



Title	胎児期において低酸素誘導因子Hypoxia inducible factor 1 α が顎下腺の発育に及ぼす影響
Author(s)	木村, 友昌
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/91840
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

胎児期において

低酸素誘導因子 Hypoxia inducible factor 1 α が
顎下腺の発育に及ぼす影響

大阪大学大学院歯学研究科 口腔科学専攻

顎口腔病因病態制御学講座 口腔外科学第二教室

(指導教官：阪井 丘芳 教授)

木村 友昌

緒言

造血促進因子であるエリスロポエチン (EPO) は低酸素環境で産生され、酸素を効率よく供給できるよう生体内で調整されている[1]。低酸素誘導因子 Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1)は低酸素環境下で低酸素応答因子 (HRE) に結合し、EPO 遺伝子の発現を上昇させる転写因子である[2, 3]。HIF-1 は低酸素誘導性サブユニットである HIF-1 α と HIF-1 β から構成されるヘテロ二量体複合体である。通常の酸素濃度において、HIF-1 α の特定のプロリン残基がプロリン水酸化ドメインタンパク (PHD) により水酸化される。HIF-1 α の水酸化された残基が von Hippel Lindau tumor suppressor (pVHL) を含む E3 ユビキチンリガーゼによってユビキチン化にされることにより、プロテアソーム分解を受ける。一方、低酸素条件下では PHD の活性が抑制されるため、HIF-1 α は水酸化されずプロテアソーム分解を回避することができる。その結果、安定化した HIF-1 α は核内に移行して HIF-1 β と二量体を形成し、低酸素応答が活性化される。

唾液は、消化作用、抗菌作用、粘膜保護作用、および食塊形成作用などを有することから、口腔内はもとより全身の環境および機能の維持に重要な役割を果たしている[4]。唾液産生の場合である唾液腺の発生は、マウスにおいて胎生 12 日齢から開始される[5-7]。唾液腺は、上皮を間葉組織が取り囲む構造からなり、胎

生 13 日齢頃に単房状の上皮組織に数カ所の裂け目が入り腺房の形成が始まる。細胞増殖を繰り返しながら分岐形態形成を経ることで、効率よく唾液分泌を行う唾液腺が完成されていく。唾液腺の発育の時期である胎児期の酸素環境は低酸素状態であるが、唾液腺発育における HIF-1 α の役割は現在まで調べられていない。本研究では、*ex vivo* 唾液腺器官培養法を用いて唾液腺の発育における HIF-1 α の役割を解析した。

材料と方法

1. 実験動物

ICR 系妊娠マウス (日本 SLE 株式会社) の胎仔を用いた。すべての動物実験は、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行われた。また、本研究は大阪大学大学院歯学研究科動物実験倫理委員会の承認を得て行われた (承認番号：動歯 H-30-024-0)。

2. 器官培養

ICR 系妊娠マウスから胎生 13.5 日齢 (以下、E13.5) の胎仔を摘出した。実体顕微鏡 Stemi2000-CS (Carl Zeiss) を使用し、胎仔マウスの顎下腺 (以下、SMG) 剖出を行った。まず、ガラス製剖板上で胎仔マウスから下顎を分離し、鑷子を用いて舌を摘出した。舌に付着している 2 つの SMG を採取し、Sakai らの方法[8, 9]に準じて器官培養を行なった。150 $\mu\text{g/mL}$ ビタミン C (Sigma-Aldrich) と 50 $\mu\text{g/mL}$ トランスフェリン (Sigma-Aldrich) を添加した 200 μL の DMEM / F12 培地 (Life Technologies) で 50 mm Glass Bottom Dish (Mat Tek Corporation) の中央の窪みを満たし、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唾液腺を静置し、37°C、5% CO_2 条件下で培養した。培養後の

唾液腺の実体顕微鏡像を撮影したものを、3人の研究者が目視により観察し腺房数の計測を行った。

3. Western blot 法

RIPA buffer (Nacalai Tesque) 、 SDS solution (Nacalai Tesque) 、 Protease Inhibitor Cocktail (Nacalai Tesque) を用いて培養後の SMG を溶解した。溶解液を 15,000 rpm、4°Cで 60 分間遠心分離を行い、上清を回収した。回収した上清に 2x Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad) 、 5% 2-Mercaptoethanol (Bio-Rad) を加えて試料とした。Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad) を用いて調整した試料を電気泳動し、Trans-Blot® Turbo Transfer System (Bio-Rad) を用い PVDF Membrane (Bio-Rad) に転写した。0.05% Tween (Wako) を含む Tris Buffered Saline (TBST) で転写されたメンブレンを洗浄後、3%のスキムミルクでブロッキングを行なった。一次抗体は、ウサギ抗 HIF-1 α 抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology) 、ウサギ抗 GLUT1 抗体 (1:10,000, Abcam) 、マウス抗 VEGF 抗体 (1:100, Invitrogen) 、ウサギ抗 ERK1/2 抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology) 、ウサギ抗 P-ERK1/2 抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology) 、ウサギ抗 LC3B 1/2 抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology) 、ウサギ抗 Cleaved-caspase-3 抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology) 、ウサギ抗 Procaspace-3 抗体 (1:1000, Cell Signaling Technology) 、マウス抗 PCNA 抗体 (1:5000, BD) 、ウサギ抗 Cyclin D1 抗体 (1:10,000, Abcam) 、マウス抗 actin

