The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	胎生期マウス唾液腺におけるメラトニンの役割
Author(s)	尾花, 綾
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34356
rights	© 2015 Obana-Koshino et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

学位論文

胎生期マウス唾液腺における
メラトニンの役割

大阪大学大学院歯学研究科　統合機能口腔科学専攻
高次脳口腔機能学講座　顎口腔機能治療学教室
（主任：阪井　丘芳　教授）

尾花　綾

緒　　言

唾液腺の発生はヒトの顎下腺で胎生 6 週ごろに口腔上皮が肥厚し間葉組織に索状に侵入することから開始する。マウスの顎下腺では胎生 12 日から始まり、胎生 13 日には単房状の上皮組織に裂け目（cleft）が入り、枝分かれ（分枝）を繰り返しながら、茎部が伸長し形成される[1)]。この発生過程は、分枝形態形成と呼ばれ、唾液腺をはじめ乳腺、前立腺などの分泌腺や腎臓、肺などの様々な器官に共通している[2, 3)]。分枝形態形成は上皮間葉相互作用により制御され、上皮成長因子（EGF）や線維芽細胞増殖因子（FGF）など様々な成長因子により調節を受けており[4, 5)]、細胞外マトリックスの関与も報告されているが[6, 7)]、その現象を引き起こす詳細な分子機構は明らかにされていない。

メラトニンは松果体から分泌されるホルモンである[8)]。光環境により同調された概日リズムの位相が視交叉上核（SCN）から松果体に伝えられ、メラトニンの血中への分泌のタイミングがコントロールされている。メラトニン合成は、４つの酵素（Tryptophan hydroxylase, 5-hydroxytryptophan amino acid decarboxylase, arylalkylamine N-acetyltransferase: AANAT, hydrozyindole-O- methyltransferase: HIOMT）が担っている。L-トリ

プトファンからセロトニンが合成され、律速酵素として AANAT がセロトニンをアセチル化し、最終酵素として HIOMT がアセチル化されたセロトニンをメラトニンに変換する[8, 9]。この AANAT が夜間のみ活性化されるため、メラトニンの血中濃度は昼間に低く、夜間に高くなり明瞭な日周変動を示す[10]。

メラトニンは松果体に特異的なホルモンであるとされてきたが、網膜や脳（大脳皮質、線条体など）、消化管、精巣、卵巣、骨髄、リンパ球からも発見されている[11, 12]。さらに、組織や細胞だけでなく唾液中にも存在していることが報告されているが[13]、過去の研究ではメラトニンは松果体から分泌され血流を介して唾液中に到達すると考えられていた[14]。しかし、ヒトやラットの成体唾液腺組織からメラトニン合成酵素とメラトニンの発現が認められ、唾液腺自体がメラトニンを合成し、唾液中に分泌している可能性が報告されている[15]。メラトニンの生理作用として、サーカディアンリズムの同調、体温調整、免疫系の活性化、抗腫瘍活性、フリーラジカル除去・抗酸化等が明らかにされており[16, 17]、受容体が口腔粘膜上皮に発現していることから、唾液腺から分泌されたメラトニンは口腔内に特異的な生理的作用を有している可能性が示唆されている[11]。さらに、

骨[18]、歯[19]、精巣[20, 21]や副腎[22]などの器官形成への関与が報告されており、口腔の器官である唾液腺の発生への関与が推察され、分枝形態形成の新たな制御因子となる可能性が考えられる。胎生期唾液腺を用いてメラトニンの分枝形態形成への作用を明らかにすることは、唾液腺だけでなく様々な器官の分枝形態形成を制御する機構の解明につながり、疾患に対する新たな治療法の開発や再生医療を実現化するために重要である。

本研究は、胎生期の唾液腺におけるメラトニンの発現と胎生期の器官形成への関与を明らかにすることを目的とした。胎生期マウス唾液腺におけるメラトニンとメラトニン受容体の発現を示し、メラトニンの唾液腺発生における分枝形態形成への作用とそのメカニズムを解析した。

材料と方法

1. 実験動物

ICR 系妊娠マウス（日本 SLC 株式会社）の胎仔を用いた。大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の規定に基づいて動物実験を行った。

2. 唾液腺の採取、器官培養

胎生 12.5 日齢（以下、E12.5）の胎仔を摘出し、実体顕微鏡 Stemi2000-CS（Carl Zeiss）で確認しながら、胎仔の下顎下縁に平行に口角と頸部に切開を加え、下顎を摘出した。さらに、下顎から舌を摘出し、舌に付着している 2 つの唾液腺を採取し、Sakai[6)]らの方法に準じて器官培養を行った。150 μg/ml ビタミン C（Sigma-Aldrich）と 50 μg/ml トランスフェリン（Sigma-Aldrich）を添加した DMEM/F12 培地（Life Technologies）200 μl で 50 mm Glass Bottom Microwell Dish（MatTek Corporation）の中央の窪みをみたし、メンブレン（直径 13 mm、ポアサイズ 0.1 μm ; Whatman）を介した気相液相界面に 8 個の唾液腺を静置し、37℃, 5% CO2 条件下で培養を行った。メラトニン添加群では 1 μM または 100 μM メラトニン添加培地で培養を行った。

培地は培養後 24 時間、36 時間、48 時間で交換した。唾液腺の分枝形態形成と大きさを評価するために、培養後 48 時間、60 時間に形成された腺房の数（以下、分枝数）と上皮組織の大きさ（組織像により二次元的に面積で評価）を測定した。メラトニンは Sigma-Aldrich から購入した。

3. Quantitative real time RT-PCR による定量的遺伝子発現解析

発生時期ごとの遺伝子発現を明らかにするために、E13、E14、E15、E16、生後 1 日齢（以下、P1）、P12 の唾液腺を摘出した。さらに、胎生期の臓器ごとの遺伝子発現を明らかにするために、E13 の唾液腺（SMG）、肺、腎臓、脳、胃、肝臓を摘出した。それぞれの組織から PureLink® RNA Mini Kit（Life Technologies）を使用して全 RNA を抽出し、Genomic DNA の混入を防ぐため、DNase I （Roche）を用いて DNase 処理を行った。Prime Script® RT reagent Kit（Takara Bio Inc.）を用いて mRNA と特異的な cDNA の合成を行った。遺伝子発現の定量は My iQ™ single-color real-time PCR Detection System（BIORAD）を用いて SYBR Green PCR protocol に従った。用いたプライマーは表 1 に示す通りである。目的遺伝子の発現量はハウスキーピング遺伝子

である Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）遺伝子を内部標準物質として補正した。

4. 蛍光免疫組織染色

E13 の唾液腺を摘出し 12 時間器官培養した後、4% パラホルムアルデヒド（PFA）、5% スクロース（Wako Pure Chemical）、0.1% triton-X（Wako Pure Chemical）で 6 分、4% PFA（Wako Pure Chemical）、5% スクロース（Wako Pure Chemical）で 14 分処理しリン酸緩衝液（Cambrex Corporation）にて洗浄し、VECTOR® M.O.M. immunodetection Kit（VECTOR Laboratories Inc.）を用いてブロッキングした。一次抗体として MTR1A antibody（ウサギ抗体、Assay Biotechnology）、E-cadherin antibody（マウス抗体、BD Biosciences）を室温にて 3 時間反応させた。二次抗体として Cy5 と結合した抗ウサギ抗体と Cy3 と結合した抗マウス抗体を反応させ、SYBR® Green I（Life Technologies）で核染色を行い、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 LSM510（Carl Zeiss）により観察した。

