する ErbB1 のチロシンリン酸化反応は ErbB1 に直接作用したものではなく、何等かの現象を介して起こっていることが示唆された。同試料を用いて MAPK カスケードの ERK1/2 のリン酸化の程度を調べた。その結果、HGF は ERK1/2 のリン酸化を亢進させていることが分かった。リン酸化の亢進は 5 分後に見られた。また、ERK1/2 のリン酸化は一旦減少した後、12 時間後に再び亢進した。すなわち ERK1/2 のリン酸化は HGF に対して二相性に変化していた。同様の実験系に、EGF 受容体の阻害剤 (BIBX1382) を共存させて顎下腺原基に HGF を作用させた。顎下腺原基を回収して同様にウエスタンブロット解析した。その結果、EGF 受容体阻害剤を共存させると 12 時間に見られた ERK1/2 のリン酸化の亢進は消去された。したがって、HGF による二相性の ERK1/2 リン酸化反応のうち 12 時間に見られた亢進は EGF 受容体の活性化を介したものであることが分かった。

(4) 胎生 13 日目の培養顎下腺原基に HGF (50 ng/ml) を添加して培養を行い、それぞれ 0 時間、1 時間、6 時間、12 時間および 24 時間の時点で顎下腺原基を回収した。これらの試料から total RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR によって EGF、NRG、HB-EGF、ErbB1、ErbB2、ErbB3 および ErbB4 の mRNA を相対定量した。その結果、HGF の処理後 6 時間に ErbB2 の mRNA の上昇が確認できた。また、NRG と HB-EGF の mRNA も上昇の傾向が認められた。したがって HGF はその作用の一部を EGF/ErbB 系を介して発現していることが示唆された。

## 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 6 件)

- ① Koyama N, Havashi T, Mizukoshi K, Gresik EW, Kashimata M: Extracellular regulated kinase 5 is expressed in fetal mouse submandibular glands and is phosphorylated in response to epidermal growth factor receptor and other ligands of ErbB family of receptors. *Develop Growth Differ* 査読有, 54, 2012, 801-808
- ② Havashi T, Koyama N, Mizukoshi K, Kashimata M: MicroRNA profiling methods applied to recent studies of fetal mouse submandibular gland development. *J Oral Biosci* 査読有, 54, 2012, 169-172
- ③ Alkayed F, Kashimata M, Koyama N, Havashi T, Tamura Y, Azuma Y: P2Y11 purinoceptor mediates the ATP-enhanced

chemotactic response of rat neutrophils. *J Pharmacol Sci* 査読有, 120, 2012, 288-295

- ④ Koyama N, Havashi T, Kashimata M: Regulation of branching morphogenesis in fetal mouse submandibular gland by signaling pathways activated by growth factors and  $\alpha 6$  integrin. *J Oral Biosci* 査読有, 53, 2011, 298-303
- ⑤ Havashi T, Koyama N, Auma Y, Kashimata M: Mesenchymal miR-21 regulates branching morphogenesis in murine submandibular gland in vitro. *Dev Biol* 査読有, 352, 2011, 299-307
- ⑥ Ohno K, Koyama N, Havashi T, Takai Y, Gresik EW, Kashimata M: Regulation of expression of Sprouty isoforms by EGF, FGF7 or FGF10 in fetal mouse submandibular glands. *Oral Sci Int* 査読有, 7, 2011, 47-55

[学会発表] (計 6 件)

- ① 小山典子、林徹、Edward Gresik、柏俣正典: 顎下腺の発生を制御する細胞内情報伝達機構の解明、第 52 回歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウム、2010.09.20、船堀
- ② 林徹、小山典子、柏俣正典: 胎仔マウス顎下腺マイクロ RNA の EGF 処理による発現上昇、第 52 回歯科基礎医学会学術大会、2010.09.20、船堀
- ③ Alkayed Feras、東幸雄、小山典子、林徹、田村康夫、柏俣正典: プリン受容体シグナルはラット好中球の細胞遊走を増強する、第 52 回歯科基礎医学会学術大会、2010.09.20、船堀
- ④ Kashimata M, Koyama N, Havashi T, Gresik EW: Expression of EGF-responsive ERK5 in embryonic mouse submandibular gland, Society for Developmental Biology 70th Annual Meeting, 2011.10.01, Chicago
- ⑤ 林徹: 胎仔マウス顎下腺間葉のマイクロ RNA21 による分枝形態形成制御、第 53 回歯科基礎医学会学術大会歯科基礎医学会賞受賞講演、2011.10.01、岐阜
- ⑥ 小山典子、水越堅詞、柏俣正典:  $\alpha 6$  インテグリンは顎下腺の分枝形態形成の伸長反応に関与している、第 54 回歯科基礎医学会各術大会、2012.09.15、郡山

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:

種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○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

URL:<http://scw.asahi-u.ac.jp/~pharmaco/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柏俣 正典 (KASHIMATA MASANORI)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：30152630

### (2) 研究分担者

小山 典子 (KOYAMA NORIKO)

朝日大学・歯学部・准教授

研究者番号：60367563

### (3) 研究分担者

林 徹 (HAYASHI TORU)

朝日大学・歯学部・助教

研究者番号：10454266

### (4) 連携研究者

( )

研究者番号：