抗体 (1:1000, Sigma Aldrich) を使用した。反応終了後、TBST でメンブレンを洗浄し、二次抗体反応は、HRP 標識ヤギ抗ウサギ抗体 (1:1000) 、HRP 標識ヤギ抗マウス抗体 (1:1000) を反応させた。メンブレンの発光反応は、Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) を用いて行い、シグナルを GeneGnome-5 (SYNGENE) で検出した。発現の評価として ImageJ を用いてピクセル数の計測を行った。また、actin のピクセル数を 1 として標準化した。

4. 阻害剤

HIF-1 α 阻害剤である BAY 87-2243 (Selleck Chemicals) 、ERK1/2 を阻害する際に用いられる MEK 阻害剤 U0126 (Cell Signaling Technology) を DMEM/F12 培地に添加し器官培養を行なった。BAY 87-2243 は 50、100 μ M、U0126 は 10、20、40 μ M の濃度になるよう培地に添加した。摘出後 18 時間培養した SMG を BAY 87-2243、あるいは U0126 を含む DMEM/F12 培地で低酸素条件の下 4 時間または 30 時間培養した。

5. 低酸素刺激

摘出後 18 時間培養した SMG を、hypoxic culture kit BIONIX-1 (Sugiyama-Gen Co., Ltd) を用いて低酸素濃度である 5% (5% O₂) と極度の低酸素濃度である 1%

(1% O₂) に調整し、さらに 4 時間または 30 時間の培養を行なった。

6. 統計解析

統計的な有意性を示す P 値の決定には Student の t 検定と、一元配置分散分析 (ANOVA) 後に Bonferroni 法を組み合わせ、多重比較検定を行なった。統計的有意性は、 $P < 0.05$ とした。結果は、平均値 $\pm$ 標準誤差 (S.E.M) 値で表した。

結果

1. 異なる酸素濃度における唾液腺の形態評価およびタンパク発現解析

20% O₂ と 5% O₂ で 0 時間、30 時間培養した SMG の腺房数を計測し、それぞれ培養後 0 時間後の腺房数を 1 として標準化した。また、形態の評価を行った。

20% O₂ と 5% O₂ で培養した SMG の形態と腺房数において両群の差は認めなかった (図 1 A、 B) 。次に、20% O₂ と 5% O₂ で 0、4、8、12、24 時間培養した

SMG を用い、Western blot 法により HIF-1 α の発現を経時的に解析した。20% O₂

では HIF-1 α の発現は認めなかった。5% O₂ では低酸素刺激後 4 時間で HIF-1 α の発現のピークをむかえ、その後時間経過とともに減少した (図 1 C) 。低酸素刺

激後 4 時間で HIF-1 α の発現が強く認められたため、本実験では Western blot 法

に用いる SMG の低酸素刺激時間を 4 時間と設定した。HIF-1 α の下流因子であ

り糖の取り込みに関与する GLUT1、血管新生に関与する VEGF の発現について

も解析を行なった。GLUT は、細胞において呼吸を維持するために必要なグルコ

ースの取り込みに、VEGF は生理的、病的状態において血管新生やリンパ管形成

に重要な役割を担っており、共に組織の発育にとって不可欠な因子である[10,

11]。GLUT1 および VEGF の発現は 20% O₂ と比較し 5% O₂ で増加した (図 1 D) 。

2. HIF-1 α 阻害剤 (BAY 87-2243) を添加した顎下腺発育の検証

HIF-1 α が SMG の発育に関与していることを検証するため、HIF-1 α 阻害剤である BAY 87-2243 を用いた実験を行なった[12, 13]。まず、BAY 87-2243 の濃度を 50、100 μ M になるように DMEM/F12 培地に添加し 5% O₂ で SMG を培養後、Western blot 法により HIF-1 α 、GLUT1、VEGF の発現を解析した。いずれのタンパクも BAY 87-2243 の濃度依存的に発現が減少していることがわかった (図 2 A)。次に、SMG の形態と腺房数の評価を行なった。BAY 87-2243 非添加群と比較し、BAY 87-2243 を添加し培養した SMG の腺房形態は異常を認め、腺房数は有意に減少した (図 2 B、C)。これらの結果から、BAY 87-2243 による HIF-1 α の阻害に伴い SMG の発育が抑制されていることが明らかになった。

3. ERK1/2 阻害剤 (U0126) を添加した HIF-1 α シグナル経路の検証

唾液腺の発育における HIF-1 α シグナル経路の解析を行うため、ERK1/2 を阻害する際に用いられる MEK 阻害剤 U0126 を用いた実験を行なった[14, 15]。U0126 を 0、10、20、40 μ M の濃度になるように DMEM / F12 培地に添加し 5% O₂ で SMG を培養後、Western blot 法により HIF-1 α 、リン酸化 ERK1/2 (P-ERK1/2) の発現を解析した。その結果、HIF-1 α と P-ERK1/2 の発現は共に U0126 の濃度依存的に減少した (図 3 A)。次に、U0126 を添加し 5% O₂ で培養した SMG の