5. 組織、培地中のメラトニン量の定量

E13 及び成体の唾液腺組織中のメラトニン濃度と E13 の唾液腺を 48 時間器官培養した後の培地上清のメラトニン濃度を、伊藤ら[23] の方法に準じて High Performance Liquid Chromatography（HPLC）を用いて測定した。試料は酸化防止剤として Butylated Hydroxy Toruen（BHT）15 μg を加えたクロロホルム 10 ml で 10℃において 2 日間、スターラで攪拌しながら抽出し、クロロホルム層 7 ml を取り出して窒素乾固した。50 mM 酢酸アンモニウム（pH4.8）、30% メタノールからなる HPLC 移動相 300 μl に再度溶解し、遠心分離（500 g × 1 分）後、上清を millex® LH 0.45 μm （Millipore）でろ過した後、100 μl を HPLC にかけた。測定に用いたカラムは Capcell Pak C18 MGⅡ（5 μm, 4.6 mm × 250 mm, Shiseido）であり、RF-10AXL 蛍光検出器（Shimadzu）によりメラトニンを検出した。測定条件は、励起波長：280 nm、蛍光波長：340 nm とし、流速は 0.8 ml/分、カラム温度は 40℃とした。メラトニンの標準溶液を用いて溶出時間を確認し、作成した検量線によって試験溶液中のメラトニン濃度を求めた。本実験での検出限界は 1 pg であり、測定内変動（CV）は 0.36%（n = 5）、測定間変動（CV）は 0.80%（n = 7）であった。メラトニンと BHT は、

Sigma-Aldrich から、クロロホルム、酢酸アンモニウム、メタノールは、Wako Pure Chemical から購入した。

6. 増殖細胞とアポトーシス細胞の検出

E12.5 の唾液腺を摘出し、コントロール群とメラトニン添加群を器官培養した。48 時間後に唾液腺を回収し、増殖細胞とアポトーシス細胞の検出のために EdU 法と TUNEL 法により染色を行った。EdU 法は、Click-iT™ EdU Alexa Fluor® Imaging Kits（Life Technologies）を用いて EdU（5-ethynyl-2'-deoxyuridine）ラベリングし、3.7% ホルムアルデヒド（Thermo Scientific）で 15 分固定し、3% BSA（MP Biomedicals）でブロッキングし、0.5% Triton-X に浸漬した後、プロトコールに従い EdU 反応液に浸漬した。TUNEL 法は、4% PFA にて 1 時間固定し、洗浄後浸透化液（0.1% クエン酸ナトリウム、0.1% Toriton-X）に浸漬した後、In Situ Cell Death Detection Kit（Roche Diagnostics）のプロトコールに従い TUNEL 反応液を加え 1 時間反応させた。その後、Lectin PNA Conjugate（Life Technologies）により上皮細胞を SYBR® Green I により核を共染色し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 LSM510（Carl Zeiss）により観察した。

7. 電子顕微鏡（TEM）による唾液腺の微細構造の観察

E12.5 の唾液腺を摘出し、コントロール群とメラトニン添加群を器官培養した。48 時間後に唾液腺を回収し、Karnovsky 固定液（2% パラホルムアルデヒド、2.5 % グルタールアデヒド）で 2 時間固定し、カコジル酸緩衝液にて十分洗浄した後、2% オスミウム酸（pH7.3, 0.1 M リン酸緩衝液）に浸漬して後固定を 2 時間行った。後固定を行った後カコジル酸緩衝液にて洗浄し、エタノール上昇系にて脱水を行い、エポキシ樹脂に包埋した。透過型電子顕微鏡の試料を作製する前に約 2 μm の切片を薄切し、トルイジンブルーで染色後、光学顕微鏡で観察した。ブロックのトリミングを行った後、70 nm の超薄切片作成し 2% 酢酸ウランおよび 0.4% クエン酸鉛により電子染色を行った。加速電圧 200 kV にて透過型電子顕微鏡（日立、H-800）により観察した。

8. 統計分析

実験結果は平均 ± 標準誤差（S.E.）で表し、Bonferroni 法を用い多重比較検定を行った。

結　　果

1. 胎生期マウス唾液腺におけるメラトニン合成酵素の遺伝子発現

唾液腺のメラトニンの合成能を確認するために、発生時期ごとのメラトニン合成酵素（AANAT、HIOMT）の mRNA 発現をリアルタイム PCR にて解析した。マウスの胎生期から生後にかけて唾液腺からメラトニン合成酵素（AANAT、HIOMT）の遺伝子発現が認められた。*Aanat*、*Hiomt* の発現は、ともに胎生初期の E13 で高く、唾液腺の形成に伴ってその発現は減少し、生後にはその発現が再び増加した（図 1A，B）。唾液腺でメラトニン合成酵素の発現が高い E13 において、その他の臓器でのメラトニン合成酵素の遺伝子発現を確認すると、松果体の存在する脳だけでなく、成体でメラトニンの発現が報告されている胃などの様々な器官でも *Aanat*、*Hiomt* の発現が認められた。さらに、唾液腺と同様に分枝形態形成が行われる肺や腎臓においても *Aanat*、*Hiomt* ともに発現が認められた。最終酵素である *Hiomt* の発現は器官における差が大きかった（図 1C，D）。以上の結果より、胎生期マウス唾液腺はメラトニン合成能を有している可能性があり、特に胎生初期に高発現していることが示された。

2. マウス唾液腺のメラトニン分泌能

E13.0 と成体のマウス唾液腺組織中のメラトニン濃度を比較すると、胎生期唾液腺では 9.94 ± 2.36 pg/mg、成体唾液腺では 0.06 ± 0.01 pg/mg であり、胎生期唾液腺組織中の方が高いメラトニン濃度を示した。E13 の唾液腺を摘出し 48 時間器官培養した後の培地上清中の濃度は 93.00 ± 9.49 pg/ml であった（表 2）。以上の結果より胎生期唾液腺はメラトニンを合成・分泌しており、成体唾液腺よりその分泌能は高いことが示唆された。

3. 胎生期マウス唾液腺におけるメラトニン受容体の遺伝子発現とその局在解析

胎生期から生後にかけて唾液腺からメラトニン受容体（MT1）の mRNA 発現が認められ、特に胎生初期の E13 で発現が高く、発生に伴い発現は減少した。E13 の各臓器からも *Mt1* の発現が認められ、唾液腺と同様に分枝形態形成により器官発生する肺でも発現が認められた（図 2A, B）。蛍光免疫染色法により MT1 は唾液腺の腺房と導管の上皮に発現し、特に腺房上皮に高い発現が認められた。さらに、強拡大により細胞膜に局在していることが示された（図 2C）。以上

の結果より、胎生期マウス唾液腺の腺房上皮の細胞膜に MT1 は強く発現しており、発生に関与している可能性が示唆された。

4. メラトニンの胎生期マウス唾液腺に対する分枝抑制効果

E12.5 のマウス唾液腺を摘出し、メラトニンを添加（1 μM、100 μM）した培地で器官培養を行った（図 3A）。器官培養後 48 時間、60 時間において分枝数を計測した。48 時間後、60 時間後ともメラトニンを添加した群ではコントロール群と比較し、分枝数が有意に減少した（図 3B）。唾液腺の大きさを定量的に評価するために上皮組織の面積を計測すると、メラトニン 1 μM 添加群では培養後 48 時間、60 時間とも、メラトニン 100 μM 添加群では培養後 60 時間でコントロール群に比較し、有意に上皮組織の面積が縮小した（図 3C）。以上の結果よりメラトニンは唾液腺の分枝形態形成を抑制した。

5. メラトニンの唾液腺分枝抑制作用における細胞増殖とアポトーシスへの影響

メラトニンによる唾液腺分枝抑制作用は細胞増殖の抑制もしくは、アポトーシスの誘導の影響を受けているかを検討した。E12.5 のマウ

ス唾液腺を摘出し、コントロール群とメラトニン添加群（1 μM、100 μM）を 48 時間器官培養し、細胞増殖は EdU 法、アポトーシスは TUNEL 法による蛍光免疫染色により確認した。両群とも EdU 陽性細胞は腺房上皮組織に確認され、TUNEL 陽性細胞は間葉組織の辺縁のごく一部に認められたが、唾液腺上皮組織には認められなかった（図 4A）。さらに、上皮組織における EdU 陽性細胞数、TUNEL 陽性細胞数を imageJ ソフトにて定量的に評価しても、EdU 陽性細胞数は両群において有意な差はなく、TUNEL 陽性細胞は認められなかった（図 4B, C）。これらよりメラトニンの唾液腺分枝抑制作用は細胞増殖の抑制、アポトーシスの誘導によるものではないことが示唆された。

