



Title	唾液腺上皮分岐形態形成および機能的分化におけるWnt/β-カテニンシグナルの役割の解明
Author(s)	栗本, 聖之
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52347
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

学位論文

唾液腺上皮分岐形態形成および機能的分化における Wnt/ β -カテニンシグナルの役割の解明

2014 年

学位申請者 栗本 聖之

大阪大学大学院歯学研究科 統合機能口腔科学専攻
顎口腔病因病態制御学講座 口腔外科学第一教室

主指導教員

大阪大学大学院歯学研究科 統合機能口腔科学専攻
顎口腔病因病態制御学講座 口腔外科学第一教室

古郷 幹彦 教授

目次

I. 略記	1
II. 要旨	2
III. 緒論	4
IV. 材料および方法	7
V. 結果	14
VI. 考察	19
VII. 総括	25
VIII. 謝辞	26
IX. 参考文献	27
X. 図表	31

I . 略記

AQP5 : Aquaporin5

BSA : Bovine Serum Albumin (ウシ血清由来アルブミン)

cDNA : complementary DNA (相補的 DNA)

DMEM : Dulbecco' s Modified Eagle' s Medium

Eda : Ectodysplasin

FGF : Fibroblast Growth Factor (線維芽細胞増殖因子)

GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3 (グリコーゲンシンターゼキナーゼ 3)

KRT : cytokeratin

mRNA : messenger RNA (伝令 RNA)

MUC10 : Mucin 10 (遺伝子名 Pro11; proline rich, lacrimal 1)

PBS : Phosphate Buffered Saline (リン酸緩衝生理食塩水)

PCP : Planar Cell Polarity (平面内細胞極性)

PCR : Polymerase Chain Reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)

PSP : Parotid Secretory Protein

(遺伝子名 Bpifa2; BPI fold containing family A, member 2)

QOL : Quality of Life

II. 要旨

代表的な外分泌腺の一つである唾液腺は胎生期において、上皮組織が活発に分岐と伸長を繰り返すことで分岐管腔構造を形成するとともに、腺房および導管上皮へと機能的に分化することで唾液の分泌能を獲得する。このような形態形成と機能的分化は、発生過程において時空間的に協調して進行するが、その制御機構の詳細は不明である。一方で、Wnt は分子量約 4 万の分泌性糖タンパク質で、細胞膜上の受容体に結合することで細胞内シグナル伝達経路を活性化し、初期発生や器官形成、出生後の細胞の増殖・分化・運動など多彩な細胞機能を制御する。しかし、唾液腺上皮の発生における Wnt シグナルの生理的意義は明らかにされていない。そこで本研究では、マウス胎仔唾液腺原基を用いて、唾液腺上皮の分岐をともなう形態形成と腺房および導管への機能的分化における Wnt シグナルの役割について明らかにすることを目的に研究を行った。

Wnt シグナル阻害剤である IWP2 存在下で原基培養を行った結果、唾液腺上皮のサイズと end bud 数が減少した。Wnt/ β -カテニンシグナルの特異的標的遺伝子である *Axin2* の唾液腺原基における発現部位をリアルタイム PCR 法で検討した結果、間質と導管部上皮において強く発現していた。IWP2 もしくは β -カテニン経路を活性化する CHIR 存在下で上皮単独培養を行った結果、IWP2 で導管部上

皮の長さと太さが減少し、CHIR で長さと太さが有意に増加した。また、導管部上皮前駆細胞マーカーである *Krt5* および *Krt14* の発現をリアルタイム PCR 法で検討した結果、IWP2 で発現が抑制され、CHIR で発現が上昇した。

さらに、IWP2 もしくは CHIR 存在下で原基培養を行った結果より、 β -カテニン経路は導管上皮に加えて腺房上皮にも作用しており、IWP2 で腺房上皮の分化・成熟が早期に亢進し、CHIR で腺房上皮の分化・成熟が抑制された。FGF1 に加えて腺房上皮の分化を誘導する FGF7 を添加し上皮単独培養を行った結果、FGF1 単独が培養 3 日目まで終末部導管分岐形成が維持されるのに対し、FGF7 添加群は腺房分化が起こる培養 2 日目以降、終末部導管の分岐は増加しなかった。

以上の結果から、唾液腺の発生において Wnt/ β -カテニンシグナルは、導管部で強く活性化することで唾液腺上皮前駆細胞の増殖を介して導管形成・伸長を促進している一方、終末 end bud 部では腺房上皮の分化・成熟の時期を抑制的に調節することで分岐形成を制御していると考えられた。本研究により Wnt シグナルが形態形成と機能的分化の両過程を協調的に制御する新規の機構が明らかになった。

III. 緒論

唾液腺は唾液の分泌を主な機能とする主要な外分泌腺の一つであり、唾液の分泌を介して潤滑作用や消化作用、抗菌作用など口腔内の恒常性を保つための重要な機能を担っている（1-3）。しかし、加齢による唾液腺の萎縮によって、あるいは頭頸部腫瘍に対する放射線照射やシェーグレン症候群などによって唾液腺が障害を受けると唾液分泌量が低下し、口腔乾燥症を引き起こす（4, 5, 6）。口腔乾燥症は齲歯リスクを高め、口臭を引き起こすだけでなく、摂食・嚥下機能の低下や誤嚥性肺炎のリスクを高め、全身的な Quality of Life (QOL) の低下を引き起こす（7, 8）。しかしながら、現状では萎縮または組織傷害が進行した唾液腺の再生や機能回復は困難であり、これまで口腔乾燥症患者に対しては人工唾液のスプレー噴霧や保湿ジェルの使用、含嗽などの対症療法が広く行われてきた（9）。また、近年では塩酸セビメリソナやピロカルピニン塩酸塩などのムスカリ受容体作動薬による薬物治療も行われるようになっている（10）が、高度に障害を受けた唾液腺に対する治療効果は十分ではない（11）。

唾液腺は、涙腺や乳腺などの他の外分泌腺と同様、その発生過程において原基中の上皮が分岐と伸長を繰り返して房状の構造を形成（分岐形態形成）する（12-14）。また分岐形態形成と並行して、唾液腺上皮は分泌を主な機能とする腺

房細胞と分泌物輸送を行う導管細胞へと機能的に分化する(13, 15, 16)。しかし分岐と伸長を繰り返して器官の表面積を拡大しながら、同時に機能分化によって臓器特異的な組織構造を協調的に形成していくメカニズムの詳細は明らかになっていない。また、皮膚や軟骨などと同様に、唾液腺においても遺伝子治療や細胞治療、組織移植の応用といった再生医療が期待されているが、その組織構造の複雑さから、実用されるには至っていない。

一方、Wnt は種を越えて保存されている分子量約4万の分泌型糖タンパク質で、初期発生における体軸の決定や原腸陷入、器官形成を制御する(17, 18)。Wnt がその受容体に結合すると、 β -カテニン経路と β -カテニン非依存性経路 (PCP 経路と Ca^{2+} 経路) と呼ばれる細胞内シグナル伝達経路が活性化される(17)。 β -カテニン経路は β -カテニンの細胞内レベルを調節することで遺伝子発現を介した細胞増殖や分化を制御し、 β -カテニン非依存性経路は Rac や Rho の活性化を介して細胞骨格や極性決定に関与する。 β -カテニン経路はアフリカツメガエル胚の発生過程における体軸決定に重要であることが知られているほか、ヒト大腸がんでの異常活性化と発がんとの関与が知られている(19, 20)。一方、ノックアウトマウスを用いた解析から、 β -カテニン非依存性経路は胎生期の顔面・四肢形成に重要であることが知られている(21)。

唾液腺の発生における Wnt シグナルの関与については、これまでに以下の報

告がある。胎生期唾液腺間質において強く活性化している Wnt/ β -カテニン経路は ectodysplasin (Eda) の発現を介して分岐形成とサイズを制御する (22)。一方、通常は end bud 部で FGF シグナル依存的に抑制されている β -カテニン経路を強制的に活性化させると、分岐形成が抑制されることが明らかになっている (23)。すなわち唾液腺の分岐形態形成においては β -カテニン経路の活性が適切に調節することが重要であると考えられる。また成体の唾液腺組織においては導管結紮による唾液腺の傷害により β -カテニン経路が導管部で活性化され、上皮幹細胞や前駆細胞の維持・増殖に影響を与える可能性が示唆されているが、胎生期の発生過程における Wnt シグナルの役割との関係は不明である (24)。

以上より、唾液腺の発生において Wnt シグナルが分岐形態形成を制御する可能性が示唆されているが、その制御機構については未だ判然としない。また唾液腺の腺房および導管への機能的な組織分化の過程に Wnt シグナルが関与するか否かについては全く明らかになっていない。