形態と腺房数の評価を行なった。U0126 非添加群と比較し、U0126 を添加した SMG の腺房形態は異常を示し、腺房数は有意に減少した (図 3 B、C) 。U0126 を 20 μ M の濃度になるように DMEM / F12 培地に添加し 20 % O₂ と 5% O₂ で SMG を培養後、Western blot 法により HIF-1 α 、P-ERK1/2 の発現を解析した。5% O₂ においては U0126 の添加により、U0126 非添加群と比較し HIF-1 α の発現が減少した。P-ERK1/2 は 20 % O₂ と 5% O₂ で発現を認めたが、いずれの条件においても U0126 を添加することで U0126 非添加群と比較し発現は減少した (図 3 D) 。U0126 を 20 μ M の濃度になるよう DMEM / F12 培地に添加し 5% O₂ で SMG を培養後、Western blot 法により GLUT1、VEGF の発現を解析した。U0126 の添加により、GLUT1、VEGF の発現は共に U0126 非添加群と比較し減少した (図 3 E) 。以上の結果から、ERK1/2 が HIF-1 α の上流の基質であることが明らかになった。また、ERK1/2 のリン酸化により HIF-1 α の発現が調整されている可能性が示唆された。

4. 極度の低酸素状態における顎下腺発育の検証

組織が極度の低酸素状態に曝露されると発育障害が生じる[16, 17]。妊娠中に異常が発生し胎児が極度の低酸素状態に曝されたと仮定し、極度の低酸素状態における唾液腺の発育について検証をした。SMG を通常酸素状態である 20% O₂、

低酸素状態である 5% O₂、極度の低酸素状態である 1% O₂ で培養を行い、腺房形態と腺房数の評価、タンパク発現の解析を行なった。腺房の大きさおよび腺房数は、20% O₂、5% O₂ と比較し 1% O₂ で減少し、発育の抑制を認めた (図 4 A、B)。

次に Western blot 法により HIF-1 α 、GLUT1、VEGF の発現を解析した。酸素濃度の減少に伴い、いずれのタンパクも発現が増加した (図 4 C、D)。1% O₂ で HIF-1 α 、GLUT1、VEGF の発現が増加したにもかかわらず SMG の発育が抑制された原因を調べるために発育関連タンパクの発現の解析を行なった。先行研究で唾液腺発育過程における細胞増殖能と細胞死の役割が報告されていることから[7, 18]、低酸素状態の細胞増殖能と細胞死への影響を検討した。Western blot 法により PCNA、Cyclin D1、Cleaved-caspase-3、Procaspase-3、および LC3B1/2 の発現を解析した。PCNA、Cyclin D1 の発現は 5% O₂ で増加し、1% O₂ で減少した (図 4 E)。酸素濃度の変化による Cleaved-caspase-3、Procaspase-3、および LC3B1/2 の発現に差は認めなかった (図 4 F)。これらの結果から、HIF-1 α は極度の低酸素状態においても強い発現を示すが、5% O₂ と同様には唾液腺の発育を促進できないことが明らかとなった。細胞増殖能、細胞周期の進行は 5% O₂ で促進され、1% O₂ で抑制されることが明らかとなった。また、アポトーシスとオートファジーは酸素濃度変化により影響を受けなかった。

考察

唾液腺の発育、分枝形態形成には様々な因子やサイトカインが関わっているが[7]、低酸素環境の影響や HIF-1 α シグナルの関わりについては明らかではない。本研究では、酸素濃度を調整した唾液腺の器官培養法を用い HIF-1 α の唾液腺発育への関与の検討を行なった。まず初めに、組織の発育には酸素が不可欠であるが、低酸素状態である 5% O₂ においても通常酸素状態である 20% O₂ で培養した SMG と腺房形態、腺房数において差は認めず同様の発育を示すことを確認した (図 1 A、B) 。また、HIF-1 α が 20% O₂ では発現せず 5% O₂ で発現すること、HIF-1 α の下流因子である GLUT1、VEGF[2, 19]の発現が 20% O₂ と比較し 5% O₂ でより発現していることを確認した (図 1 C、D) 。これらの結果から、HIF-1 α シグナル経路が低酸素状態における唾液腺の発育を促進している可能性がある。この仮説を明らかにするため、HIF-1 α 阻害剤である BAY 87-2243 を添加し SMG の発育、タンパク発現の評価を行った。BAY 87-2243 を添加し培養した SMG は HIF-1 α 、GLUT1、VEGF の発現が非添加群と比較し減少し、また腺房形態の異常および腺房数の減少を認めた (図 2) 。これらの結果より、低酸素状態での唾液腺の発育において HIF-1 α の存在が重要であることが示唆された。

ERK1/2 シグナル経路は呼吸器・骨格筋・マクロファージなどの臓器・組織・

細胞の発生や、恒常性の調節に必須であると過去に報告されている[20-22]。本研究の結果から、ERK1/2 経路は、その下流因子である HIF-1 α 、GLUT1、VEGF の発現を誘導することにより、低酸素条件下での SMG 発生に関与していることが示唆された (図 3)。

極度の低酸素状態である 1% O₂ においては HIF-1 α 、GLUT1、VEGF の発現が増加したにもかかわらず SMG の発育は抑制された (図 4A、B、C、D)。当初、HIF-1 α を介した GLUT1、VEGF の発現の増加が極度の低酸素状態においても発育を維持すると予想した。しかし、SMG の発育が抑制されたため、細胞増殖能、細胞周期のマーカーである PCNA、Cyclin D1 の発現について調べた。Western blot の結果、PCNA、Cyclin D1 の発現は 5% O₂ で上昇し、酸素濃度の低下に伴い減少した (図 4E)。これらの結果から、極度の低酸素状態においては HIF-1 α を介した GLUT1、VEGF の発現増加による効果よりも、細胞増殖能、細胞周期の抑制の方がより SMG の発育に影響を及ぼしたことが示唆された。