6. メラトニンにより分枝抑制された唾液腺の形態学的解析

メラトニンによる唾液腺分枝抑制のメカニズムを明らかにするために、透過型電子顕微鏡にて唾液腺の微細構造を検討した。E12.5 のマウス唾液腺を摘出し、コントロール群とメラトニン添加群（1 μM、100 μM）を 48 時間器官培養し、唾液腺上皮細胞の形態を比較した。導管の上皮細胞はメラトニン添加の有無で大きな差はなかったが、腺房の上皮細胞はメラトニン添加群でコントロール群に比べて小突

起が減少し、細胞の辺縁部は不規則な形態となり、隣接した細胞との接触している領域が広くなった（図 5A）。隣接細胞との接着領域を定量化するために、細胞周長あたりの細胞接着部分の長さを adhesion ratio と定義した（図 5B）。導管部分ではメラトニン添加により adhesion ratio に有意差はなかったが、腺房部分では adhesion ratio の有意な増加が認められた（図 5C）。さらに、細胞接着分子の一つである *E-cadherin* の遺伝子発現はメラトニン添加により有意に増加した（図 5D）。以上の結果よりメラトニンは E-cadherin などの接着因子の誘導を介して細胞接着を制御することにより、腺房の上皮細胞の形態を変化させ、分枝形態形成を制御している可能性が示唆された。

考　　察

唾液は、耳下腺、顎下腺、舌下腺のような三大唾液腺と小唾液腺により分泌される。唾液は、様々な酵素、タンパク質、糖タンパク質を含んでおり、消化作用、抗菌作用、緩衝作用、味覚作用、歯の再石灰化作用、組織修復作用など多くの生理作用を有している[24)]。

メラトニンには様々な生理作用が報告されており、唾液中にも存在することから口腔への作用が研究され、歯周病との関連も報告されている[25)]。さらに、骨[18)]、歯[19)]、精巣[20, 21)]、副腎[22)]などの器官形成への関与が報告されているため、唾液腺の発生にも関与している可能性が推察される。唾液腺の分枝形態形成の詳細な分子機構は解明されていないので、分枝形態形成の新たな調節因子を明らかにするためにメラトニンの分枝形態形成への作用を解析した。まず、メラトニンの由来と標的器官を確かめるために、メラトニンとメラトニン受容体（MT1）の発現を確認した。

本研究は ICR 系統のマウスを用いたが、多くの実験用成体マウスはメラトニンを産生しないという報告があり、ICR 系統マウスでも様々な報告があり見解は一致していない[26, 27, 21)]。メラトニン合成酵素（AANAT、HIOMT）の遺伝子発現とメラトニンの発現が認められ

たことから、本研究により初めてメラトニンは胎生期の唾液腺から直接分泌されることが示唆された。

メラトニンは胎盤を通過することができるため、胎仔の概日リズムは母体の血中メラトニンのリズムにより調整される[28, 29]。メラトニンは主に松果体から分泌されるため、母体の松果体を摘出すると母体と胎仔ともに血中メラトニンリズムは消失し、血中メラトニン濃度は日中と同程度の低濃度となることが報告されている[30]。興味深いことに、松果体を摘出したとき、胎仔の血中メラトニン濃度は母体より高い濃度となることも報告されている[30]。この報告から、松果体を摘出しても日中と同程度の血中メラトニン濃度が認められることは、末梢組織でもメラトニンは分泌されており、さらに胎生期の方がその分泌能が高い可能性が示唆される。このことは末梢組織である唾液腺組織からメラトニンが分泌され、その分泌能は成体唾液腺より胎生期唾液腺の方が高いという本研究結果と共通している。

血中の日内変動に関しては母体の影響を強く受けると考えられるが、胎生期唾液腺における局所的なメラトニン合成酵素の遺伝子発現は発生段階で特徴的であり、胎生初期に高く、発生に伴い減少し

た（図 1A, B）。さらに、*Mt1* の遺伝子発現も同様に胎生初期に高く、発生に伴い減少した。胎生初期は細胞増殖が旺盛であり、上皮組織が単房状になり cleft 形成が開始される。この時期に特異的にメラトニンや MT1 の発現が高く、MT1 が上皮細胞の膜に局在していることから、唾液腺組織で合成されたメラトニンがオートクライン的に上皮組織に作用し、上皮形態形成に関与していることが推測される。リンパ球でオートクラインもしくはパラクライン的にメラトニンが産生され、免疫活性作用を有しているという過去の報告[31)]からも局所的に作用している可能性は支持される。生後には *Mt1* の遺伝子発現は減少するのに対し、メラトニン合成酵素の遺伝子発現が増加したのは、生後には腺房における形態形成だけではなく、他の役割を果たしている可能性も考えられる。しかし、成体唾液腺組織中のメラトニン濃度は胎生期唾液腺よりも低濃度であった。これは生後に何等かの影響により合成酵素の活性が抑制されていると考えられる。メラトニンを分泌する野生型の成体マウスの胸腺と脾臓の組織中のメラトニン濃度である 2.56 pg/mg、4.14 pg/mg と比較して[32)]、胎生期唾液腺の組織中のメラトニン濃度は 9.94 pg/mg と高い濃度が検出されており、胎生初期に局所的に高い濃度で作用していると考えら

れた。

メラトニンの器官形成への作用を明らかにするために、胎生期唾液腺の器官培養モデルを用いて、メラトニン添加の影響を解析した。メラトニン添加により、胎生期唾液腺の分枝形態形成は抑制され形成される上皮組織の大きさはコントロール群と比較して縮小した（図 3)。メラトニンは細胞増殖やアポトーシスに影響を与えなかったことから、分枝形態形成の抑制や上皮組織の大きさの縮小は、細胞数の変化によるものではなく、細胞の大きさや形、密度など細胞形態の変化によるものである可能性が示唆された。そこで、透過型電子顕微鏡にて唾液腺の微細構造を観察した。上皮細胞の大きさはメラトニン添加の有無で有意な差はみられなかった。導管の上皮細胞はメラトニン添加の有無で細胞形態に大きな差はなかったが、腺房の上皮細胞ではメラトニン添加により小突起が減少し、不規則な辺縁形態となり、隣接した細胞との接着している領域が増加した（図 5A)。これらの結果から、メラトニンは MT1 が強く発現している腺房に作用し、分枝形態形成を制御していることが示唆された。

唾液腺を含め、肺、腎臓、乳腺などの器官では、上皮が分枝形成を繰り返しながら形成される。この分枝形態形成には Fibronectin や

E-cadherin など様々な分子が関与していると報告されている [1)]。E-cadherin による細胞間接着から細胞と細胞外マトリックスの接着に転換し、細胞同士の接着が局所的に弱まることにより cleft が入り、間葉細胞が侵入し分枝する [6)]。本研究においては、この cleft が入るメカニズムと逆方向の現象が生じていると考えられる。上皮細胞間の接着が密接になり、細胞と細胞外マトリックスの接着への転換が抑制されることにより、cleft 形成、分枝形態形成が抑制されたと考えられる。細胞接着に対する分子レベルでの変化が予測されたため、メラトニン添加に伴う細胞間接着分子の一つである *E-cadherin* の遺伝子発現の変化を解析すると、メラトニン添加に伴い *E-cadherin* の遺伝子発現は有意に増加していた（図 5D）。ヒト乳がん由来細胞 MCF-7 においてメラトニン添加により E-cadherin が誘導されるという報告があることからも、メラトニンは E-cadherin などの細胞接着分子を誘導することにより細胞接着を制御していることが示唆される [33)]。

本研究結果からメラトニンの作用とそのメカニズムを推測すると、胎生期において、唾液腺からメラトニンがオートクライン・パラクライン的に分泌され、メラトニンが腺房上皮の細胞膜に存在する

MT1 に到達し、細胞接着が誘導されることにより、上皮細胞間接着の低下に伴う cleft 形成を阻害し、分枝形態形成や器官の大きさの制御に関与していることが示唆される（図 6)。また、肺や腎臓においても胎生初期にメラトニン合成酵素や *Mt1* の遺伝子発現が認められたことから、他の器官においてもメラトニンは器官形成に関与していることが予想される。