そこで唾液腺の発生・組織構築過程での分岐形態形成と機能的な組織分化における Wnt シグナルの役割を明らかにすることを目的として研究を行った。

IV. 実験材料および方法

1. 唾液腺原基器官培養

本研究で使用するマウス胎仔の唾液腺原基は妊娠 13 日目の ICR マウスより摘出した。ICR 妊娠マウスは日本 SLC 社 (Shizuoka, Japan)、および日本クレア社 (Tokyo, Japan) から購入した。本研究の動物実験に使用した全てのプロトコールは大阪大学動物実験委員会により承認されている (No. 21-048-1)。妊娠マウスを炭酸ガス法により安楽死させたうえで速やかに子宮を摘出し、氷冷した Hank's 平衡塩溶液 (Life technologies, New York, NY, USA) 中で十分に洗浄して血液を洗い流した。子宮から胎仔を摘出し、マイクロピンセットで羊膜を除去し頸部で切離した。実体顕微鏡 SZX10 (OLYMPUS, Tokyo, JAPAN) 下でマイクロピンセットを使用し、口裂部で水平断して舌根部と下顎骨間にある唾液腺原基を摘出した。摘出した唾液腺原基を Tissue Culture Inserts, 12 well Poresize 1.0 μm (Greiner bio-one, Berlin, Germany) ポアフィルター上に置き、12 穴プレート (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) の各ウェルにセットした。各ウェルには培地 1 ml を入れた。培地はペニシリン、ストレプトマイシン含有 DMEM/F12 培地に L(+)アスコルビン酸 (Nacalai Tesque INC, Kyoto, Japan) 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、トランスフェリン (Life Technologies) 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を添加し、

37°C、湿度 100%、二酸化炭素 5%気相下で培養した。培地は 1 日おきに全量交換した。

2. 唾液腺上皮単独器官培養

上皮単独培養法では原基培養と同様に胎生 13 日目のマウス胎仔より摘出した唾液腺原基を、10 U/ml Dispase® II (Roche, Mannheim, Germany) 50 µl と Hank's 平衡塩溶液 300 µl を混和したもので 37°C、20 分間処理し、100 mg/ml BSA 添加 DMEM/F12 培地上で鋭利なタンゲステン針を使用して、間質および舌下腺原基を除去し、顎下腺上皮を分離した。氷冷した Matrigel® Matrix Growth Factor Reduced (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 30 µl を 24 穴プレート (Corning, New York, NY, USA) の各ウェルに滴状に置き、その中に分離した顎下腺上皮を埋入し 37°C で 20 分間静置し、マトリゲルを硬化させたのち、各ウェルに培地を 500 µl 入れて三次元培養を行った。培地はペニシリン、ストレプトマイシン含有 DMEM/F12 培地に 1 mg/ml BSA (fatty acid free) および 1 × Insulin Transferrin Selenium (Life technologies) を添加し、実験目的に応じた Fibroblast Growth Factor (FGF) 1、または FGF7 を添加し、37°C、湿度 100%、二酸化炭素 5%気相下で培養した。培地は 1 日おきに全量交換した。

唾液腺の上皮単独培養法についてはこれまでにいくつかの報告があるが、以下に本研究で新たに確立した上皮単独培養系について示す。

- ・導管誘導培地 : 100 ng/ml FGF1 (Peprotech, Rocky hill, NJ, USA)
- ・腺房誘導培地 : 80 ng/ml FGF7 (Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- ・導管 + 腺房誘導培地 : 100 ng/ml FGF1 + 20 ng/ml FGF7

3. 試薬および抗体

Wnt 分泌阻害剤 IWP2 (Wako, Osaka, Japan)、および GSK3 阻害剤 CHIR99021 (以下 CHIR) (Tocris, Bristol, UK) はそれぞれ販売品を購入した。

以下に示す特異的一次抗体を使用し、免疫組織化学染色を行った。

Mouse Anti-Cytokeratin7 (KRT7) (Abcam, Cambridge, UK) IF 1:100

Rat Anti-Cytokeratin19 (KRT19) (DSHB, Iowa city, Iowa, USA) IF 1:100

Rabbit Anti-Cytokeratin5 (KRT5) (covance, Emeryville, CA, USA) IF 1:100

Rabbit Anti-Aquaporin5 (AQP5) (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) IF 1:100

Goat Anti-PSP (Everest Biotech, Oxfordshire, UK) IF 1:100

Mouse Anti-Ki67 (CST, Danvers, MA, USA) IF 1:200

をそれぞれ使用した。

核染色には DRAQ5™ (Biostatus, Shepshed, UK) を使用した。

また、二次抗体には一次抗体の動物種に対応したものを以下より選択して使用した。

Alexa Fluor®488/546 Goat Anti-mouse/rabbit/rat IgG (H+L) Antibody (Life

technologies) IF 1:500

Alexa Fluor[®]488 Donkey Anti-goat IgG(H+L) Antibody (Life technologies) IF 1:500

Alexa Fluor[®]546 Donkey Anti-mouse/rabbit IgG(H+L) Antibody (Life technologies) IF 1:500

Alexa Fluor[®]647 Donkey Anti-mouse/rat IgG(H+L) Antibody (Life technologies) IF 1:500

4. 免疫組織化学染色

原基培養後の器官を PBS で洗浄し、氷冷した 100%メタノール液で-20°Cで 10 分間固定した。固定後、PBS で洗浄し、浸透化・ブロッキング液 (4% BSA, 0.5% Triton X, 0.04% NaN₃ in PBS) に 30 分間浸漬し、浸透化およびブロッキングした。上皮単独培養後の器官については、氷冷した Cell recovery solution (BD Biosciences) 1 ml で 30 分間氷上振とうしてマトリゲルを融解させ、上皮をマトリゲルより取り出し、PBS で洗浄した後、氷冷した 100%メタノール液で-20°C で 10 分間固定した。固定後、PBS で洗浄し、浸透化・ブロッキング液に 30 分間 浸漬し、浸透化およびブロッキングした。浸透化・ブロッキング液で希釈した 一次抗体を室温で 2 時間反応させた。PBS で洗浄後、浸透化・ブロッキング液で 希釈した二次抗体を室温で 1 時間、暗所で反応させた。必要に応じて DRAQ5TM を

PBS で 1000 倍に希釈し、室温、暗所で 10 分間反応させ核染色を行った。染色後、PBS で 50%に希釈したグリセロール溶液を使用して封入した。

免疫組織化学染色後の標本観察にはレーザー共焦点顕微鏡 LSM510 (Carl Zeiss, Jena, Germany) および、蛍光顕微鏡 BZ-9000 (Keyence, Osaka, Japan) を使用した。

5. リアルタイム PCR 法による mRNA の発現解析

mRNA の回収は NucleoSpin® RNA II (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Germany) キットを使用し、MACHEREY-NAGEL 社のユーザーマニュアルに従い行った。

回収した RNA は 12 μ l の RNase-Free H₂O で溶解し、そのうち 10.25 μ l を鑄型として、逆転写 PCR により cDNA を合成した。逆転写 PCR に使用した反応液は、40 U/ μ l Ribonuclease Inhibitor (Takara Bio, Shiga, Japan) を 0.5 μ l、M-MLV (Wako) を 0.25 μ l、10×PCR buffer II contains MgCl₂ (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) を 2 μ l、25 mM MgCl₂ solution (Applied Biosystems) を 4 μ l、100 mM dNTP set solutions (25 mM each dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (GE life science, Little Chalfont Bucks, UK) を 2 μ l、80 nmol random primer (Takara Bio) を 1 μ l 混和し、鑄型 RNA と合わせて 20 μ l とした。反応は 42°C で 1 時間インキュベートし、その後 95°C で 5 分間加熱して酵素を失活させ、直

ちに氷冷した。合成された cDNA は Tris-EDTA (TE) buffer 30 μ l で希釈して mRNA の解析に使用した。

リアルタイム PCR の反応試薬には Fast SYBR[®] Green Master Mix (Applied Biosystems) を使用した。また、プライマーは Forward/Reverse ともに 0.67 μ M にて使用し mRNA 定量を行った。使用したプライマー配列は以下の通りである。

• Mouse β -actin:

5' -AGATGTGGATCAGCAAGCAG-3' / 5' -GCGCAAGTTAGGTTTGTC-3'

• Mouse *Axin2*:

5' -CTGGCTCCAGAAGATCACAAAG-3' / 5' -CATCCTCCCAGATCTCCTCAA-3'

• Mouse *Cytokeratin5*:

5' -GGAGCTGGCTCTCAAAGATG-3' / 5' -TGACTGGTCCAACTCCTCC-3'

• Mouse *Cytokeratin14*:

5' -GCCAACACTGAACGGAGGT-3' / 5' -TCAAACTTGGTCCCGGAAGTC-3'

• Mouse *Psp*:

5' -GCTGTCCCTCAGAACCTGAA-3' / 5' -GCCGTTGGAAGACAGCTTAG-3'

• Mouse *Mucin10*:

5' -GATGTGCCCTCCAGGAACTA-3' / 5' -GTGCTGGTGTGATTGCATTT-3'

• Mouse *Aquaporin5*:

5' -GGAAGAAGACCATCGAGCTG-3' /5' -ACACCCAAGTGTCCCATCAT-3'

Applied Biosystems[®] Step One[™] (Applied Biosystems) システムを使用し、

反応条件は、熱変性は 95°C、20 秒で 1 サイクル、それ以降は 95°C、3 秒間行つた。アニーリング・伸長時間は 60°C、30 秒間で、これらを 50 サイクル行い増幅した。

内部補正として β -actin を使用し、結果は control に対する比 (fold change) で表示した。

V. 結果

1. 唾液腺発生における Wnt シグナルの機能抑制による表現型の検討

唾液腺の分岐形態形成に Wnt シグナルが必要かどうかを調べるために、Wnt 分泌阻害剤である IWP2 (25) を終濃度 10 μM で添加し、原基培養を行った。その結果、培養 4 日目において対照群 (control) に比べて IWP2 で上皮の大きさが減少した (n=3) (図 1 A, B)。さらに組織構造を詳細に評価するため腺房細胞の指標として AQP5、および導管細胞の指標として KRT7 の免疫組織化学染色を行った。AQP5 陽性の end bud 数を計測 (n=3) すると、control で 181.3 個であったのに対して IWP2 では 113.3 個と減少していた (図 1 C, D)。終末部を拡大して観察したところ、control では導管が細かく分岐し、その各導管の先端に end bud (腺房) が形成されているのに対し、IWP2 では終末部での導管の分岐が抑制されており、腺房の数が減少していた (図 1 E, F)。これらの結果から、唾液腺の分岐形態形成に Wnt シグナルが必要であることが明らかとなった。

2. 唾液腺の分岐形態形成に必要な Wnt シグナル経路の同定

複数ある Wnt シグナル経路の中で、唾液腺の分岐形態形成に関与する経路を明らかにするために、すでに研究室で所有していた β -カテニン非依存性経路の

代表的リガンドである Wnt5a のノックアウトマウス（図 2A）から胎生 13 日目に唾液腺原基を摘出し培養を行った。その結果、野生型マウスと Wnt5a ノックアウトマウスとの間に形態学的な差を認めなかった（図 2B, C, D）。この結果から Wnt5a シグナルは *in vitro* での唾液腺の分岐形態形成に関与しないことが示唆された。

そこで β -カテニン経路に着目し、唾液腺原基における β -カテニン経路の活性化部位を明らかにする目的で、その特異的標的遺伝子である *Axin2* の mRNA 発現をリアルタイム PCR 法で検討した。胎生 13 日目の唾液腺原基の間質と上皮を分離して比較したところ、間質でより高い発現を認めた（図 2E）。また上皮において終末の end bud 部と導管部を分離して比較すると、導管部でより高い発現を認めた（図 2F）。これらの結果から、唾液腺分岐形態形成には間質または導管部上皮における β -カテニン経路の活性化が関与する可能性が示唆された。

3. 唾液腺導管部上皮における β -カテニン経路の役割

間質の影響を排除した導管部上皮における β -カテニン経路の役割を調べるため、主として導管上皮の伸長・分岐を誘導する増殖因子として FGF1 を添加した導管誘導培地に IWP2 を終濃度 10 μ M で、GSK3 阻害剤 CHIR99021（以下 CHIR）（26）を終濃度 1 μ M で添加して上皮単独培養を行った。その結果、control に

対して IWP2 で導管の長さおよび太さが有意に減少し、CHIR で導管部上皮の長さ及び太さが有意に増加した（図 3 A, B）。この結果から β -カテニン経路は唾液腺導管部上皮の伸長を促進的に制御することが示唆された。

唾液腺上皮導管部に存在する KRT5 または KRT14 (KRT5/KRT14) 陽性細胞は多分化能を持った上皮前駆細胞であり、それらの前駆細胞は唾液腺の分岐形態形成に必要であることが報告されている（27, 28, 29）。そこでリアルタイム PCR 法により *Krt5* および *Krt14* の mRNA 発現を比較すると、control に比べて IWP2 で *Krt5* および *Krt14* の発現が抑制され、CHIR で発現が上昇した（図 3 C）。また、免疫組織化学染色により導管上皮基底層に局在する KRT5 陽性細胞の分布を検討したところ、IWP2 で KRT5 陽性細胞が減少した（図 3 D）。CHIR では control と比べて KRT5 陽性細胞数の増加は認められなかったが、細胞増殖マーカーである Ki67 との共染色により、CHIR で KRT5 および Ki67 二重陽性の増殖上皮前駆細胞が増加していた（図 3 E）。これらの結果から、 β -カテニン経路は唾液腺上皮前駆細胞の数と増殖を促進的に制御することにより導管部上皮の伸長を制御することが示唆された。

4. β -カテニン経路が腺房上皮の形成と機能的分化に与える影響についての解析

腺房上皮における β -カテニン経路の役割を明らかにするために CHIR 1 μM を添加し、原基培養を行った。培養 4 日目で AQP5 および KRT7 の発現を免疫組織化学染色で検討した結果、CHIR で AQP5 陽性の腺房上皮が終末部のみに限局して認められ、control に比べて腺房形成が抑制されていた（図 4 A）。そこでリアルタイム PCR 法により前期腺房分化マーカーである *Aqp5*、後期腺房分化マーカーである *Psp*、*Muc10* (15) の mRNA 発現を調べたところ、control と比較して CHIR でそれらの発現が抑制された。特に *Psp*、*Muc10* の発現が著しく抑制された（図 4 B）。

Axin2 の mRNA 発現から、導管部上皮と比べて腺房上皮での β -カテニン経路の活性化は低く抑制されている（図 2 F）。そこで腺房上皮における β -カテニン経路の生理的意義を明らかにするために、IWP2 10 μM を添加して原基培養を行った。継時的に後期腺房分化マーカーである *Psp* および *Muc10* の mRNA 発現を検討したところ、IWP2 で *Psp* および *Muc10* の発現が control に比べてより早期に上昇した（図 4 C）。培養 3 日目の腺房において、免疫組織化学染色でも PSP の発現を検討した。その結果、control では PSP の発現が腺房のごく一部に認められるのに対して、IWP2 では大部分の腺房で PSP が発現していた（図 4 D）。以上の結果から、腺房上皮における β -カテニン経路の過剰な活性化は腺房形成と、その分化・成熟を抑制するのに対して、 β -カテニン経路の抑制は腺房上皮の分

化・成熟を早期に促進することが示唆された。

5. 腺房上皮の分化・成熟が終末分岐形成に与える影響についての検討

唾液腺は終末部腺房上皮にクレフトと呼ばれる裂け目が形成されることで分岐する（14）。腺房上皮の分化・成熟が終末分岐形成に与える影響を検討するため、腺房上皮の分化・成熟を誘導する増殖因子として FGF7 を添加した導管・腺房誘導培地（FGF1+FGF7）と導管誘導培地（FGF1）とで上皮単独培養を行い、継続的に終末部につながる導管分岐数を計測した。FGF1 のみでは腺房分化が進行せず、培養 3 日目まで継続的に導管分岐数は増加したが、FGF1+FGF7 では培養 2 日目から腺房の分化・成熟にともなった終末部上皮の多房化を認めるとともに、新たな導管分岐の形成が抑制された（図 5 A, B）。この結果から、腺房の分化・成熟が終末分岐形成を抑制することが示唆された。

VI. 考察

唾液腺の発生にともなう組織構築過程において、分岐形態形成と腺房および導管上皮への機能的分化は時空間的に協調して進行していくが（12）、その制御メカニズムは明らかにされていなかった。今回、Wnt/β-カテニン経路が導管部および腺房部上皮において独立した役割を有しており、唾液腺の分岐形態形成と機能的分化の両過程を制御する可能性が示唆された。

Wnt シグナル経路は多くの上皮管腔臓器の形成または維持に関与することが報告されている（30, 31）。唾液腺の発生においては、Wnt/β-カテニン経路の抑制（22）、または活性化（23）がともに唾液腺の分岐形態形成を抑制することが報告されているが、その生理的な意義については判然としていなかった。今回、Wnt リガンドの分泌を抑制する阻害剤である IWP2 を唾液腺原基に作用させることで終末部分岐形成の抑制と器官サイズの減少が認められたことから、内在的な Wnt シグナルが唾液腺の発生過程に必要であることが明らかになった。