さらに、アポトーシスとオートファジーに関与する因子である Procaspace-3、Cleaved-caspase-3、LC3B1/2 の発現を検討した。本研究においては酸素濃度を変化させても Procaspace-3、Cleaved-caspase-3、LC3B1/2 の差は認められず、酸素濃度変化によるアポトーシスとオートファジーへの影響は乏しいと思われた (図 4F)。オートファジーには、栄養が供給され、適切な pH に制御され、細胞死を

引き起こさないオートファジーと、厳しい低酸素状態や代謝ストレス下で誘導され、細胞死を引き起こすオートファジーがあると過去の文献で報告されている[23]。我々の結果は前者の報告を支持するものであった。すなわち、低酸素条件下では GLUT1 や VEGF の発現は上昇するが、細胞死を引き起こさないというものであり、グルコースの取り込みと血管新生を介した代謝ストレスがない状態で、細胞死を誘導しないオートファジーが存在することが示された。また以前の研究において、低酸素刺激がアポトーシスを抑制することが報告されている[24]。この抑制メカニズムは複数の研究で検討されており、HIF-1 α 依存性のもの、HIF-1 α 非依存性のものが報告されている[25]。過去の文献において、HIF-1 α が鉄キレート剤を含む機構を介して、アポトーシスに対して保護的な役割を果たす報告[26]、低酸素状態で活性化される ERK1/2 経路がアポトーシスを防ぐとの報告がある[27]。本研究においても既報のごとく、低酸素状態において ERK1/2 のリン酸化および HIF-1 α の発現が促進され、アポトーシスを防いだ可能性が示唆された。以上のことから、極度の低酸素条件における SMG の発育抑制はアポトーシスやオートファジーによるものではなく、細胞増殖および細胞周期の抑制に起因するものであることを示唆している。

本研究は、*ex vivo* 唾液腺の器官培養法を用いて HIF-1 α が唾液腺発生に影響を与えることを初めて証明したものである。また、HIF-1 α が ERK1/2 経路を介

して作用し、その下流の GLUT1 や VEGF の発現を増加させることを明らかにした。さらなるメカニズムの解析により唾液腺形成における HIF-1 α の役割の理解が深まり、唾液腺と同様の腺房形成を伴う肺や腎臓などの臓器の発育機構の解明にも繋がることが期待される。

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大学院歯学研究科 高次脳口腔機能学講座 顎口腔機能治療学教室 阪井丘芳教授に深甚なる謝意を表します。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頂き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 口腔外科学第二教室 鵜澤成一教授、大阪大学歯学部附属病院 検査部 酒井学先生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顎口腔病因病態制御学講座 口腔外科学第二教室、ならびに高次脳口腔機能学講座 顎口腔機能治療学教室の皆様には厚く御礼申し上げます。

図説明

図 1. 異なる酸素濃度における顎下腺の形態評価およびタンパク発現解析

(A) 20% O₂ と 5% O₂ で 0 時間、30 時間器官培養した顎下腺の位相差顕微鏡像を示す。スケールバーは 250 μm を表す。

(B) 20% O₂ と 5% O₂ で顎下腺を培養後、0 時間後と 30 時間後の腺房数を位相差顕微鏡を用いて計測し、それぞれ 0 時間後の腺房数を 1 として標準化した (腺房数比 = 30 時間後の腺房数 / 0 時間後の腺房数)。値は平均値および標準誤差 (S.E.M) を示す (n = 6)。n.s.: not significant

(C) E13.5 の顎下腺を 18 時間器官培養し、さらに 20% O₂ と 5% O₂ で 0、4、8、12、24 時間器官培養を行った後、HIF-1α の発現を Western blot 法により解析した。

(D) E13.5 の顎下腺を 18 時間器官培養し、さらに 20% O₂ と 5% O₂ で 4 時間器官培養を行った後、HIF-1α、GLUT1、VEGF の発現を Western blot 法により解析した。

図 2. HIF-1 α 阻害剤 (BAY 87-2243) を添加した顎下腺発育の検証

(A) E13.5 の顎下腺を 18 時間器官培養し、さらに 5% O₂ で DMSO、BAY87-2243 (50、100 μ M) を添加し 4 時間器官培養を行った後、HIF-1 α 、GLUT1、VEGF の発現を Western blot 法により解析した。

(B) 5% O₂ で DMSO、BAY87-2243 (50 μ M) を添加し 0 時間、30 時間器官培養した顎下腺の位相差顕微鏡像を示す。スケールバーは 250 μ m を表す。

(C) 5% O₂ で DMSO、BAY87-2243 (50 μ M) を添加し顎下腺を 0 時間、30 時間器官培養後、腺房数を位相差顕微鏡を用いて計測し、それぞれ 0 時間後の腺房数を 1 として標準化した (腺房数比 = 30 時間後の腺房数 / 0 時間後の腺房数) 。値は平均値および標準誤差 (S.E.M) を示す (n = 6) 。 ** $P < 0.01$ vs control

図 3. ERK1/2 阻害剤 (U0126) を添加した HIF-1 α シグナル経路の検証

(A) E13.5 の顎下腺を 18 時間器官培養し、さらに 5% O₂ で U0126 (0、10、20、40 μ M) を添加し 4 時間器官培養を行った後、HIF-1 α 、P-ERK1/2、ERK1/2 の発現を Western blot 法により解析した。