近年、器官形成の大きさや分化を調節するための研究は、再生医療への発展も期待されることから、注目されている[34, 35)]。本研究によりメラトニンの器官形成への新しい作用が示唆されたことは、さらなるメカニズムの解明により再生医療において器官形成を調整する手段の一つとして応用が期待されると考えている。

謝　　辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただきご鞭撻を賜りました大阪大学歯学研究科　高次脳口腔機能学講座　阪井丘芳教授に深甚なる謝意を表します。そして本研究の遂行にあたり、御懇厚なる御助言を賜りました東京医科歯科大学　教養部生物学分野服部淳彦教授に心より感謝申しあげます。さらに、本研究を行うにあたり多大なるご協力とご教示をいただきました大阪大学歯学研究科　時間生物学研究室　中村　渉准教授ならびに同療護歯科保健学講座　三浦治郎助教に深謝申し上げます。最後に、本研究に対し多大なるご協力を頂きました高次脳口腔機能学講座　顎口腔機能学教室の皆様に厚く御礼申し上げます。

文　　献

1) Hsu, J.C. and Yamada, K.M. (2010): Salivary gland branching morphogenesis--recent progress and future opportunities. *Int. J. Oral Sci.,* **2,** 117-126.

2) Metzger, R.J. and Krasnow, M.A. (1999): Genetic control of branching morphogenesis. *Science,* **284,** 1635-1639.

3) Davies, J.A. (2002): Do different branching epithelia use a conserved developmental mechanism? *Bioessays,* **24,** 937-948.

4) Steinberg, Z., Myers, C., Heim, V.M., Lathrop, C.A., Rebustini, I.T., Stewart, J.S., Larsen, M. and Hoffman, M.P. (2005): FGFR2b signaling regulates ex vivo submandibular gland epithelial cell proliferation and branching morphogenesis. *Development,* **132,** 1223-1234.

5) Thesleff, I. (2003): Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J. Cell Sci.,* **116,** 1647-1648.

6) Sakai, T., Larsen, M. and Yamada, K.M. (2003): Fibronectin requirement in branching morphogenesis. *Nature,* **423,** 876-881.

7) Onodera, T., Sakai, T., Hsu, J.C., Matsumoto, K., Chiorini, J.A. and

Yamada, K.M. (2010): Btbd7 regulates epithelial cell dynamics and branching morphogenesis. *Science*, **329,** 562-565.

8) Macchi, M.M. and Bruce, J.N. (2004): Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front. Neuroendocrinol.*, **25,** 177-195.

9) Reiter, R.J. (1993): The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*, **49,** 654-664.

10) Yamanaka, Y., Suzuki, Y., Todo, T., Honma, K. and Honma, S. (2010): Loss of circadian rhythm and light-induced suppression of pineal melatonin levels in Cry1 and Cry2 double-deficient mice. *Genes Cells*, **15,** 1063-1071.

11) Stefulj, J., Hortner, M., Ghosh, M., Schauenstein, K., Rinner, I., Wolfler, A., Semmler, J. and Liebmann, P.M. (2001): Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *J. Pineal Res.*, **30,** 243-247.

12) Reiter, R.J., Tan, D.X., Qi, W., Manchester, L.C., Karbownik, M. and Calvo, J.R. (2000): Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. *Biol. Signals Recept.*, **9,**

160-171.

13) Vakkuri, O. (1985): Diurnal rhythm of melatonin in human saliva. *Acta Physiol. Scand.,* **124,** 409-412.

14) Kennaway, D.J. and Voultsios, A. (1998): Circadian rhythm of free melatonin in human plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.,* **83,** 1013-1015.

15) Shimozuma, M., Tokuyama, R., Tatehara, S., Umeki, H., Ide, S., Mishima, K., Saito, I. and Satomura, K. (2011): Expression and cellular localizaion of melatonin-synthesizing enzymes in rat and human salivary glands. *Histochem. Cell Biol.,* **135,** 389-396.

16) Yonei, Y., Hattori, A., Tsutsui, K., Okawa, M. and Ishizuka, B. (2010): Effects of Melatonin: Basics Studies and Clinical Applications. *Anti-Aging Medicine,* **7,** 85-91.

17) Dubocovich, M.L. and Markowska, M. (2005): Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine,* **27,** 101-110.

18) Koyama, H., Nakade, O., Takada, Y., Kaku, T. and Lau, K.H. (2002): Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the

RANKL-mediated osteoclast formation and activation. *J. Bone Miner. Res.*, **17,** 1219-1229.

19) Kumasaka, S., Shimozuma, M., Kawamoto, T., Mishima, K., Tokuyama, R., Kamiya, Y., Davaadorj, P., Saito, I. and Satomura, K. (2010): Possible involvement of melatonin in tooth development: expression of melatonin 1a receptor in human and mouse tooth germs. *Histochem. Cell Biol.*, **133,** 577-584.

20) Gunduz, B. and Stetson, M.H. (2003): Maternal transfer of photoperiodic information in Siberian hamsters. vi. effects of time-dependent 1-hr melatonin infusions in the mother on photoperiod-induced testicular development of her offspring. *J. Pineal Res.*, **34,** 217-225.

21) Kasahara, T., Abe, K., Mekada, K., Yoshiki, A. and Kato, T. (2010): Genetic variation of melatonin productivity in laboratory mice under domestication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107,** 6412-6417.

22) Torres-Farfan, C., Valenzuela, F.J., Germain, A.M., Viale, M.L., Campino, C., Torrealba, F., Valenzuela, G.J., Richter, H.G. and

Seron-Ferre, M. (2006): Maternal melatonin stimulates growth and prevents maturation of the capuchin monkey fetal adrenal gland. *J. Pineal Res.,* **41,** 58-66.

23) Itoh, M.T., Hattori, A., Nomura, T., Sumi, Y. and Suzuki, T. (1995): Melatonin and arylalkylamine N-acetyltransferase activity in the silkworm, Bombyx mori. *Mol. Cell. Endocrinol.,* **115,** 59-64.

24) Humphrey, S.P. and Williamson, R.T. (2001): A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J. Prosthet. Dent.,* **85,** 162-169.

25) Cutando, A., Galindo, P., Gomez-Moreno, G., Arana, C., Bolanos, J., Acuna-Castroviejo, D. and Wang, H.L. (2006): Relationship between salivary melatonin and severity of periodontal disease. *J. Periodontol.,* **77,** 1533-1538.

26) Weinert, D., Freyberg, S., Touitou, Y., Djeridane, Y. and Waterhouse, J.M. (2005): The phasing of circadian rhythms in mice kept under normal or short photoperiods. *Physiol. Behav.,* **84,** 791-798.

27) Han, H., Miyoshi, Y., Oyama, T., Konishi, R., Mita, M. and Hamase,

K. (2011): Enantioselective micro-2D-HPLC determination of aspartic acid in the pineal glands of rodents with various melatonin contents. *J. Sep. Sci.,* **34,** 2847-2853.

28) Kennaway, D.J. (2000): Melatonin and development: physiology and pharmacology. *Semin. Perinatol.,* **24,** 258-266.

29) Tamura, H., Nakamura, Y., Terron, M.P., Flores, L.J., Manchester, L.C., Tan, D.X., Sugino, N. and Reiter, R.J. (2008): Melatonin and pregnancy in the human. *Reprod. Toxicol.,* **25,** 291-303.

30) Yellon, S.M. and Longo, L.D. (1988): Effect of maternal pinealectomy and reverse photoperiod on the circadian melatonin rhythm in the sheep and fetus during the last trimester of pregnancy. *Biol. Reprod.,* **39,** 1093-1099.

31) Carrillo-Vico, A., Calvo, J.R., Abreu, P., Lardone, P.J., Garcia-Maurino, S., Reiter, R.J. and Guerrero, J.M. (2004): Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J.,* **18,** 537-539.