一方で、β-カテニン非依存性経路と唾液腺の発生との関わりは全く報告されていない。β-カテニン非依存性経路を活性化させる代表的な Wnt リガンドとして Wnt5a が知られている（32）。ノックアウトマウスを用いた解析から、Wnt5a の欠失は体幹・四肢の形成に加えて顎顔面部の形成も強く抑制され、出生直前

に胎生致死となる (21)。しかしながら今回、胎生 13 日で Wnt5a ノックアウトマウスの胎仔から唾液腺原基を摘出し培養したところ、分岐の形成およびサイズに野生型と比べて明らかな差異は認められなかった。この結果から、少なくとも Wnt5a は唾液腺の分岐形態形成に積極的に関与しないと考えられるが、 β -カテニン非依存性経路を活性化させる Wnt5b や Wnt11 等の他のリガンド (33) が唾液腺の発生に関わっている可能性は否定出来なかった。

そこで唾液腺の発生過程における β -カテニン経路の関与を明らかにするために、胎生 13 日目の唾液腺原基における β -カテニン経路の活性化部位をリアルタイム PCR 法で検討したところ、 β -カテニン経路は間質と上皮の導管部において活性化していた。この結果は Patel らによって β -カテニン経路のレポーターマウスを用いて報告された結果と一致していた (23)。しかし導管部上皮において β -カテニン経路が活性化する意義については明らかでなかった。

そこで導管部上皮における内在的な β -カテニン経路の役割について検討するため、増殖因子として FGF1 を添加する導管誘導培地を用いて上皮単独培養を行った。この培養系では上皮の大部分が導管上皮からなる構造を形成するため、導管部上皮の伸長・分岐を評価するのに適した実験系であると考えられる。導管誘導培地を用いた上皮単独培養に対して IWP2 および CHIR99021 を添加し、それぞれ β -カテニン経路の機能抑制と活性化を行った結果、培養 4 日目で導管の

長さおよび太さが IWP2 で有意に減少し、CHIR で有意に増加した。導管の長さや end bud 数は、Morphogenic Index と呼ばれる、上皮の形態形成の程度を定量的に評価する指標としてしばしば用いられる (34, 35)。以上より、導管部で活性化している β -カテニン経路は唾液腺上皮導管部の伸長を促進的に制御することが明らかになった。

上皮の形態形成には上皮前駆細胞の維持や増殖が重要であることは広く知られている (36)。Lombaert や Knox らは、唾液腺導管部に KRT5 または KRT14 陽性の多分化能を有する上皮前駆細胞が局在し、唾液腺の形態形成に重要であることを明らかにした (27, 34)。一方で、Wnt/ β -カテニン経路は毛包や腸管、血球系といった組織幹・前駆細胞の維持・増殖を促進的に制御することが知られているものの (37)、唾液腺上皮前駆細胞との関わりは明らかでなかった。導管誘導培地を用いた上皮単独培養において、IWP2 で *Krt5* および *Krt14* の mRNA 発現は低下し、CHIR でそれらが増加した。また免疫組織化学染色の結果、IWP2 で導管部基底層に局在する KRT5 陽性細胞数が減少した。一方、CHIR では基底層に存在する KRT5 陽性細胞中の Ki67 の陽性細胞数が増加していた。すなわち、 β -カテニン経路は唾液腺上皮前駆細胞の数と増殖を促進的に制御することが明らかになった。

以上の結果より、 β -カテニン経路は唾液腺上皮導管部で活性化し、導管部に

局在する唾液腺上皮前駆細胞の増殖制御を介して導管の伸長を制御することが示唆された。

間質内での原基培養においても、上皮単独培養と同様に CHIR による β -カテニン経路の活性化で KRT7 陽性の導管の伸長が促進されたが、興味深いことに、腺房部に着目すると、CHIR は AQP5 陽性の腺房上皮形成と、*Psp*、*Muc10* の発現を指標とした腺房上皮の分化・成熟を抑制した。腺房へと分化する end bud 領域は導管上皮と比較して β -カテニン経路の活性は低く保たれている。IWP2 は腺房上皮の分化・成熟を促進することから、end bud 領域における内在的な β -カテニン経路の弱い活性化は腺房上皮の分化・成熟過程に関与することが明らかになった。これまでに、GSK3 阻害剤による β -カテニン経路の活性化は、唾液腺の分岐形成を抑制することが報告されていた (23)。今回の結果から、end bud 部における β -カテニン経路の過剰な活性化は、AQP5 陽性の腺房上皮形成を抑制する結果、分岐形成の阻害につながると考えられた。しかし、IWP2 が AQP5 陽性の腺房上皮形成に影響しないことから β -カテニン経路の過剰活性化による分岐抑制の表現型は実験的なアーチファクトであり、内在的な β -カテニン経路は終末分岐形成を促進的に制御する可能性が示唆された。

そこで、原基培養において Wnt シグナルの抑制の結果認められる、終末分岐の形成不全と、腺房上皮の早期分化・成熟という 2 つの表現型の間に何らかの

因果関係があるのではないかと考えた。

唾液腺の終末分岐（枝分かれ、分枝）は、終末 end bud 部において、多層・非極性化状態の未成熟な上皮細胞間に裂け目（クレフト）が入ることにより形成される（14）。唾液腺の分岐形態形成はこの end bud（腺房部）におけるクレフト形成と上皮の伸長が繰り返し起こることで進行するが、極性化し单層の組織構造を有する成熟した腺房上皮においてもクレフト形成が起こるかどうかについては明らかになっていない。IWP2 の表現型から、Wnt シグナルの抑制により腺房が早期に分化・成熟した結果、終末部の分岐も早期に停止するのではないかと仮説をたてた。

この仮説を検証するために、腺房の分化を誘導しながらも導管の分岐形態形成を同時に評価できる実験系として、FGF1+FGF7 を増殖因子として添加する導管・腺房誘導培地を用いた上皮単独培養系を行った。腺房の分化を誘導しない FGF1 のみでの培養系と、FGF1+FGF7 での培養系とで終末部導管分岐数（end bud 数）について継時的に比較した。その結果、腺房の分化が進行しない FGF1 では観察期間中、終末部導管分岐数は増加し続けたが、一方で FGF1+FGF7 では培養 2 日目にかけて腺房の分化が始まると終末部導管分岐数は増加せず、終末分岐が停止した。すなわち腺房上皮が機能分化・成熟すると新たな分岐形成が停止することが示された。

以上の結果から、腺房部における β -カテニン経路の生理的意義は、腺房上皮の早期の機能分化・成熟を抑制することで分化のタイミングを調節し、終末部の分岐形成を維持することであると考えられた。しかし、 β -カテニン経路が腺房の分化を抑制的に制御する分子メカニズムは不明であり今後、明らかにする必要がある。

これまでの知見と本研究の結果より、Wnt/ β -カテニン経路は唾液腺の発生において、導管部では強く活性化することで唾液腺上皮前駆細胞の増殖制御を介して導管部上皮の伸長を促進的に制御する一方で、腺房部においては適切な強さでの活性化が腺房上皮の早期分化・成熟を抑制することで活発な終末分岐を促すと考えられた。この調節機構は、器官の表面積を拡大しながら機能的に組織分化する、という外分泌腺の発生において非常に重要なプロセスに大きく寄与するものであり、そのメカニズムまで詳細に明らかにした報告は本研究が初めてである。

本研究が、形態形成と機能的分化の両過程を Wnt シグナルが協調的に制御する新規の機構を明らかにしたという点において、今後唾液腺幹細胞誘導による再生医療の実現に向けた研究への応用が期待できると考える。

VII. 総括

1. 唾液腺の分岐形態形成には Wnt シグナルが必要である。
2. 胎生期唾液腺において β -カテニン経路は導管部上皮で強く活性化し、腺房部ではその活性が低く保たれている。
3. β -カテニン経路は唾液腺上皮導管部において、上皮前駆細胞の増殖制御を介して導管の伸長を促進的に制御する。
4. β -カテニン経路は腺房上皮の機能分化・成熟を抑制的に制御し、分化・成熟のタイミングを制御している。
5. 腺房部の機能的な分化・成熟は終末部の分岐形成を抑制する。

以上の結果から、Wnt シグナルが唾液腺上皮の形態形成と機能的分化の両過程を協調的に制御する新規の機構が明らかになった。

VIII. 謝辞

終わりに臨み、本研究に際して終始御指導、御鞭撻ならびに御校閲賜りました大阪大学大学院歯学研究科・顎口腔病因病態制御学講座 口腔外科学第一教室 古郷幹彦教授に謹んで感謝の意を表します。

尚、本研究は大阪大学大学院医学系研究科・分子病態生化学教室で行ったものであり、直接実験の御指導、御助言を賜りました大阪大学大学院医学系研究科・分子病態生化学 菊池章教授に深く感謝いたします。そして、本研究にご協力いただきました本学大学院医学系研究科・分子病態生化学 松本真司博士ならびに藤井慎介博士に深厚なる謝意を表します。また、本研究を進めるに際し、多大なご配慮、御助言をいただきました本学大学院歯学研究科・顎口腔病因病態制御学講座 口腔外科学第一教室の教室員ならびに医学系研究科・分子病態生化学の教室員各位に深謝いたします。