(B) E13.5 の顎下腺を 18 時間器官培養し、さらに 5% O₂ で DMSO、U0126 (20 μ M) を添加し 0 時間、30 時間器官培養した顎下腺の位相差顕微鏡像を示す。スケールバーは 250 μ m を表す。

(C) E13.5 の顎下腺を 18 時間器官培養し、さらに 5% O₂ で DMSO、U0126 (20 μM) を添加し 0 時間、30 時間器官培養後の顎下腺の腺房数を計測し、それぞれ 0 時間後の腺房数を 1 として標準化した (腺房数比 = 30 時間後の腺房数 / 0 時間後の腺房数)。値は平均値および標準誤差 (S.E.M) を示す (n = 6)。***P* < 0.01 vs control

(D) E13.5 の顎下腺を 18 時間器官培養し、さらに 20% O₂ と 5% O₂ で DMSO、U0126 (20 μM) を添加し 4 時間器官培養を行った後、HIF-1α、P-ERK1/2、ERK1/2 の発現を Western blot 法により解析した。

(E) E13.5 の顎下腺を 18 時間器官培養し、さらに 5% O₂ で DMSO、U0126 (20 μM) を添加し 4 時間器官培養を行った後、GLUT1、VEGF の発現を Western blot 法により解析した。

図 4. 極度の低酸素状態における顎下腺発育の検証

(A) 20% O₂、5% O₂ に加えて極度の低酸素状態として 1% O₂ で 0 時間、30 時間器官培養した顎下腺の位相差顕微鏡像を示す。スケールバーは 250 μm を表す。

(B) 20% O₂、5% O₂、1% O₂ で顎下腺を培養後、0 時間後と 30 時間後の腺房数を位相差顕微鏡を用いて計測し、それぞれ 0 時間後の腺房数を 1 として標準化した (腺房数比 = 30 時間後の腺房数 / 0 時間後の腺房数)。値は平均値および標

準誤差 (S.E.M) を示す (n = 6) 。 ** $P < 0.01$ vs control、n.s.: not significant

(C) E13.5 の顎下腺を 18 時間器官培養し、さらに 20% O₂、10%O₂、5% O₂、1% O₂ で 4 時間器官培養を行った後、HIF-1 α の発現を Western blot 法により解析した。

(D) E13.5 の顎下腺を 18 時間器官培養し、さらに通常酸素濃度、低酸素濃度、極度の低酸素濃度で 4 時間器官培養を行った後、HIF-1 α 、GLUT1、VEGF の発現を Western blot 法により解析した。

(E) E13.5 の顎下腺を 18 時間器官培養し、さらに 20% O₂、5% O₂、1% O₂ で 4 時間器官培養を行った後、PCNA、Cyclin D1 の発現を Western blot 法により解析した。

(F) E13.5 の顎下腺を 18 時間器官培養し、さらに 20% O₂、5% O₂、1% O₂ で 4 時間器官培養を行った後、Cleaved-caspase3、Procaspase3、LC3B1/2 の発現を Western blot 法により解析した。

引用文献

1. Krantz, S. B. (1991) Erythropoietin, *Blood*. 77, 419-34.
2. Ke, Q. & Costa, M. (2006) Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), *Mol Pharmacol*. 70, 1469-80.
3. Semenza, G. L. (1999) Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1, *Annu Rev Cell Dev Biol*. 15, 551-78.
4. Humphrey, S. P. & Williamson, R. T. (2001) A review of saliva: normal composition, flow, and function, *J Prosthet Dent*. 85, 162-9.
5. Matsushita, T., Sakai, M., Yoshida, H., Morita, S., Hieda, Y. & Sakai, T. (2018) Grhl2 regulation of SPINT1 expression controls salivary gland development, *Biochem Biophys Res Commun*. 504, 263-269.
6. Sakai, T., Larsen, M. & Yamada, K. M. (2003) Fibronectin requirement in branching morphogenesis, *Nature*. 423, 876-81.
7. Sakai, M., Fukumoto, M., Ikai, K., Ono Minagi, H., Inagaki, S., Kogo, M. & Sakai, T. (2019) Role of the mTOR signalling pathway in salivary gland development, *FEBS J*. 286, 3701-3717.
8. Sakai, T. & Onodera, T. (2008) Embryonic organ culture, *Curr Protoc Cell Biol*. Chapter 19, Unit 19.8.
9. Sakai, M. & Sakai, T. (2022) Establishment of a Mouse Submandibular Salivary Gland Organ Culture, *Curr Protoc*. 2, e543.
10. Olson, A. L. & Pessin, J. E. (1996) Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family, *Annu Rev Nutr*. 16, 235-56.
11. Apte, R. S., Chen, D. S. & Ferrara, N. (2019) VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development, *Cell*. 176, 1248-1264.
12. Griggio, V., Vitale, C., Todaro, M., Riganti, C., Kopecka, J., Salvetti, C., Bomben, R., Bo, M. D., Magliulo, D., Rossi, D., Pozzato, G., Bonello, L., Marchetti, M., Omedè, P., Kodipad, A. A., Laurenti, L., Del Poeta, G., Mauro, F. R., Bernardi, R., Zenz, T., Gattei, V., Gaidano, G., Foà, R., Massaia, M., Boccadoro, M. & Coscia, M. (2020) HIF-1 α is over-expressed in leukemic cells from, *Haematologica*. 105, 1042-1054.
13. Degwert, N., Latuske, E., Vohwinkel, G., Stamm, H., Klokow, M., Bokemeyer, C., Fiedler, W. & Wellbrock, J. (2016) Deoxycytidine kinase is downregulated under hypoxic conditions and confers resistance against cytarabine in acute myeloid leukaemia, *Eur J Haematol*. 97, 239-44.
14. Liu, L., Zhang, H., Sun, L., Gao, Y., Jin, H., Liang, S., Wang, Y., Dong, M., Shi, Y., Li, Z. & Fan, D. (2010) ERK/MAPK activation involves hypoxia-induced MGr1-Ag/37LRP expression and contributes to apoptosis resistance in gastric cancer, *Int J Cancer*. 127, 820-9.
15. Liu, L. Z., Li, C., Chen, Q., Jing, Y., Carpenter, R., Jiang, Y., Kung, H. F., Lai, L. & Jiang, B.