32) Gomez-Corvera, A., Cerrillo, I., Molinero, P., Naranjo, M.C.,

Lardone, P.J., Sanchez-Hidalgo, M., Carrascosa-Salmoral, M.P., Medrano-Campillo, P., Guerrero, J.M. and Rubio, A. (2009): Evidence of immune system melatonin production by two pineal melatonin deficient mice, C57BL/6 and Swiss strains. *J. Pineal Res.*, **47,** 15-22.

33) Sanchez-Barcelo, E.J., Cos, S., Fernandez, R. and Mediavilla, M.D. (2003): Melatonin and mammary cancer: a short review. *Endocr. Relat. Cancer,* **10,** 153-159.

34) Jin, Y., Dong, L., Lu, Y., Wu, W., Hao, Q., Zhou, Z., Jiang, J., Zhao, Y. and Zhang, L. (2012): Dimerization and cytoplasmic localization regulate Hippo kinase signaling activity in organ size control. *J. Biol. Chem.*, **287,** 5784-5796.

35) Miyajima, H., Matsumoto, T., Sakai, T., Yamaguchi, S., An, S.H., Abe, M., Wakisaka, S., Lee, K.Y., Egusa, H. and Imazato, S. (2011): Hydrogel-based biomimetic environment for in vitro modulation of branching morphogenesis. *Biomaterials,* **32,** 6754-6763.

図　説　明

図 1　*Aanat* と *Hiomt* の mRNA 発現

（A）マウス唾液腺の発生時期（E13～P12）における *Aanat* の mRNA 発現の変化

（B）マウス唾液腺の発生時期（E13～P12）における *Hiomt* の mRNA 発現の変化

E13 の遺伝子発現量を基準値とし各時期の相対発現量を示す。値は平均値および標準誤差（S.E.M）を示す（n = 3）。

（C）E13 から採取した各組織における *Aanat* の mRNA 発現

（D）E13 から採取した各組織における *Hiomt* の mRNA 発現

唾液腺の遺伝子発現量を基準値とし各臓器の相対発現量を示す。値は平均値および標準誤差（S.E.M）を示す（n = 3）。

図 2　*Mt1* の mRNA 発現とその局在

（A）マウス唾液腺の発生時期（E13～P12）における *Mt1* の mRNA 発現の変化

（B）E13 から採取した各組織における *Mt1* の mRNA 発現

（A）は E13、（B）は唾液腺の遺伝子発現量を基準値とし各時期の相

対発現量を示す。値は平均値および標準誤差（S.E.M）を示す（n = 3）。

（C）E13 の唾液腺を摘出し、12 時間器官培養した後、MT1 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。MT1（緑色蛍光）、E-cadherin（赤色蛍光）、Nuclear（青色蛍光）、Merged（重ね合わせ像）を示す。培養後の唾液腺全体の PCM（位相差顕微鏡像）を上段左に示す。上段は低倍率の唾液腺全体像、下段は高倍率の腺房部分の像を示す。スケールバーは 30 μm を表す。

図 3　メラトニン添加による胎生期唾液腺の分枝形態形成の変化

（A）E12.5 の唾液腺を摘出し、メラトニン添加（1 μM、100 μM）し器官培養した。0 時間、48 時間、60 時間後の位相差顕微鏡像を示す。スケールバーは 100 μm を表す。

（B）上記（A）の位相差顕微鏡像を用いて、分枝数を計数した。値は平均値および標準誤差（S.E.M）を示す（n = 10）。＊:$P < 0.01$ vs control

（C）唾液腺の上皮組織の大きさを評価するために二次元的に上記（A）の位相差顕微鏡像を用いて、唾液腺の上皮組織の面積を計測した。上皮組織は上記（A）の白線で囲んだ部分とした。値は平均値および標準誤差（S.E.M）を示す（n = 10）。＊：$P < 0.05$ 、＊＊：$P < 0.01$ vs

control

図 4　メラトニン添加による胎生期唾液腺の細胞増殖とアポトーシスへの影響

（A）E12.5 の唾液腺を摘出し、メラトニン添加（1 μM、100 μM）し 48 時間器官培養した。その後、唾液腺を回収し、メラトニンの細胞増殖とアポトーシスへの影響を調べるために EdU 法、TUNEL 法により免疫蛍光染色を行った。上段は EdU 陽性細胞（赤色蛍光）、上皮細胞（緑色蛍光）、核（青色蛍光）を示し、下段は TUNEL 陽性細胞（赤色蛍光）、上皮細胞（緑色蛍光）を示す。スケールバーは 100 μm を表す。

（B）上記（A）のコントロール群、メラトニン添加群それぞれの EdU 陽性細胞数を ImageJ ソフトを用いて定量した。値は平均値および標準誤差（S.E.M）を示す（n = 5）。

（C）上記（A）のコントロール群、メラトニン添加群それぞれの TUNEL 陽性細胞数を ImageJ ソフトを用いて定量した（n = 5）。

図 5　メラトニンによる唾液腺分枝抑制の形態学的解析と分子生物学的解析

（A）メラトニンによる分枝形態形成抑制のメカニズム解明のために、メラトニン添加 48 時間後の胎生期唾液腺を透過型電子顕微鏡にて形態学的に観察した。上段はトルイジンブルー染色（TB 染色）を示し、中段は腺房部分、下段は導管部分の透過型電子顕微鏡像を示す。スケールバーは 10 μm を表す。

（B）隣接細胞間の接着している領域を定量するために式に示すように、Perimeter（赤線）あたりの Adhesive length（青線）を Adhesion ratio とし算出した。

（C）上記（A）における腺房部分と導管部分の adhesion ratio を示す。値は平均値および標準誤差（S.E.M）を示す（n = 15）。＊：$P < 0.05$ 、＊＊：$P < 0.01$ vs control

（D）メラトニン添加 48 時間後の胎生期唾液腺の *E-cadherin* の mRNA 発現

値は平均値および標準誤差（S.E.M）を示す（n = 3）。＊＊：$P < 0.01$ vs control

図 6　胎生期唾液腺におけるメラトニンの作用とメカニズム

胎生期唾液腺にはメラトニン受容体が発現しており、メラトニンが作用すると E-cadherin などの接着分子が誘導され細胞接着が亢進する。細胞間接着の亢進により、cleft 形成が抑制され、分枝形態形成が抑制される。

表 1　リアルタイム PCR に用いたプライマー

遺伝子	プライマー
Aanat	5'-GCCCCCAGGACAACACCTGC-3'
	5'-GGCGTCTGGCCACTGAACCC-3'
Hiomt	5'-GCAGCCTCCTGCTCTACCTG-3'
	5'-ACCTGTAGATGGCGGTGAAGG-3'
Mt1	5'-CTACGTGTTCCTGATATGGATGCT-3'
	5'-ACTGGAGTGTTCCGGTTTGC-3'
Gapdh	5'-CCATCACCATCTTCCAGGAG-3'
	5'-GCATGGACTGTGGTCATGAG-3'
E-cadherin	5'-ACGTATCAGGGTCAAGTGCC-3'
	5'-CCTGACCCACACCAAAGTCT-3'

表 2 唾液腺組織、培地上清中のメラトニン濃度

	時期	メラトニン濃度	メラトニン総量
唾液腺組織	成体 (n = 5)	0.06 ± 0.01 (pg/mg)	8.20 ± 1.30 (pg)
	E13.0 (n = 5)	9.94 ± 2.36 (pg/mg)	8.15 ± 1.94 (pg)
培地上清	E13.0 + 48 h (n = 5)	93.00 ± 9.49 (pg/ml)	13.95 ± 1.40 (pg)