IX. 引用文献

1. A Catalán, M., Nakamoto, T., & E Melvin, J. (2009). The salivary gland fluid secretion mechanism. *The Journal of Medical Investigation*, 56(Supplement), 192-196.
2. Lee, M. G., Ohana, E., Park, H. W., Yang, D., & Muallem, S. (2012). Molecular mechanism of pancreatic and salivary gland fluid and HC03 secretion. *Physiological Reviews*, 92(1), 39-74.
3. Proctor, G. B., & Carpenter, G. H. (2007). Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. *Autonomic Neuroscience : Basic & Clinical*, 133(1), 3-18.
4. Vissink, A., Burlage, F. R., Spijkervet, F. K. L., Jansma, J., & Coppes, R. P. (2003). Prevention and treatment of the consequences of head and neck radiotherapy. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine : An Official Publication of the American Association of Oral Biologists*, 14(3), 213-225.
5. Vissink, A., Jansma, J., Spijkervet, F. K. L., Burlage, F. R., & Copes, R. P. (2003). Oral sequelae of head and neck radiotherapy. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine : An Official Publication of the American Association of Oral Biologists*, 14(3), 199-212.
6. Hayashi, Y., Arakaki, R., & Ishimaru, N. (2009). Salivary gland and autoimmunity. *The Journal of Medical Investigation : JMI*, 56 Suppl(Supplement), 185-191.
7. Guggenheimer J, Moore PA. (2003). Xerostomia : etiology, recognition and treatment. *The Journal of the American Dental Association*, 134(1), 61-69
8. Greenspan, D. (1996). Xerostomia: diagnosis and management. *Oncology*, 10(3 Suppl), 7-11.
9. Fox, P. C. (2004). Salivary enhancement therapies. *Caries Research*, 38(3), 241-246.
10. Nakamura, T., Matsui, M., Uchida, K., Futatsugi, A., Kusakawa, S., Matsumoto, N., Mikoshiba, K. (2004). M(3) muscarinic acetylcholine receptor plays a critical role in parasympathetic control of salivation in mice. *The Journal of Physiology*, 558(Pt 2), 561-575.

11. Kagami, H., Wang, S., & Hai, B. (2008). Restoring the function of salivary glands. *Oral Diseases*, 14(1), 15-24.
12. Patel, V. N., Rebustini, I. T., & Hoffman, M. P. (2006). Salivary gland branching morphogenesis. *Differentiation: Research in Biological Diversity*, 74(7), 349-364.
13. Hogan, B. L. (1999). Morphogenesis. *Cell*, 96(2), 225-233.
14. Sakai, T., Larsen, M., & Yamada, K. M. (2003). Fibronectin requirement in branching morphogenesis. *Nature*, 423(6942), 876-881.
15. Nelson, D. a, Manhardt, C., Kamath, V., Sui, Y., Santamaria-Pang, A., Can, A., Larsen, M. (2013). Quantitative single cell analysis of cell population dynamics during submandibular salivary gland development and differentiation. *Biology Open*, 2(5), 439-447.
16. Ogawa Y. (2003). Immunocytochemistry of myoepithelial cells in the salivary glands. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*. 38(4), 343-426
17. Kikuchi, A., Yamamoto, H., & Kishida, S. (2007). Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors. *Cellular Signalling*, 19(4), 659-671.
18. Logan, C. Y., & Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20, 781-810.
19. 山本英樹. (2008). Wnt シグナル伝達経路の活性制御と発がんとの関連. *生化学*, 80(12), 1079-1093
20. Polakis, P. (2000). Wnt signaling and cancer. *Genes & Development*, 14(15), 1837-1851.
21. Yamaguchi, T. P., Bradley, A., McMahon, A. P., & Jones, S. (1999). A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development*, 126(6), 1211-1223.
22. Häärä, O., Fujimori, S., Schmidt-Ullrich, R., Hartmann, C., Thesleff, I., & Mikkola, M. L. (2011). Ectodysplasin and Wnt pathways are required for salivary gland branching morphogenesis. *Development*, 138(13), 2681-2691.
23. Patel, N., Sharpe, P. T., & Miletich, I. (2011). Coordination of epithelial branching and salivary gland lumen formation by Wnt and FGF signals. *Developmental Biology*, 358(1), 156-167.

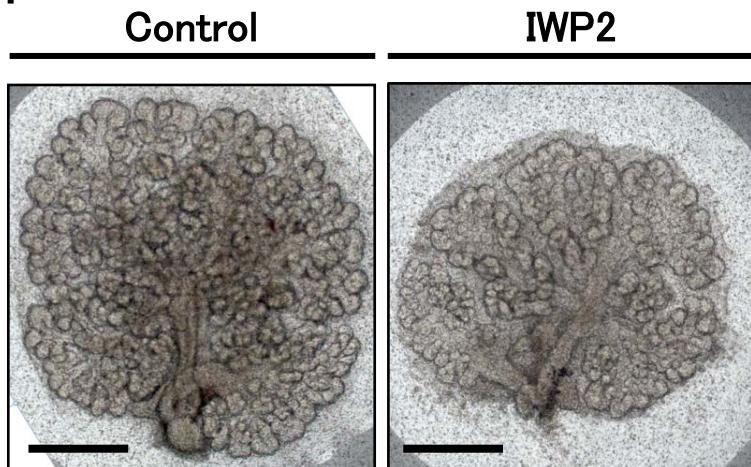
24. Hai, B., Yang, Z., Millar, S. E., Choi, Y. S., Taketo, M. M., Nagy, A., & Liu, F. (2010). Wnt/β-catenin signaling regulates postnatal development and regeneration of the salivary gland. *Stem Cells and Development*, 19(11), 1793-1801.
25. Chen, B., Dodge, M. E., Tang, W., Lu, J., Ma, Z., Fan, C.-W., Lum, L. (2009). Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nature Chemical Biology*, 5(2), 100-107.
26. Ring, D. B., Johnson, K. W., Henriksen, E. J., Nuss, J. M., Goff, D., Kinnick, T. R., Harrison, S. D. (2003). Selective glycogen synthase kinase 3 inhibitors potentiate insulin activation of glucose transport and utilization in vitro and in vivo. *Diabetes*, 52(3), 588-595.
27. Lombaert, I. M. A., Abrams, S. R., Li, L., Eswarakumar, V. P., Sethi, A. J., Witt, R. L., & Hoffman, M. P. (2013). Combined KIT and FGFR2b Signaling Regulates Epithelial Progenitor Expansion during Organogenesis. *Stem Cell Reports*, 1(6), 604-619.
28. Knox, S. M., Lombaert, I. M. A., Haddox, C. L., Abrams, S. R., Cotrim, A., Wilson, A. J., & Hoffman, M. P. (2013). Parasympathetic stimulation improves epithelial organ regeneration. *Nature Communications*, 4, 1494.
29. Patel, V. N., & Hoffman, M. P. (2014). Salivary gland development: a template for regeneration. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 25-26, 52-60.
30. Van Amerongen, R., & Berns, A. (2006). Knockout mouse models to study Wnt signal transduction. *Trends in Genetics: TIG*, 22(12), 678-89.
31. Miller, R., & McCrea, P. (2010). Wnt to build a tube: contributions of Wnt signaling to epithelial tubulogenesis. *Developmental Dynamics*, 239(1), 77-93.
32. Kikuchi, A., Yamamoto, H., Sato, A., & Matsumoto, S. (2012). Wnt5a: its signalling, functions and implication in diseases. *Acta Physiologica*, 204(1), 17-33.
33. Van Amerongen, R., & Nusse, R. (2009). Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development*, 136(19), 3205-3214.
34. Knox, S. M., Lombaert, I. M. a, Reed, X., Vitale-Cross, L., Gutkind, J. S., & Hoffman, M. P. (2010). Parasympathetic innervation maintains

- epithelial progenitor cells during salivary organogenesis. *Science*, 329(5999), 1645-1647.
- 35. Patel, V. N., Likar, K. M., Zisman-Rozen, S., Cowherd, S. N., Lassiter, K. S., Sher, I., Hoffman, M. P. (2008). Specific heparan sulfate structures modulate FGF10-mediated submandibular gland epithelial morphogenesis and differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(14), 9308-9317.
 - 36. Ben Z. Stanger, Akemi J. Tanaka & Douglas A. Melton (2007). Organ size is limited by number of embryonic progenitor cells in the pancreas but not the liver. *Nature*, 445(7130), 886-891
 - 37. Li, L., & Clevers, H. (2010). Coexistence of quiescent and active adult stem cells in mammals. *Science*, 327(5965), 542-545.