- H. (2011) MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1 α expression, *PLoS One*. 6, e19139.
16. Seno, K., Tanikawa, N., Takahashi, H., Ohkuchi, A., Suzuki, H., Matsubara, S., Iwata, H., Kuwayama, T. & Shirasuna, K. (2018) Oxygen concentration modulates cellular senescence and autophagy in human trophoblast cells, *Am J Reprod Immunol*. 79, e12826.
 17. Whitehead, C. L. & Tong, S. (2014) Measuring hypoxia-induced RNA in maternal blood: a new way to identify critically hypoxic fetuses in utero?, *Expert Rev Mol Diagn*. 14, 509-11.
 18. Sakai, M., Matsushita, T., Hoshino, R., Ono, H., Ikai, K. & Sakai, T. (2017) Identification of the protective mechanisms of Lactoferrin in the irradiated salivary gland, *Sci Rep*. 7, 9753.
 19. Wenger, R. H., Stiehl, D. P. & Camenisch, G. (2005) Integration of oxygen signaling at the consensus HRE, *Sci STKE*. 2005, re12.
 20. Boucherat, O., Nadeau, V., Bérubé-Simard, F. A., Charron, J. & Jeannotte, L. (2015) Crucial requirement of ERK/MAPK signaling in respiratory tract development, *Development*. 142, 3801.
 21. Kim, J. M., Yang, Y. S., Park, K. H., Oh, H., Greenblatt, M. B. & Shim, J. H. (2019) The ERK MAPK Pathway Is Essential for Skeletal Development and Homeostasis, *Int J Mol Sci*. 20.
 22. Richardson, E. T., Shukla, S., Nagy, N., Boom, W. H., Beck, R. C., Zhou, L., Landreth, G. E. & Harding, C. V. (2015) ERK Signaling Is Essential for Macrophage Development, *PLoS One*. 10, e0140064.
 23. Mazure, N. M. & Pouyssegur, J. (2010) Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival?, *Curr Opin Cell Biol*. 22, 177-80.
 24. Kim, J. Y., Kim, Y. J., Lee, S. & Park, J. H. (2009) The critical role of ERK in death resistance and invasiveness of hypoxia-selected glioblastoma cells, *BMC Cancer*. 9, 27.
 25. Dong, Z., Venkatachalam, M. A., Wang, J., Patel, Y., Saikumar, P., Semenza, G. L., Force, T. & Nishiyama, J. (2001) Up-regulation of apoptosis inhibitory protein IAP-2 by hypoxia. Hif-1-independent mechanisms, *J Biol Chem*. 276, 18702-9.
 26. Piret, J. P., Mottet, D., Raes, M. & Michiels, C. (2002) Is HIF-1 α a pro- or an anti-apoptotic protein?, *Biochem Pharmacol*. 64, 889-92.
 27. Sun, Y., Liu, W. Z., Liu, T., Feng, X., Yang, N. & Zhou, H. F. (2015) Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis, *J Recept Signal Transduct Res*. 35, 600-4.