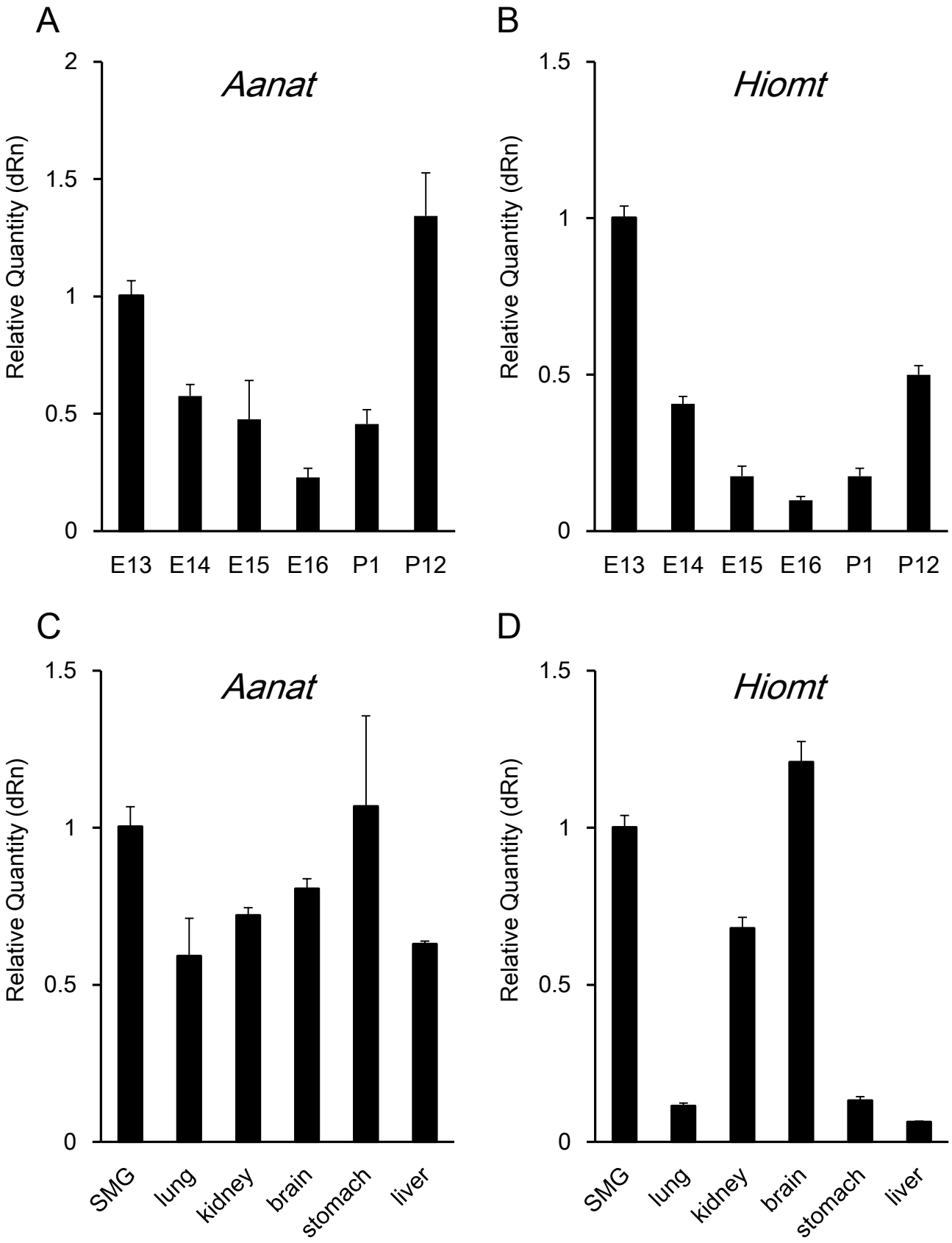
A
Aanat
Relative Quantity (dRn)
2
1.5
1
0.5
0
E13
E14
E15
E16
P1
P12
B
Hiomt
Relative Quantity (dRn)
1.5
1
0.5
0
E13
E14
E15
E16
P1
P12
C
Aanat
Relative Quantity (dRn)
1.5
1
0.5
0
SMG
lung
kidney
brain
stomach
liver
D
Hiomt
Relative Quantity (dRn)
1.5
1
0.5
0
SMG
lung
kidney
brain
stomach
liver

図 1

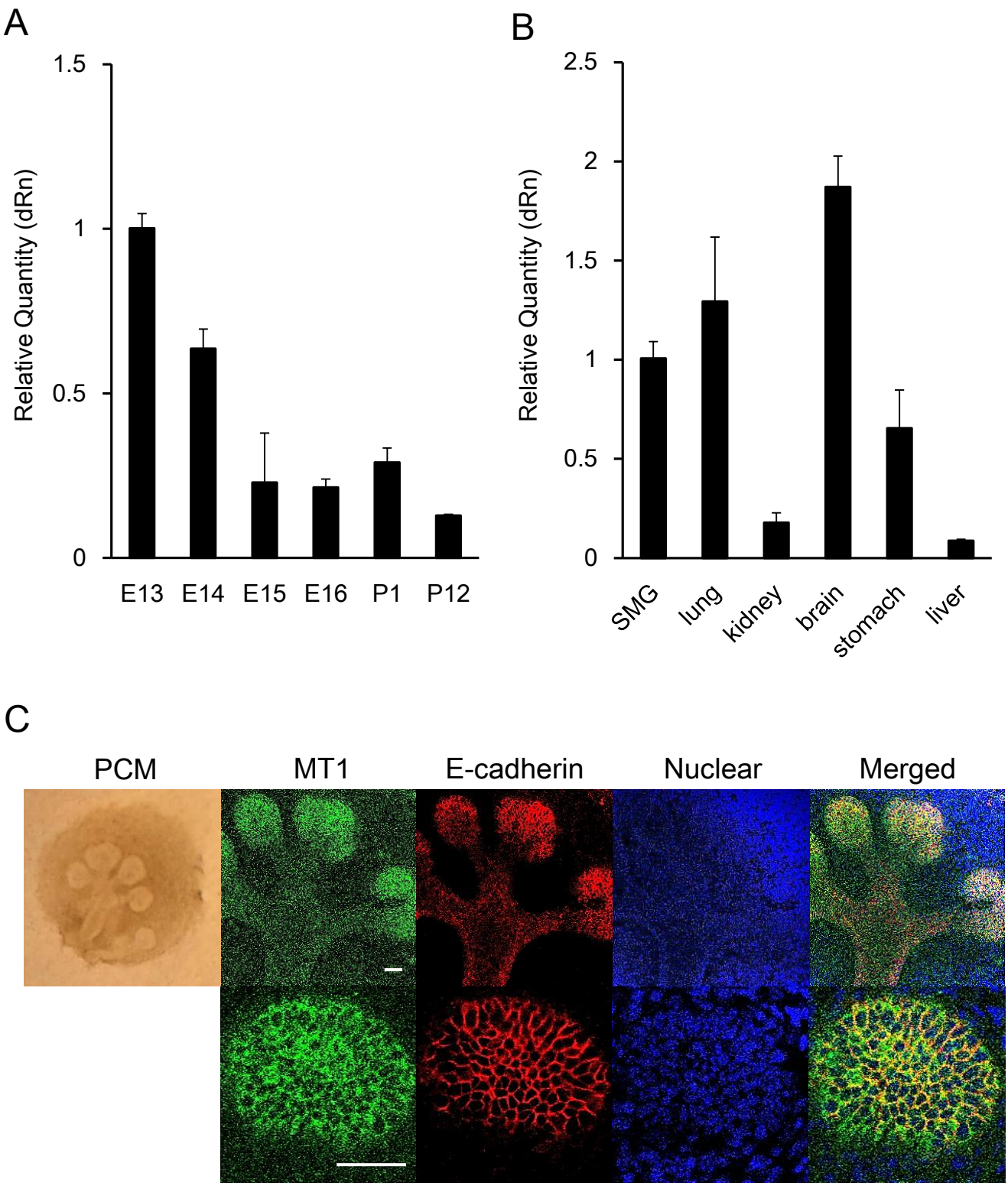
A
1.5
1
0.5
0
Relative Quantity (dRn)
E13
E14
E15
E16
P1
P12
B
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Relative Quantity (dRn)
SMG
lung
kidney
brain
stomach
liver
C
PCM
MT1
E-cadherin
Nuclear
Merged