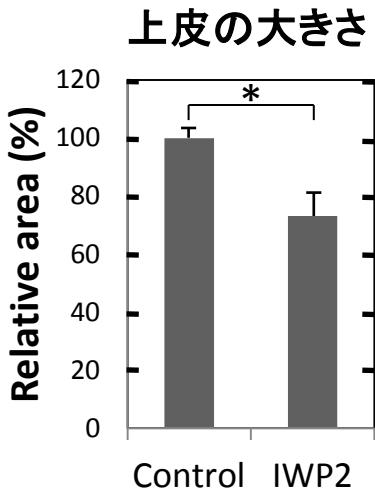
X. 図表

- 図1. 唾液腺発生におけるWntシグナルの機能抑制による表現型
- 図2. 唾液腺の分岐形態形成に影響を及ぼすWntシグナル経路の同定
- 図3. 唾液腺導管部上皮における β -カテニン経路の役割
- 図4. 腺房形成における β -カテニン経路の役割
- 図5. 腺房の分化・成熟が終末分岐に与える影響

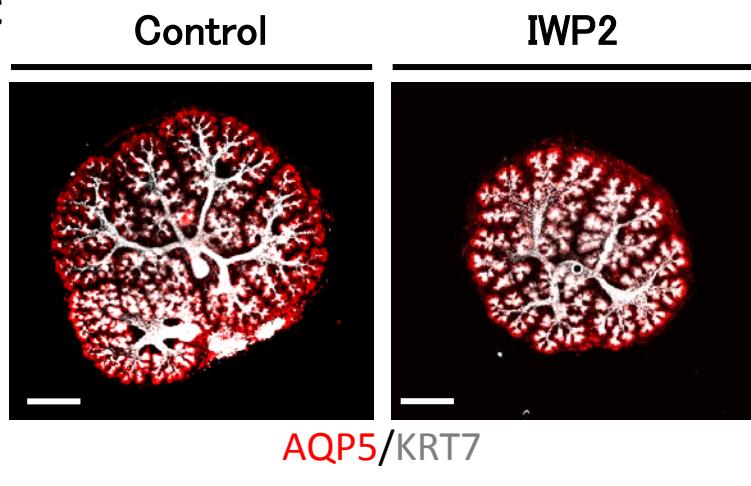
A 培養4日目



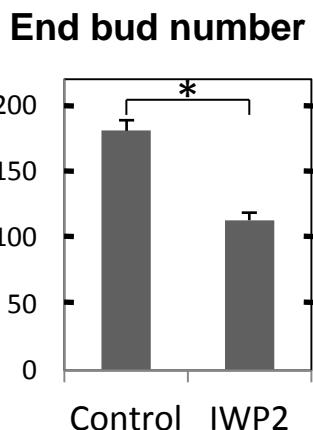
B



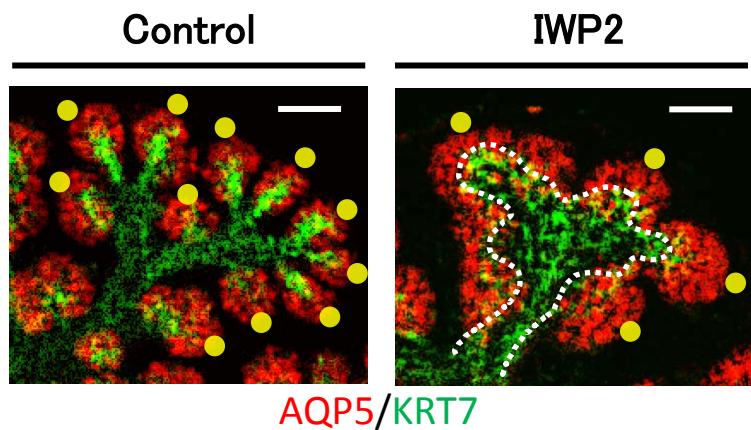
C



D



E



F

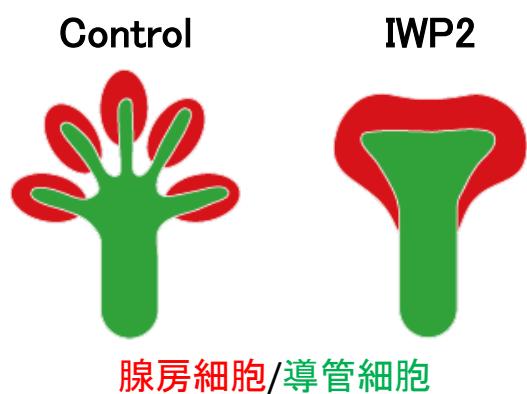


図1. 唾液腺発生におけるWntシグナルの機能抑制による表現型

胎生13日目のマウス胎仔から唾液腺原基を分離し、一方にはIWP2を添加して4日間原基培養を行った(A)。それぞれの上皮の大きさを2次元的に評価するためBZ-II画像解析アプリケーション(Keyence[®])を使用して計測($n=3$)した。データは「平均±標準誤差」で示し、controlを100%として割合で示した(B)。原基培養4日目の唾液腺原基をAQP5(赤色)およびKRT7(灰色)で免疫組織化学染色し、BZ-9000で撮影してend bud数を計測($n=3$)した。データは「平均±標準誤差」で示した(D)。AQP5(赤色)、KRT7(緑色)で染色し、終末部を拡大した。End bud(黄色点)と導管(白点線)を標識した(E)。Eの模式図を(F)に示す。緑色は導管、赤色は腺房を示す。* $P < 0.05$ (student's t test) Scale bars : (A) 500 μ m, (C) 400 μ m, (E) 100 μ m

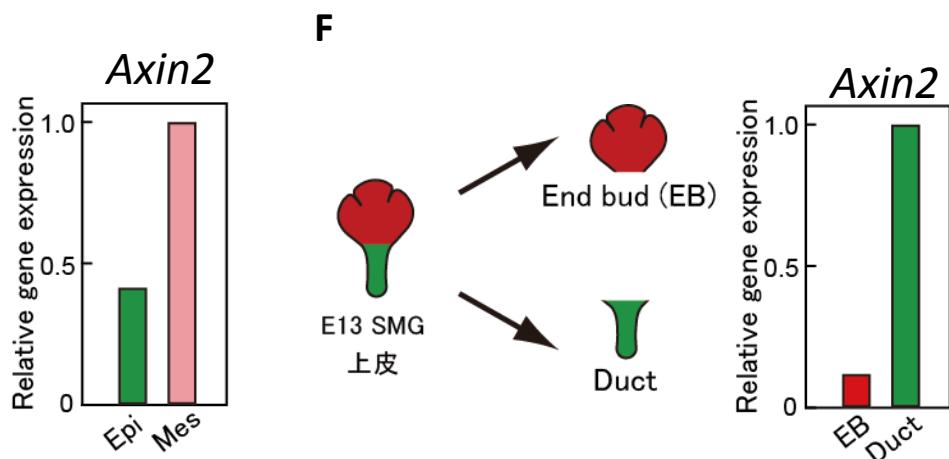
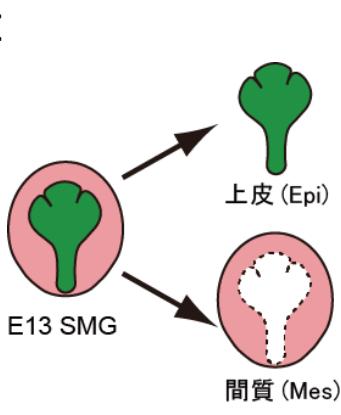
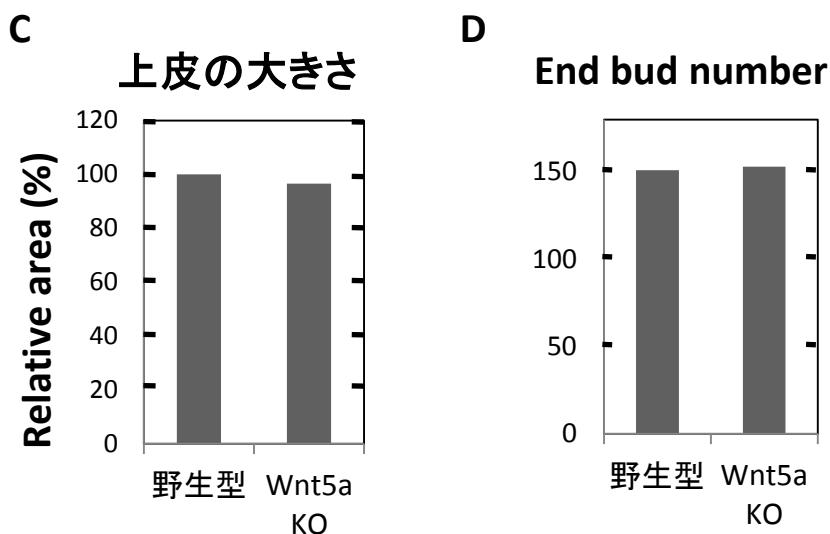
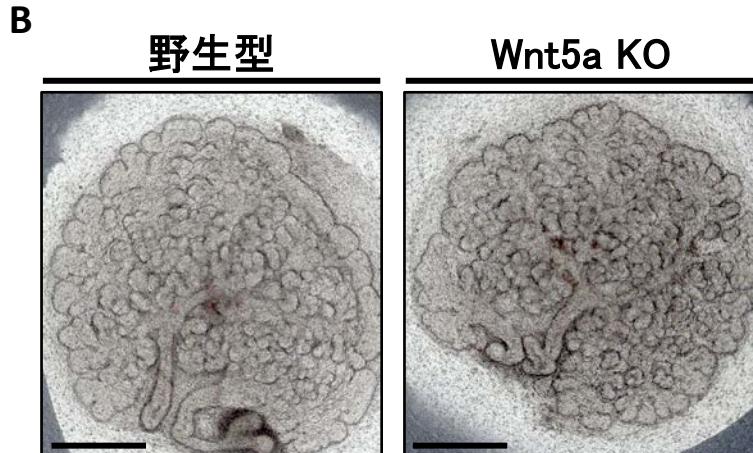
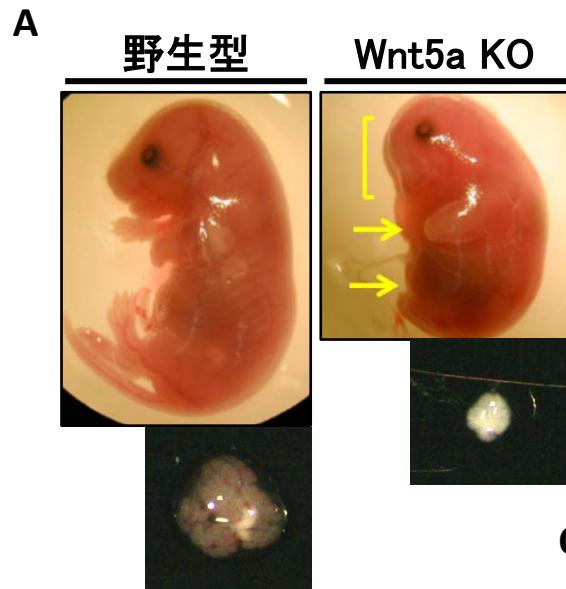