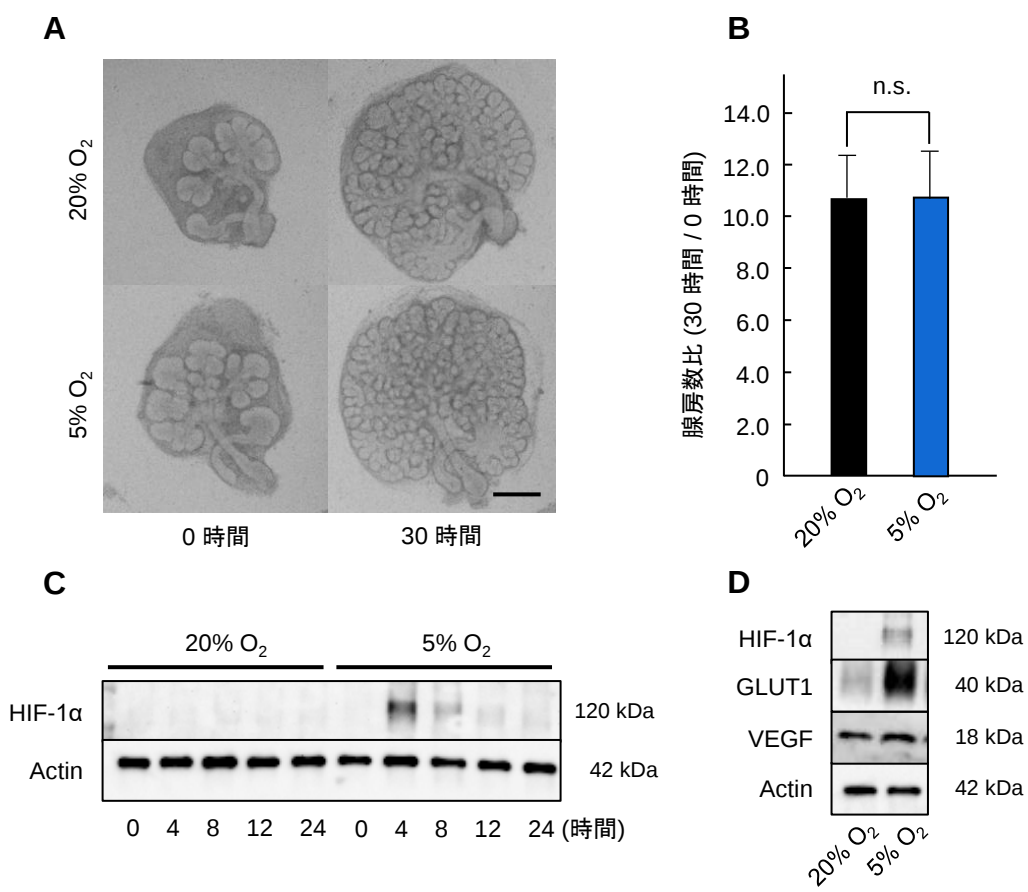
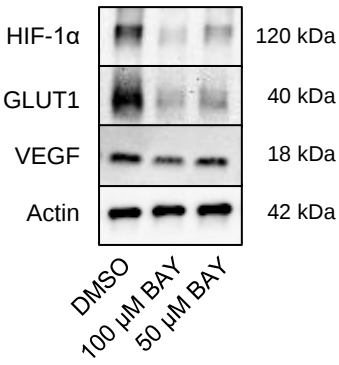
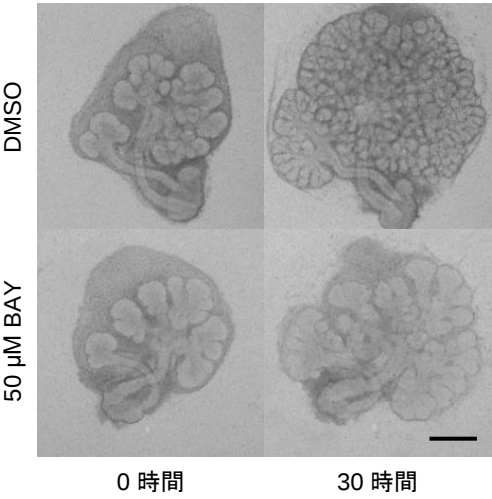


