

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460270

研究課題名(和文) ホルモンによるマウス顎下腺分化の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms in the hormone-dependent differentiation of 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) 3,900,000 円

研究成果の概要(和文)：マウス顎下腺に見られる2種類の性差のうち、雄における顆粒性導管(GCT)細胞の優位な増加はアンドロゲン受容体(AR)の欠損マウス(ARKO)では起こらないのでARに依存すること、ARKOへの甲状腺ホルモン(T4)投与によりARと無関係にGCT細胞が増加することがわかった。一方、雄における顆粒性介在部導管(GID)細胞の優位な減少はARKOでは起こらず、ARKOへのT4投与でも変化しなかったため、両者は異なるホルモン依存性をもつことがわかった。また正常及びARKO顎下腺の遺伝子発現の網羅的解析により、GCT細胞に特異的な多くの遺伝子産物を同定した。

研究成果の概要(英文)：Of the two kinds of sexual dimorphism in the mouse submandibular gland (SMG), the preferential increase of granular convoluted tubule (GCT) cells in males was lacking in androgen receptor (AR)-deficient mice (ARKO) and, thus, proved to be dependent on AR, whereas the administration of thyroid hormone (T4) to ARKO caused increase of GCT cells independent of AR. On the other hand, the preferential decrease of granular intercalated duct (GID) cells in males was lacking in ARKO, and administration of T4 caused no decrease of GID cells, suggesting that the two kinds of sexual dimorphism have different hormone dependency. Furthermore, the gene expression profile of the normal and ARKO SMG identified numbers of new GCT-specific gene products.

研究分野：医歯薬学

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

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 GCT 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や甲状腺ホルモンを投与すると、数日のうちに線条部導管は再び GCT 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。しかしこれらホルモンによる GCT 細胞分化の分子メカニズムは不明である。従来、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自身が核において 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 (ゲノム作用) が知られてきた。最近、ステロイドホルモン-受容体系が、細胞膜蛋白質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。また、マウス顎下腺の性差は雄における GCT 細胞の増加のみならず、生後初期に介在部導管の遠位端にある顆粒性介在部導管 (GID) 細胞が思春期以降、雄において急速に減少することにも現れるが、この現象へのアンドロゲンや甲状腺ホルモンの関与は不明である。

2. 研究の目的

マウスの顎下腺導管系では、アンドロゲン及び甲状腺ホルモンに依存して劇的な細胞分化が起こるが、その分子機構は不明である。本研究では、成獣及び生後各齢の正常及びア

ンドロゲン受容体欠損 (ARKO) の雌雄マウスを用い、これらにアンドロゲンや甲状腺ホルモンを投与した場合の顎下腺の表現形及び遺伝子発現の変化を解析し、また性差をもって発現する各種の遺伝子とその産物の性状を解析する。これらの研究により、マウス顎下腺のホルモン依存性の分化の分子機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

正常及び ARKO の雌雄マウスの成獣及び生後各齢において、顎下腺の組織形態を比較し、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、及び光学顕微鏡や電子顕微鏡レベルの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した。受容体や酵素など特定の蛋白質が結合する相手の蛋白質を同定するために、免疫沈降法と質量分析法を用いた。導管系の前駆細胞を特異的マーカーにより標識して導管系各部分への分化を追跡する研究も行った。

4. 研究成果

雌雄マウスの 3 大唾液腺において消化酵素アミラーゼの mRNA および蛋白質の発現と局在を定量的および組織化学的に調べたところ、耳下腺の腺房細胞に強く発現するほか、顎下腺では雄に発達する GCT 細胞に中等度の発現、腺房細胞に弱い発現が見られ、舌下腺では漿液性半月細胞のみに発現が見られた (論文 5, 学会発表 2)。

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 GCT が発達せず、アンドロゲン投与によっても GCT 細胞への転換がなかったが、甲状腺ホルモンを投与すると ARKO でも GCT 細胞への転換が見られた。このことから、GCT 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 GCT 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、GCT 細胞特異的な新規遺伝子や、AR なしに甲状腺ホルモンにより誘導される遺伝子を同定した（論文 4，学会発表 6, 8）

マウス顎下腺の生後発達において細胞骨格蛋白質であるケラチン 5（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筋上皮細胞に局在した。さらに、出生直後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（GID）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、線条部導管や GCT，排出導管の上皮細胞に分化する前駆細胞のマーカーであることが示唆された（論文 3，学会発表 2）。

カルパインはカルシウム依存性システインプロテアーゼであり、標的蛋白を修飾することにより種々の細胞機能に関与する。カルパインの骨格筋タイプであるカルパイン 3 の発現と局在をマウス顎下腺で調べたところ、カルパイン 3 の mRNA 発現は思春期以後に雄の顎下腺で雌より高く、雌へのアンドロゲン投与で増加した。これは雄に発達する GCT 細胞の産物に特徴的なパターンである。免疫組織化学により、カルパイン 3 は GCT 部分に局在すること、GCT 細胞の細胞質のサイトゾル部分に局在して分泌顆粒には存在し