図2. 唾液腺の分岐形態形成に影響を及ぼすWntシグナル経路の同定

胎生17.5日目の胎仔の写真を示す。Wnt5aノックアウトマウスでは顔面・四肢の形成不全を認める(黄色括弧、矢印)。また下方にこの胎仔から摘出した唾液腺原基の写真を示す(A)。それぞれ胎生13日目のマウス胎仔から分離した唾液腺原基を培養し、3日間経過後に観察した(B)。上皮の大きさを2次元的に評価するためBZ-II画像解析アプリケーション(Keyence[®])を使用して計測($n=1$)した。データは野生型を100%として割合で示した(C)。また、End Bud数を計測した(D)。胎生13日目のマウス胎仔より分離した唾液腺原基を上皮と間質とに分離し、*Axin2*のmRNA発現量をリアルタイムPCR法を用いて解析した(E)。また上皮を終末End bud部と導管部とに分け、*Axin2*のmRNA発現をリアルタイムPCR法を用いて解析した(F)。間質(E)と導管部(F)の発現量を1とし、mRNA発現量の比を示した。Scale bar: 500 μ m

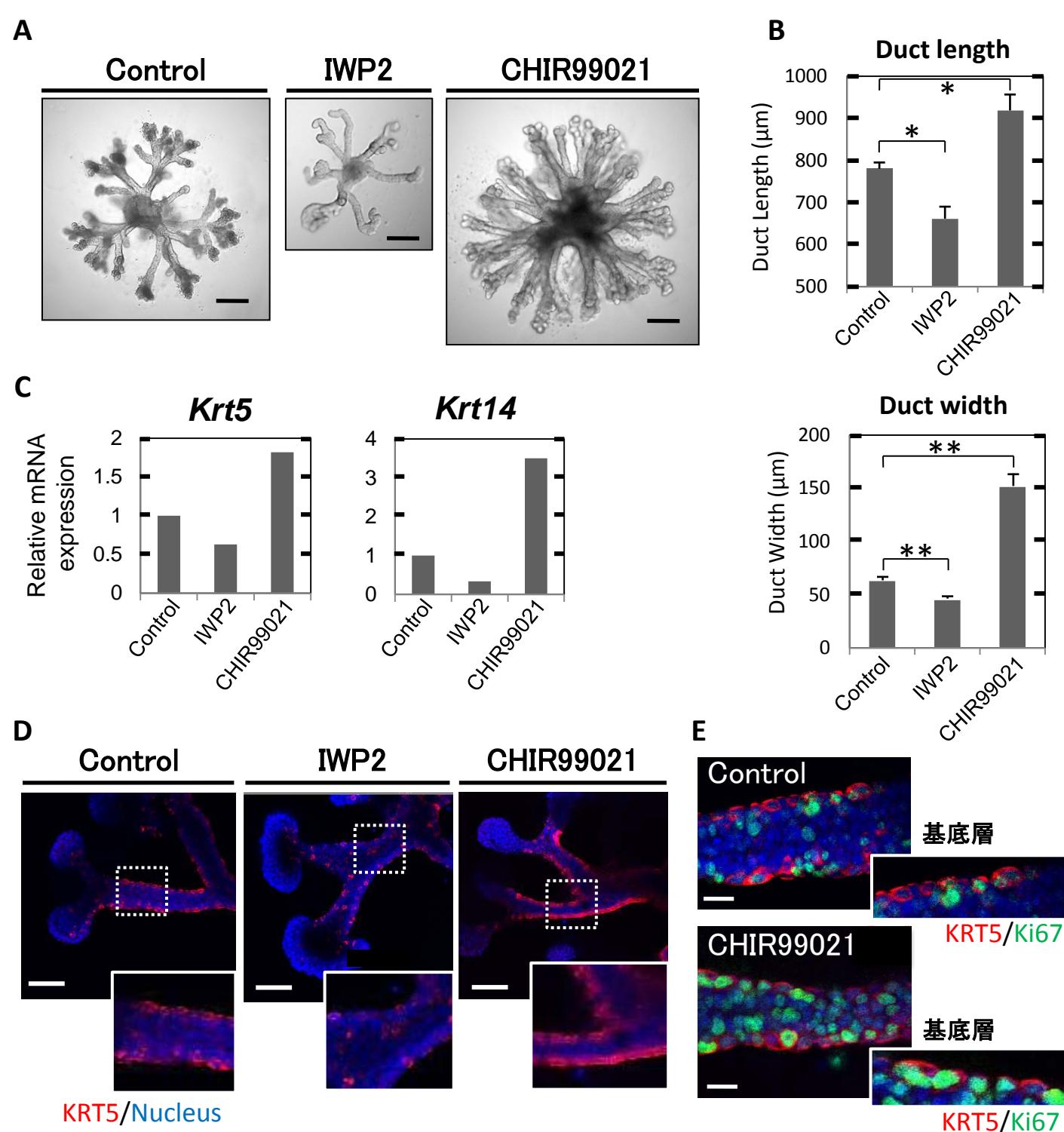


図3. 唾液腺導管部上皮における β -カテニン経路の役割

胎生13日目のマウス胎仔から顎下腺上皮を分離し、IWP2およびCHIR99021(CHIR)存在下で上皮単独培養を4日間行った(A)。上皮単独培養を行い4日間経過後、導管の長さおよび太さをBZ-II画像解析アプリケーション(Keyence[®])を使用し計測(n=3)した。データは「平均±標準誤差」で示した(B)。胎生13日目のマウス胎仔から顎下腺上皮を分離し、上皮単独培養を4日間行った後、Krt5、Krt14のmRNA発現量を比較した。Controlの発現量を1とし、その比で示した(C)。胎生13日目のマウス胎仔から唾液腺上皮を分離し、上皮単独培養を4日間行った後、KRT5(赤色)およびDRAQ5TM(青色)で免疫組織化学染色を行った。導管部の拡大図(点線四角)を下方に示した(D)。また同様に処理した上皮の導管部をKRT5(赤色)およびKi67(緑色)、DRAQ5TM(青色)で染色したものと示す。特に基底層を拡大したものを右下方に示す(E)

*P < 0.05, **P < 0.001 student's t test Scale bars : (A) 200 μm, (D) 100 μm, (E) 20 μm