図 2

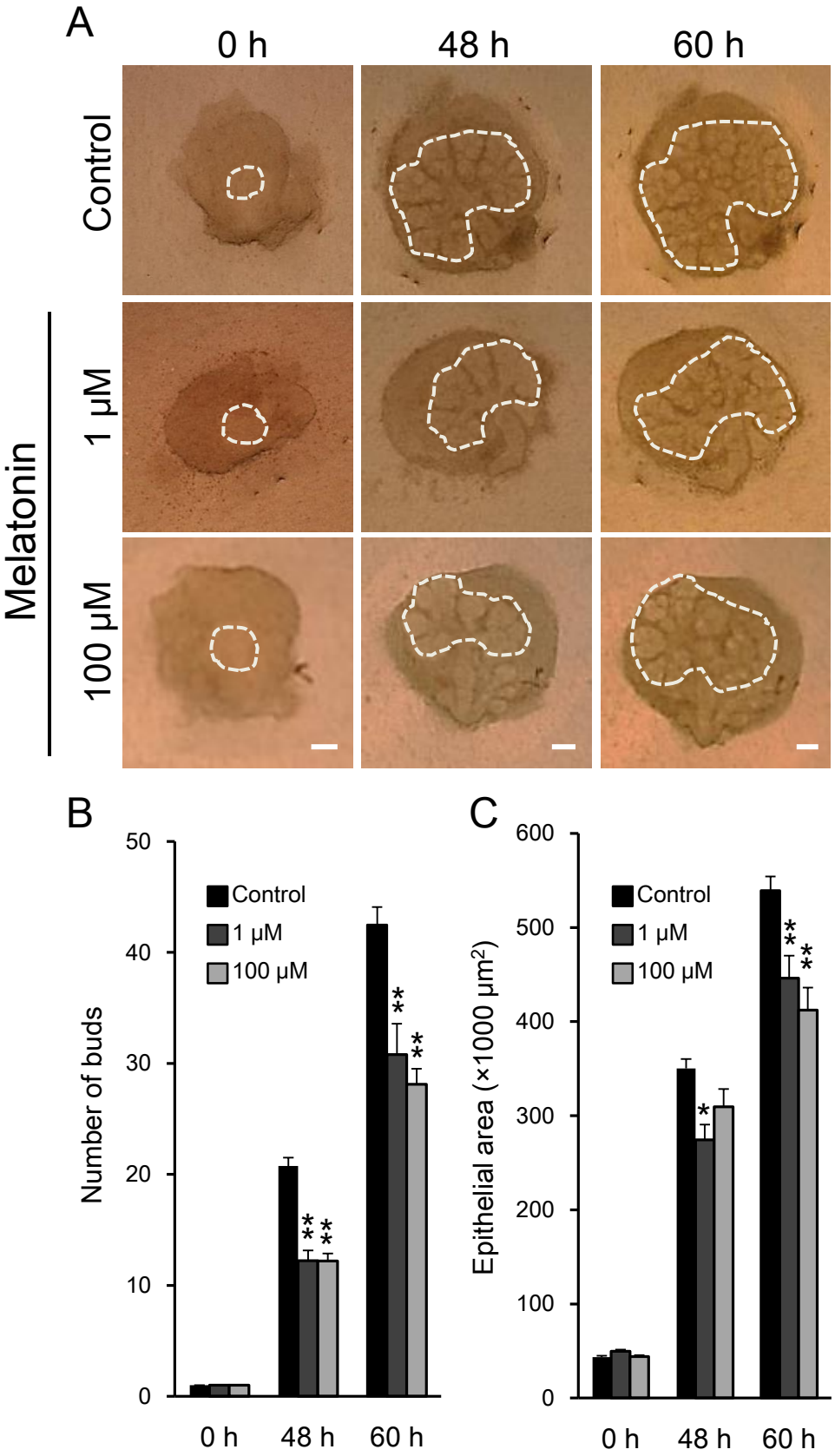
A
0 h
48 h
60 h
Control
Melatonin
1 μM
100 μM
B
Number of buds
Control
1 μM
100 μM
0 h
48 h
60 h
C
Epithelial area (×1000 μm²)
Control
1 μM
100 μM
0 h
48 h
60 h

図 3

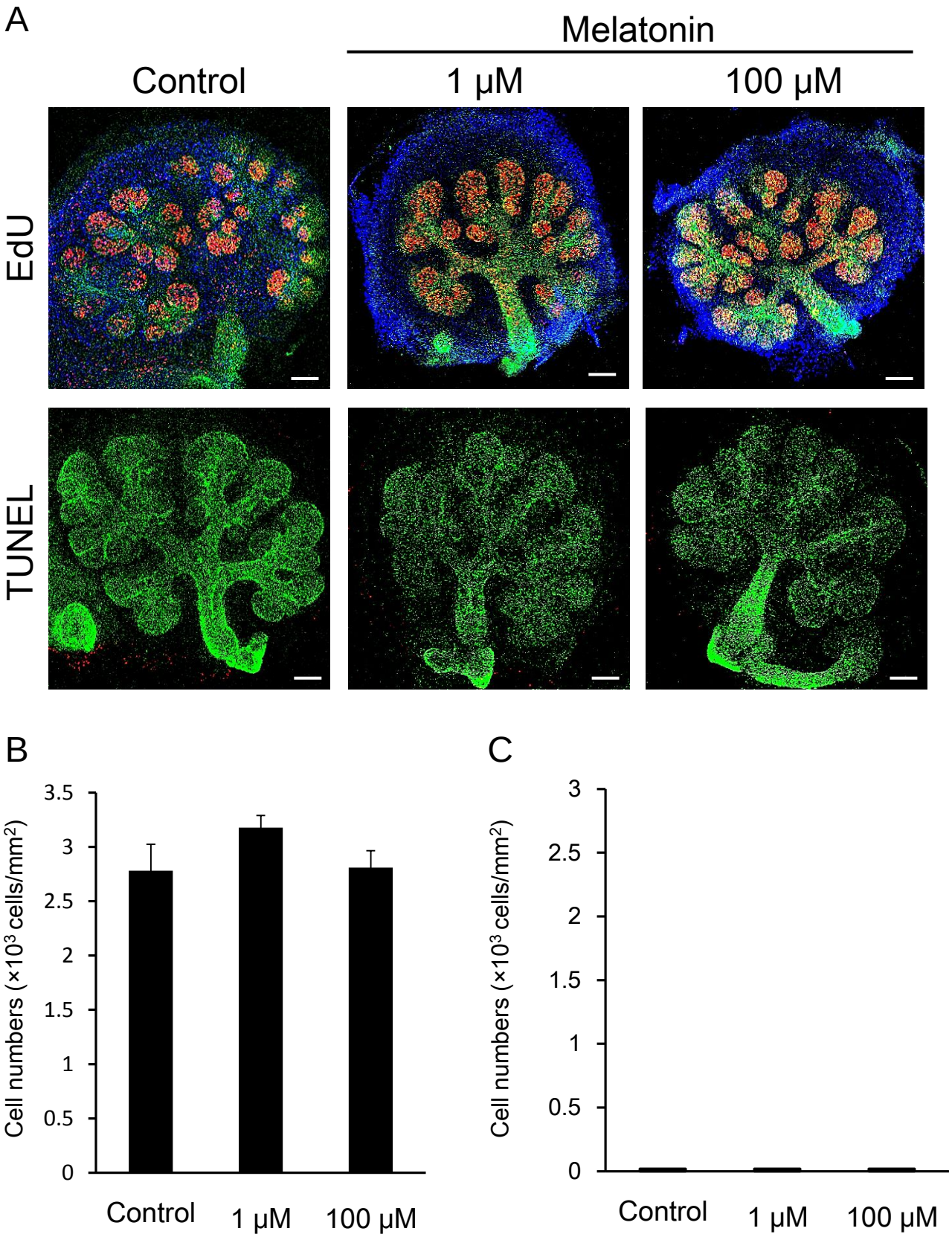
A
Melatonin
Control
1 μM
100 μM
EdU
TUNEL
B
Cell numbers (×10³ cells/mm²)
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Control
1 μM
100 μM
C
Cell numbers (×10³ cells/mm²)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Control
1 μM
100 μM

