

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590231

研究課題名(和文) マウス顎下腺の性差におけるアンドロゲン受容体の役割

研究課題名(英文) Roles of the androgen receptor in the sexual differentiation in the mouse submandibular gland

研究代表者

井関 尚一 (Iseki, Shoichi)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：50167251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：アンドロゲン受容体(AR)を欠損するマウス(ARKO)の顎下腺を調べたところ、正常マウス雌と同様に顆粒性導管(GCT)の発達が見られず、アンドロゲンを投与しても影響がなかったが、甲状腺ホルモン(T4)を投与するとARKOでも線条部導管細胞からGCT細胞への転換が見られた。この結果から、アンドロゲンによるGCT細胞の分化には古典的なARを必要とすること、T4はARを介さずにGCT細胞の分化を引き起こすことがわかった。またARKO顎下腺における遺伝子発現の解析により、GCT細胞に特異的な新たな遺伝子や、古典的なARを介さずにアンドロゲンにより発現が変化する遺伝子を同定した。

研究成果の概要(英文)：We examined the SMG of mice deficient of the androgen receptor (ARKO). The development of granular convoluted tubules (GCT) in ARKO male was as low as in control female. The administration of androgens had no effect, whereas the administration of thyroid hormone (T4) caused the conversion of striated duct cells into GCT cells in ARKO SMG. These results confirmed that GCT differentiation caused by androgens is dependent on the classical androgen receptor (AR), whereas that by T4 is independent of the AR. Analysis of the gene expression profiles in ARKO SMG revealed new GCT-specific genes as well as genes up- or down-regulated in the SMG by androgens without involvement of the classical AR.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：細胞分化 組織形成 顎下腺 顆粒性導管 アンドロゲン アンドロゲン受容体 甲状腺ホルモン

### 1. 研究開始当初の背景

唾液腺は腺房と導管系からなる。マウス顎下腺の導管系は、ホルモンによる細胞分化調節の研究モデルとして有用である。すなわち、思春期において主にアンドロゲンの作用により導管系が分化するにあたり、マウス顎下腺に特徴的な顆粒性導管 (GCT) が雌よりも雄ではるかに発達するため、成獣の顎下腺は著しい性差を示す。精巣切除により顆粒性導管は雌と同様の線条部導管に転換するが、雌や精巣切除した雄にアンドロゲンを投与すると、数日のうちに線条部導管は再び顆粒性導管に転換して、神経成長因子 (NGF) や上皮増殖因子 (EGF) 等、多くの特異的蛋白質を産生する。しかしアンドロゲンによる顆粒性導管細胞分化の分子メカニズムは不明である。

従来、アンドロゲンを含むステロイドホルモンの作用メカニズムとして、ホルモンの結合した細胞質受容体 (アンドロゲン受容体) 自身が核に移行し、DNA の特定の領域に結合して転写因子として働くという古典的な経路が知られてきた。最近の文献では、ステロイドホルモン-受容体系が、細胞膜の受容体の下流にあるシグナル伝達系を活性化することにより働く新たな経路 (非ゲノム作用) の存在が、脳、卵巣、精巣などにおいて示唆されている。申請者らも、マウス顎下腺において、細胞質中の転写因子である cAMP 反応部位結合蛋白質 (CREB) や JunD が、雄より雌ではるかに強く発現し、雄の顆粒性導管において消失していることを見出した。アンドロゲン受容体は顎下腺において導管細胞のみならず腺房細胞にも発現するが、腺房および導管系の性差や、アンドロゲンによる顆粒性導管細胞の分化におけるアンドロゲン受容体の役割は解明されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、マウス顎下腺の腺房および導管系の分化の分子メカニズムと、アンドロゲン-アンドロゲン受容体の役割を明らかにすることを目的として、正常の雌雄マウスおよびアンドロゲン受容体欠損マウス、およびこれらにアンドロゲンを投与した場合の顎下腺における遺伝子発現を解析した。

### 3. 研究の方法

正常の雌雄マウスおよびアンドロゲン受容体ノックアウトマウス (ARKO) の顎下腺における組織形態を比較し、また腺房系や導管系のマーカー遺伝子とその産物や、各種のシ

グナル伝達関連遺伝子とその産物の発現と局在を PCR 法、Western ブロット法、in situ ハイブリダイゼーション法、および免疫組織化学法で解析して比較した。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に顎下腺に発現が変化する mRNA をマイクロアレイ法により網羅的に解析した。