ないことがわかり、同細胞における分化や分泌調節での役割が示唆された（論文 2，学会発表 3, 5）。

蛋白質分解酵素の阻害物質セルピンファミリーの一員であるセルピン b6a のマウス顎下腺における発現と局在を調べたところ、mRNA 発現は雄で雌より高く、蛋白質は GCT 細胞の核とサイトゾル部分に局在して分泌顆粒には存在しなかった。また顎下腺においてセルピン b6a と結合する相手酵素を免疫沈降法と質量分析により調べたところ、GCT 細胞の分泌顆粒に存在するカリクレイン関連ペプチダーゼ 1b26 であることがわかり、セルピン b6a がカリクレインを不活化して細胞を保護していることが示唆された（論文印刷中，学会発表 2）

マウス顎下腺の介在部導管の遠位端にある GID 細胞は思春期以降に雄で雌よりはるかに早く減少する。GID 細胞は ARKO マウスで正常雌と同じように数が多く、思春期の正常雌へのアンドロゲン投与で減少したことから、GID 細胞減少はアンドロゲンに依存性であることがわかった。一方、思春期の正常雌や ARKO マウスに甲状腺ホルモンを投与しても GID 細胞の減少は見られず、甲状腺ホルモンには依存しないことがわかった（論文執筆中，学会発表 1, 4, 7）。

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 5 件）

- 1) Nakata H, Yamamoto M, Kumchantuek T, Adhapanawanich K, Nishiuchi T, Iseki S. Expression, localization, and possible function of the serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 6a (Serpib6a) in the submandibular gland of mice. Cell Tissue Res 印刷中（査読あり）

2) Kumchantuek T, Nakata H, Sakulsak N, Yamamoto M, Iseki S. Expression and localization of calpain 3 in the submandibular gland of mice. Arch Oral Biol 70:9-15, 2016 (査読有)

3) Yamamoto M, Nakata H, Kumchantuek T, Sakulsak N, Iseki S. Immunohistochemical localization of keratin 5 in the submandibular gland in adult and postnatal developing mice. Histochem Cell Biol 145(3):327-339, 2016 (査読有)

4) Adthapanyawanich K, Kumchantuek T, Nakata H, Yamamoto M, Wakayama T, Nishiuchi T, Iseki S. Morphology and gene expression profile of the submandibular gland of androgen receptor-deficient mice. Arch Oral Biol 60(2):320-332, 2015(査読有)

5) Yamagishi R, Wakayama T, Nakata H, Adthapanyawanich K, Kumchantuek T, Yamamoto M, Iseki S. Expression and localization of α -amylase in the submandibular and sublingual glands of mice. Acta Histochem Cytochem 47(3):95-102, 2014 (査読有)

〔学会発表〕(計 8 件)

1) 山本美由紀, 井関尚一：野生型およびアンドロゲン受容体 K0 マウスにおける顆粒性介在部細胞の生後発達とホルモンによる影響．第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会，2017 年 3 月 28～30 日，長崎大学医学部（長崎県）

2) 井関尚一：細胞の増殖・分化モデルとしてのマウス・ラット顎下腺．第 53 回日本口腔組織培養学会学術大会・総会，2016 年 11 月 17～18 日，石川県立美術館（石川県）

3) Tewarat Kumchantuek, Hiroki Nakata, Miyuki Yamamoto, Shoichi Iseki：

Expression and localization of calpain 3 in the submandibular gland of mice.

第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会，2016 年 3 月 28～30 日，ビッグパレットふくしま（福島県）

4) 山本美由紀，Tewarat Kumchantuek, 井関尚一：野生型およびアンドロゲン受容体 K0 マウスにおける顆粒性介在部細胞の生後発達とホルモンによる影響．第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会，2016 年 3 月 28～30 日，ビッグパレットふくしま（福島県）

5) Tewarat Kumchantuek, 仲田浩規，山本美由紀，井関尚一：マウス顎下腺におけるカルパイン 3 の発現と局在．日本解剖学会第 75 回中部支部学術集会，2015 年 10 月 3～4 日，福井大学医学部（福井県）

6) Tewarat Kumchantuek, Kannika Adthapanyawanich, Hiroki Nakata, Miyuki Yamamoto, Tomohiko Wakayama, Takumi Nishiuchi, Shoichi Iseki：

Morphology and gene expression profile of the submandibular gland of androgen receptor-deficient mice．第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会，2015 年 3 月 21～23 日，神戸国際会議場・展示場（兵庫県）

7) Miyuki Yamamoto, Tewarat Kumchantuek, Shoichi Iseki：Morphological and histochemical features of the intercalated duct in the submandibular gland of mice deficient for androgen receptor．第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会，2015 年 3 月 21～23 日，神戸国際会議場・展示場（兵庫県）

8) Tewarat Kumchantuek, 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導管系の分化 . 日本解剖学会第74回中部支部学術集会, 2014年10月11～12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)連携研究者

若山 友彦 (WAKAYAMA, TOMOHIKO)

金沢大学・医学系・准教授 (2015 年 3 月まで), 熊本大学・大学院生命科学研究部・教授 (2015 年 4 月から)

研究者番号 : 70305100

山本 美由紀 (YAMAMOTO, MIYUKI)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号 : 60139780

仲田 浩規 (NAKATA, HIROKI)

金沢大学・医学系・助教 (2016 年 7 月まで), 金沢大学・医学系・講師 (2016 年 8 月から)

研究者番号 : 80638304