図 4

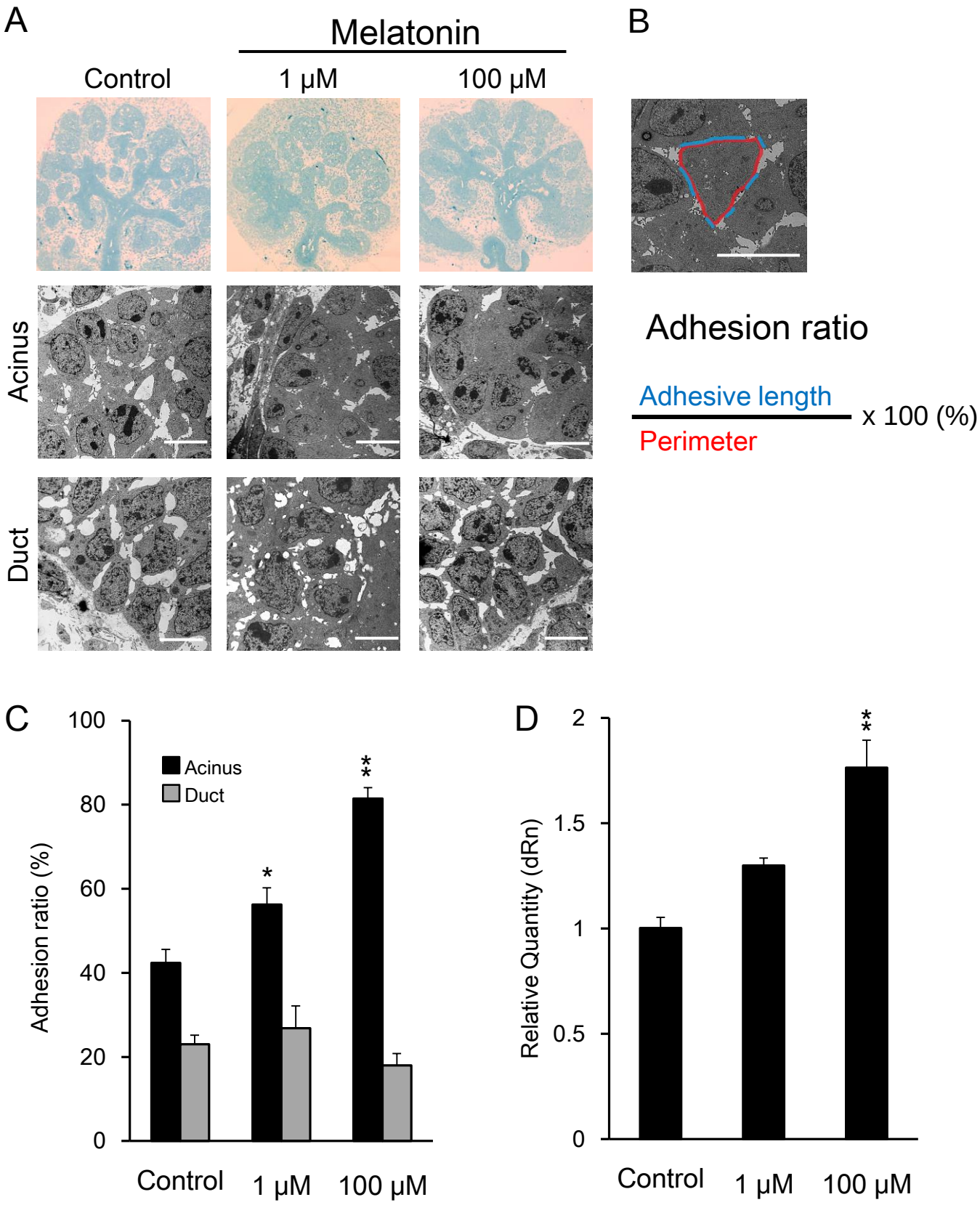
A
Melatonin
Control
1 μM
100 μM
Acinus
Duct
B
Adhesion ratio
Adhesive length
Perimeter
x 100 (%)
C
Acinus
Duct
Adhesion ratio (%)
100
80
60
40
20
0
*
**
Control
1 μM
100 μM
D
Relative Quantity (dRn)
2
1.5
1
0.5
0
**
Control
1 μM
100 μM

図 5

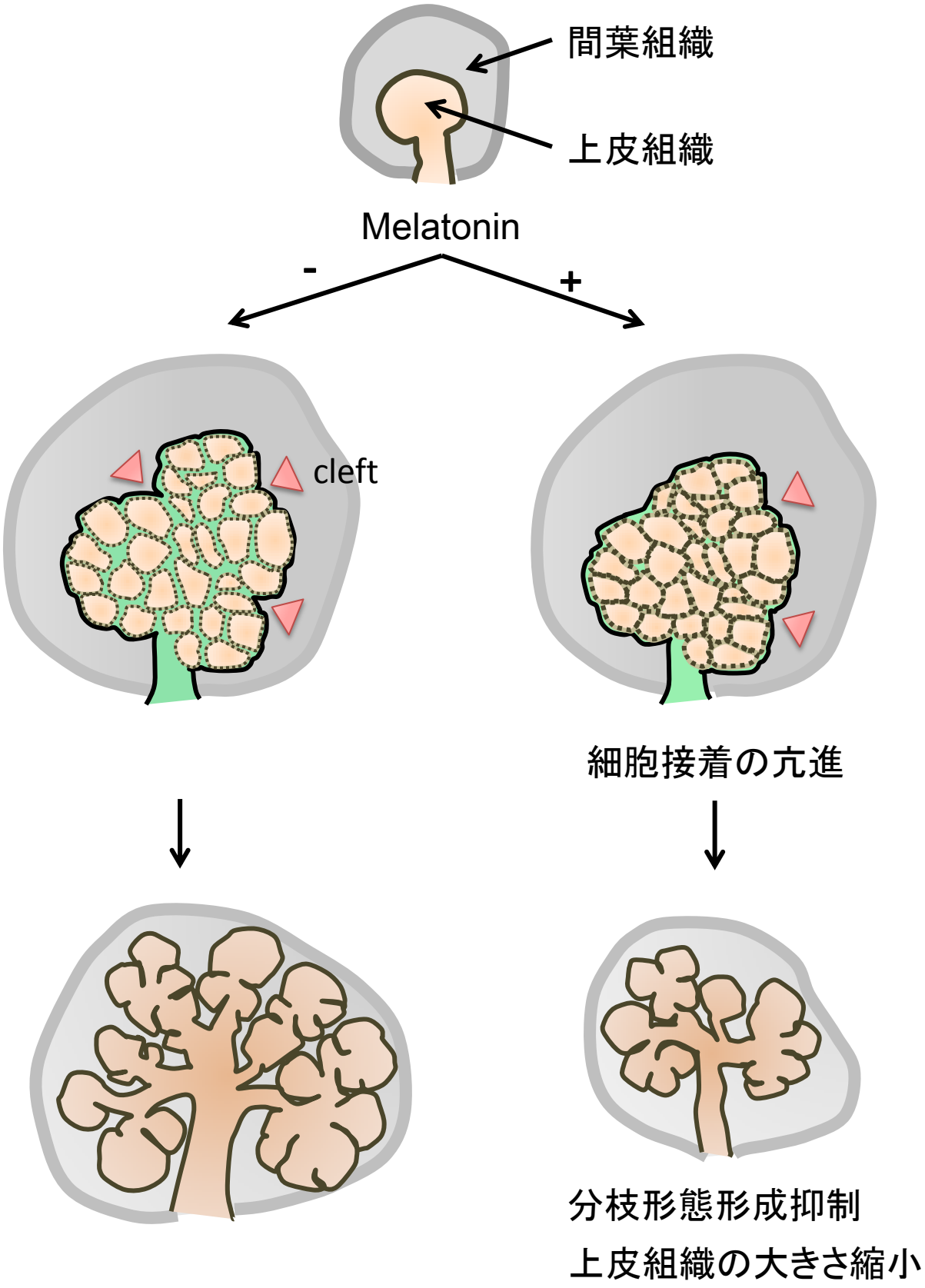

図 6