### 4. 研究成果

マウス顎下腺の導管系は著しい性差をもち、各種増殖因子を産生する顆粒性導管は雄でのみ発達する。雌マウスへのテストステロン投与により発現が亢進する遺伝子産物をマイクロアレイ法で解析した結果、受容体型蛋白質チロシンフォスファターゼ (RPTP) がそのひとつとして検出された。RPTP は中枢神経系においてニューロンの伸張等に関与するとされる蛋白質であり、長、短2種類の膜貫通受容体蛋白質および長、短2種類の分泌蛋白質の計4つの亜型をもつ。受容体型の RPTP に対するリガンドとしていくつかの接着分子のほか、増殖因子のプレイオトロピンなどが知られ、受容体に結合することによりフォスファターゼ活性を抑制してシグナル伝達機構を作動させる。RPTP のマウス顎下腺における発現を RT-PCR で解析したところ、RPTP -S のサブタイプのうち短鎖受容体型 (RPTP -S) が発現し、雄で雌よりも高く、雌へのアンドロゲン投与により発現が増した。免疫組織化学で、RPTP -S は雄では介在部導管に強く局在して顆粒性導管では全く陰性であったが、雌では介在部導管と線条部導管に広く分布した。またプレイオトロピンも顎下腺に発現し、雄雌で発現量の差は見られなかった。プレイオトロピンは雄では介在部および隣接する顆粒性導管の遠位端に局在したが、雌では介在部と線条部導管全域に広く分布し、RPTP -S と共存した。これらの結果から、マウス顎下腺の導管系において RPTP -S とそのリガンドであるプレイオトロピンの発現の組み合わせが、導管系の性差の形成に関与している可能性が示唆された (発表論文2)。

マウス三大唾液腺において、耳下腺の腺房細胞が消化酵素アミラーゼの主な産生部位として知られている。一方で、顎下腺や舌下腺におけるアミラーゼ産生の程度および産生細胞の種類については必ずしも確定していない。これを明らかにするため、アミラーゼの mRNA と蛋白質の発現と局在を雄雌マウスの三大唾液腺を用いて定量的および組織化学的に解析した。アミラーゼ mRNA の発

現量は耳下腺、顎下腺、舌下腺の順に高かった。耳下腺と舌下腺ではアミラーゼ mRNA の発現に性差は認められなかったが、顎下腺では雌の発現量は雄の30%程度だった。In situ ハイブリダイゼーションと免疫組織化学において、アミラーゼの mRNA と蛋白質のシグナルは耳下腺の腺房細胞、舌下腺の漿液性半月細胞、および雄の顎下腺の顆粒性膨大部導管 (GCT) 細胞に強く陽性であり、雌雄の顎下腺の漿液性の腺房細胞に弱く陽性、舌下腺の粘液性腺房細胞には陰性だった。これらの結果から、マウスの顎下腺ではアミラーゼは主に GCT 細胞で、一部は腺房細胞で産生されること、また舌下腺では主に漿液性半月細胞で産生されることが明らかとなった (発表論文1)。

アンドロゲン受容体 (AR) を欠損するマウス (ARKO) の顎下腺を調べたところ、雄の ARKO でも雌と同様に顆粒性導管の発達が見られず、アンドロゲン投与によっても転換が見られなかったが、甲状腺ホルモンを投与すると ARKO でも顆粒性導管細胞への転換が見られた。このことから、顆粒性導管細胞の分化には古典的な AR を必要とすること、甲状腺ホルモンは AR なしに顆粒性導管細胞の分化を引き起こすことがわかった。正常マウスと ARKO マウスとの間で、また ARKO マウスにアンドロゲンや甲状腺ホルモンを投与する前後で顎下腺の発現遺伝子を網羅的に比較解析することにより、顆粒性導管に特異的な遺伝子や、古典的な経路によらずにアンドロゲンにより誘導される遺伝子を同定した (論文投稿中)

細胞骨格蛋白質のケラチン 5 (K5) は、マウス顎下腺導管系の一部に存在するとされるが、詳細な局在とその変化は明らかでない。そこでマウス顎下腺の生後発達において K5 の局在を免疫組織化学で追求したところ、K5 は生後まもなくから分化した筋上皮細胞に局在した。さらに、生後まもなくでは導管系細胞に広く存在するが、介在部導管が形成される2週以降は、介在部導管のうち腺房に近い顆粒性介在部導管細胞には存在せず、線条部導管との境界部分の二層性上皮の基底側の細胞、また排出導管の基底側の細胞に局在した。このことから、K5 は筋上皮細胞のマーカーであるとともに、介在部導管細胞が線条部導管細胞に分化 (雄では思春期以降にさらに顆粒性導管細胞に分化) するときや、の前駆細胞のマーカーであることが示唆された (論文準備中)。