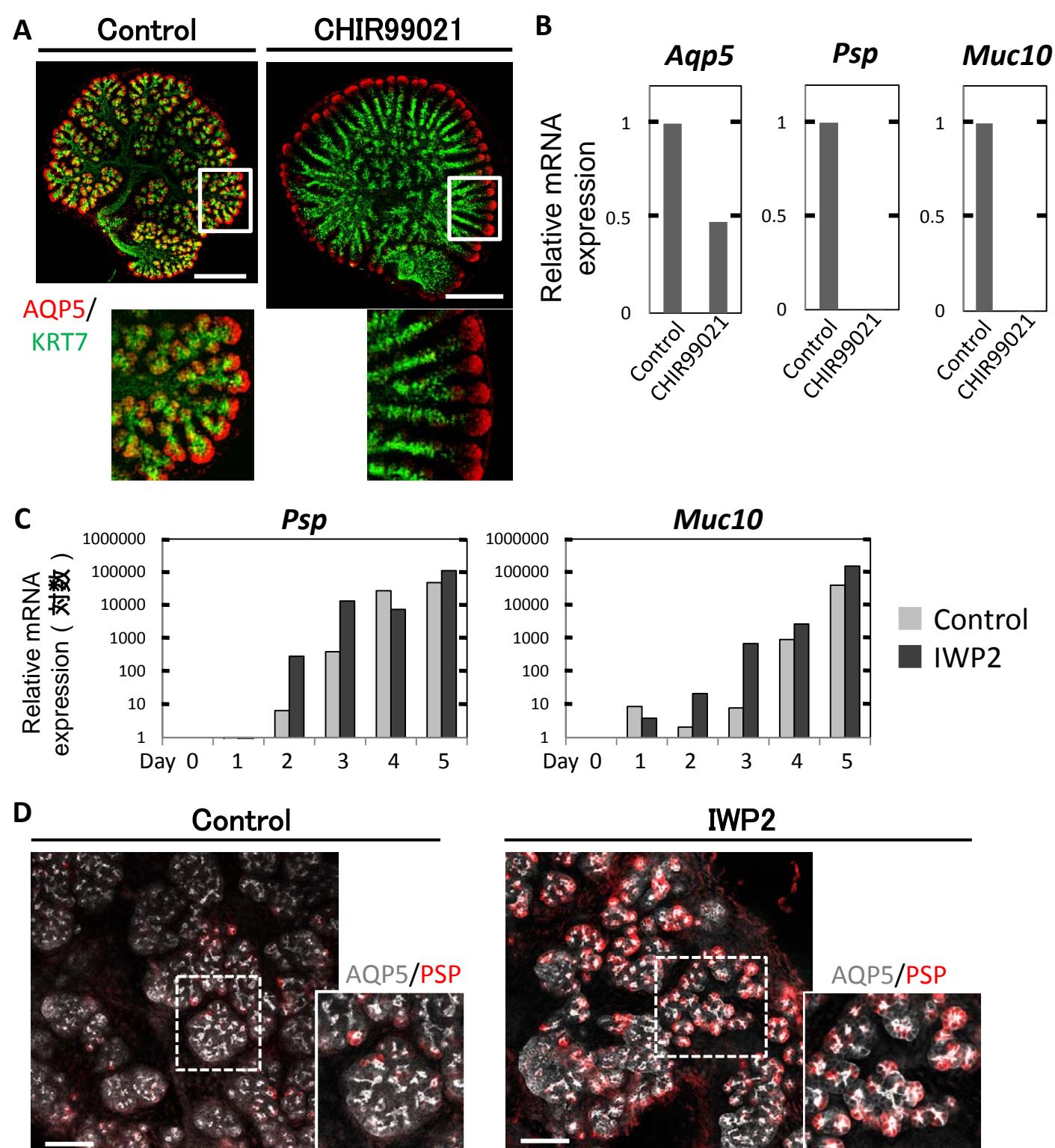
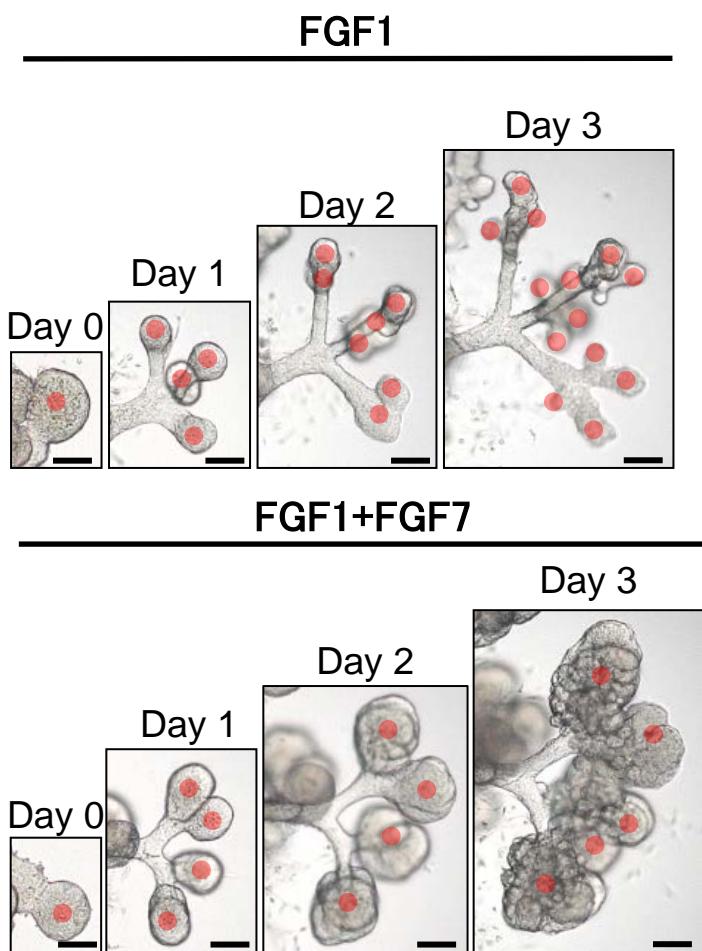


図4. 腺房形成における β -カテニン経路の役割

胎生13日目のマウス胎仔から分離した唾液腺原基を培養し、4日間経過後にAQP5(赤色)とKRT7(緑色)で免疫組織化学染色を行った。腺房部の拡大図(四角)を右下方に示す(A)。胎生13日目のマウス胎仔から唾液腺原基を分離し、培養を4日間行った後、*Aqp5*, *Psp*, *Muc10*のmRNA発現量を比較した。Controlの発現量を1とし、その比で示した(B)。胎生13日目のマウス胎仔から唾液腺原基を分離し、培養を行った。1日ごとにmRNAを回収し、*Psp*, *Muc10*のmRNA発現量を比較した。胎生13日目の唾液腺原基の発現量を1とし、その比(対数)で示した(C)。胎生13日目のマウス胎仔から唾液腺原基を分離し、培養を行い、3日間経過後、PSP(赤色)およびAQP5(灰色)で免疫組織化学染色を行った。腺房の拡大図(点線四角)を右下方に示す(D)。

Scale bars : (A) 500 μ m, (D) 100 μ m

A



B

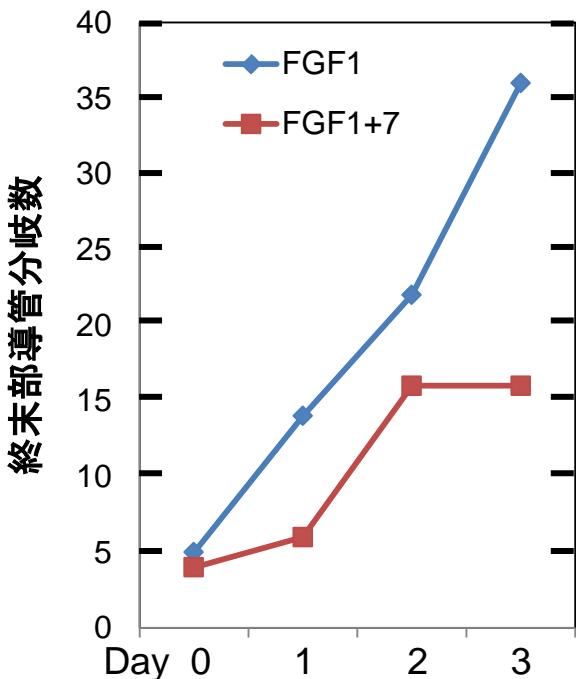


図5. 腺房の分化・成熟が終末分岐に与える影響

E13のマウス胎仔から頸下腺上皮を分離して上皮単独培養を行い、継時的に腺房部を観察した。赤色の点はEnd budを示す(A)。それぞれの上皮のEnd budにつながる導管数を終末部導管分岐数として継時的に計測した(B)。Scale bar : 100 μ m