図 1

A



B



C

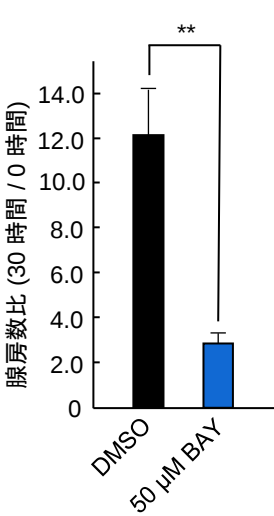


図 2

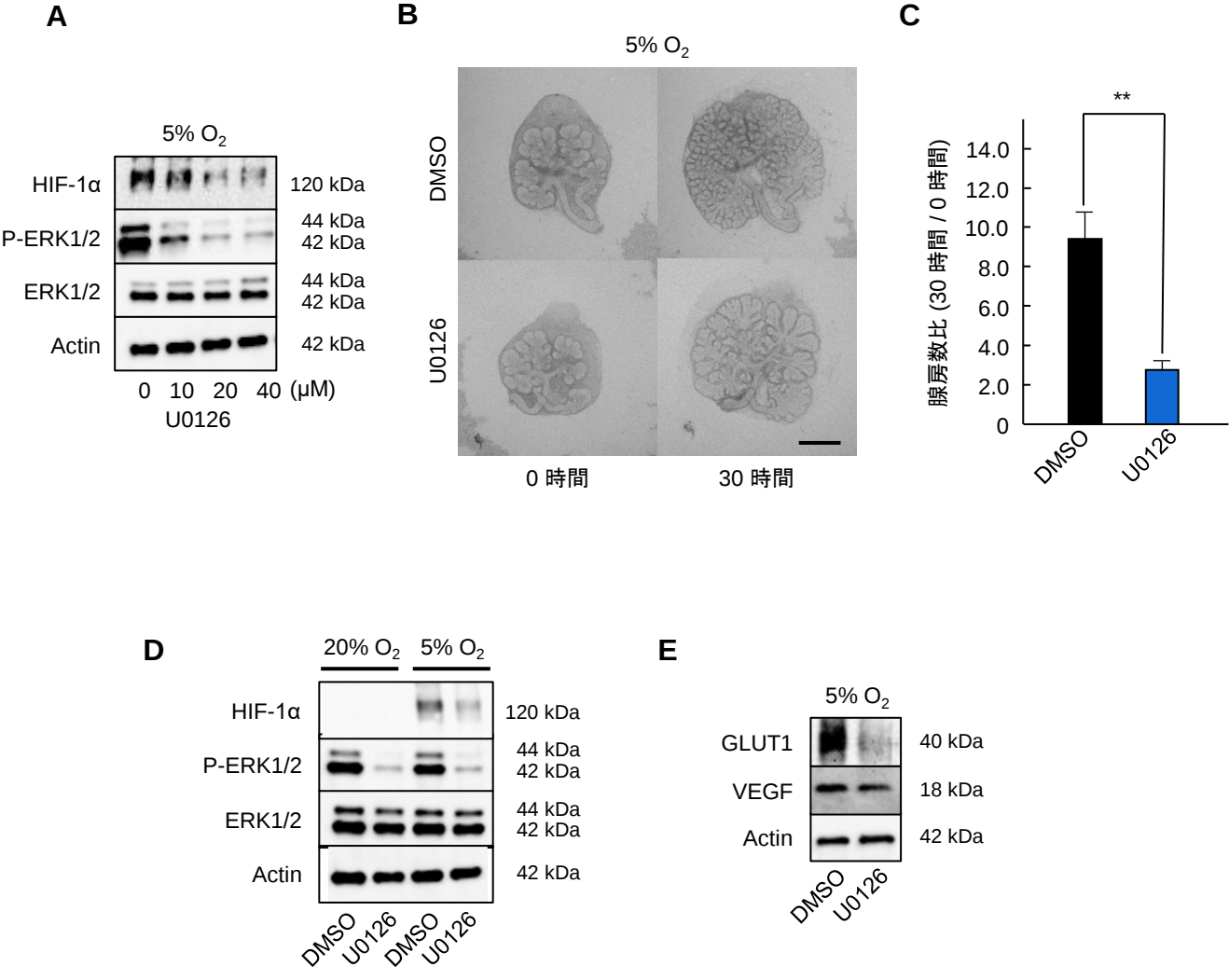


図 3

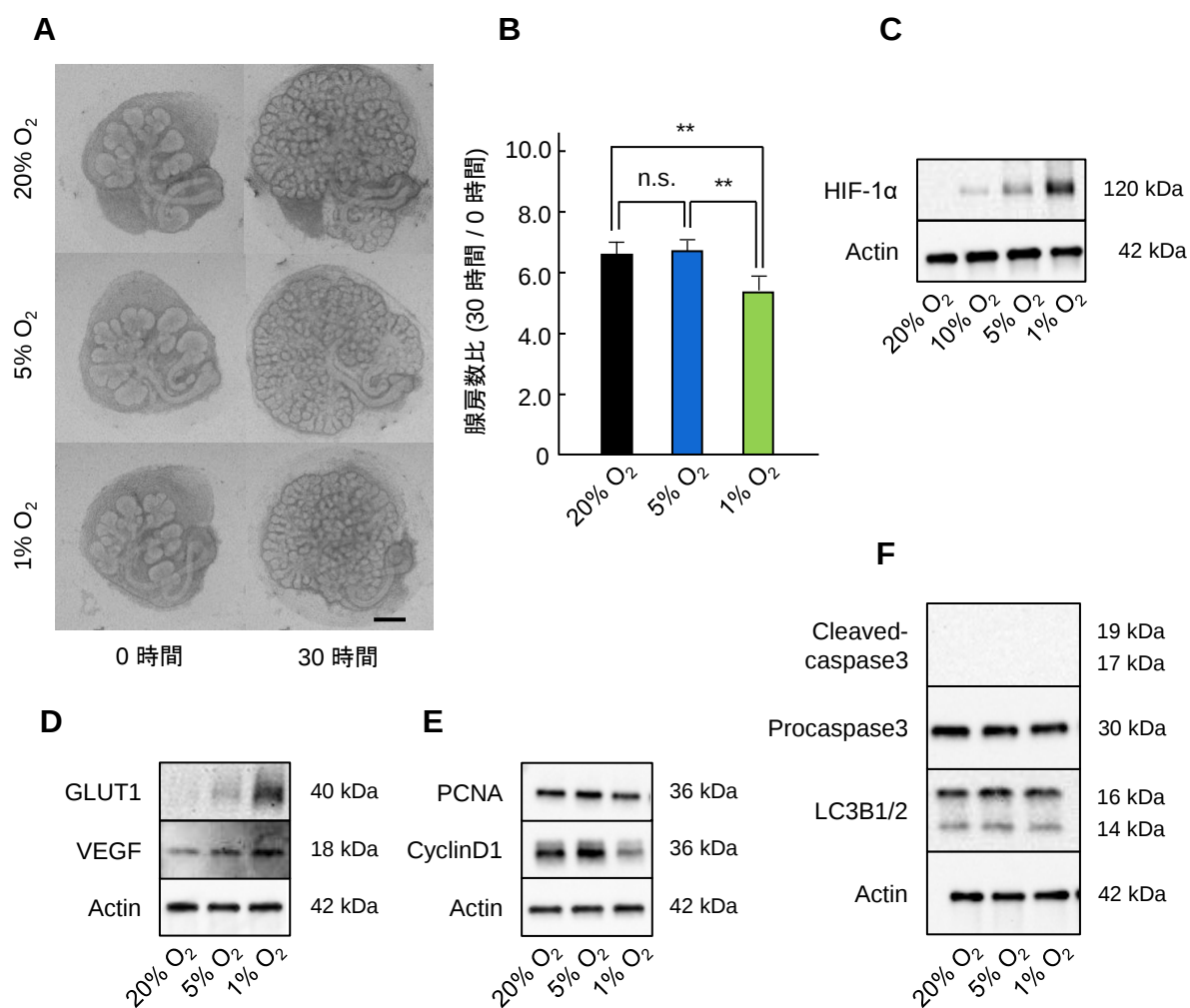


図 4