## 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2件)

1) Yamagishi R, Wakayama T, Nakata T, Adthapanyawanich K, Kumchantuek T, Yamamoto M, Iseki S (2014) Expression and localization of  $\alpha$ -amylase in the submandibular and sublingual glands of mice. *Acta Histochemica et Cytochemica* 印刷中 (査読有)

2) Adthapanyawanich K, Yamamoto M, Wakayama T, Nakata H, Keattikunpairoj S, Iseki S (2013) Expression and localization of receptor protein tyrosine phosphatase  $\beta$  and its ligand pleiotrophin in the submandibular gland of mice. *Archives of Oral Biology* 58: 181-191 (査読有)

[学会発表](計12件)

1) 山本美由紀、井関尚一：マウス顎下腺の生後発達過程におけるケラチン5免疫陽性前駆細胞の発現動態。第119回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014年3月27~29日、自治医科大学キャンパス(栃木県)

2) 井関尚一、Adthapanyawanich K、若山友彦、山本美由紀、仲田浩規、Kumchantuek T、山岸諒子、西内巧：アンドロゲン受容体欠損マウス顎下腺の形態と遺伝子発現。第119回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014年3月27~29日、自治医科大学キャンパス(栃木県)

3) 山岸諒子、Adthapanyawanich K、仲田浩規、山本美由紀、若山友彦、井関尚一：マウス顎下腺および舌下腺におけるアミラーゼの発現と局在。第73回日本解剖学会中部支部学術集会、2013年10月5~6日、山梨大学甲府キャンパス(山梨県)

4) Adthapanyawanich K, Yamagishi R, Kumchantuek T, Iseki S: The classical and non-classical actions of androgens in the submandibular gland of mice. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会、2013年3月28~30日、サンポートホール高松(香川県)

5) 山本美由紀、井関尚一：マウス顎下腺の

生後発達におけるケラチン5発現細胞の局在. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会、2013年3月28～30日、サンポートホール高松(香川県)

6) Adthapanyawanich K, Nakata H, Yamamoto M, Yamagishi R, Wakayama T, Iseki S: Study on the submandibular gland of androgen-deficient mice. 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones and Cancer, November 15-17, 2012, Kanazawa University, Ishikawa.

7) Iseki S: The duct system of mouse submandibular gland as a model of hormone-dependent cell differentiation. The 4th Japan-Korea Joint Symposium on Recent Advance in Medical Science (招待講演). November 7, 2012, Kanazawa University, Ishikawa.

8) 山岸諒子, Kannika A, 仲田浩規, 山本美由紀, 若山友彦, 井関尚一: アンドロゲン受容体欠損マウスにおける顎下腺の研究. 第72回日本解剖学会中部支部学術集会、2012年10月13～14日、じゅうろくプラザ(岐阜県)

9) Adthapanyawanich K, Nakata H, Yamamoto M, Yamagishi R, Wakayama T, Iseki S: Studies on the submandibular gland of androgen-receptor-deficient mice. 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Aug. 26-29, 2012, Kyoto International Conference Center, Kyoto

10) 山本美由紀, 井関尚一: マウス顎下腺におけるケラチン5発現細胞. 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会、2012年3月26～28日、山梨大学甲府キャンパス(山梨県)

11) Adthapanyawanich K, Nakata H, Wakayama T, Iseki S: Studies on the submandibular gland of androgen receptor-deficient mice. 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会、2012年3月26～28日、山梨大学甲府キャンパス(山梨県)

12) Adthapanyawanich K, Wakayama T, Yamamoto M, Iseki S: Expression and

localization of receptor protein tyrosine phosphatase  $\beta$  in the submandibular gland of mice. 第52回日本組織細胞化学会総会・学術集会、2011年9月24～25日、金沢大学宝町キャンパス(石川県)

〔その他〕

ホームページ等

<http://anal.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井関 尚一 (ISEKI, SHOICHI)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号: 50167251

### (2) 研究分担者(なし)

### (3) 連携研究者

若山 友彦 (WAKAYAMA, TOMOHIKO)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号: 70305100

山本 美由紀 (MIYUKI, YAMAMOTO)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号: 60139780

中谷 雅明 (NAKAYA, MASA AKI)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号: 70422095

(平成13年8月まで)