

## 顎下腺形態形成における上皮-間葉相互作用の分子メカニズム

柏 俣 正 典  
朝日大学歯学部歯科薬理学講座

### 1. はじめに

唾液腺発生に関する研究は比較的早く、1950年にイタリア人医師のElio Borgheseが胎仔マウス唾液腺の観察をはじめに行っている。Borgheseは、顎下腺と舌下腺の発生過程を詳細に記録しているほか、顎下腺の器官培養を試みるなどの多大な業績を残している<sup>1,2)</sup>。マウス顎下腺原基の発生は、胎生12日目に間葉細胞に落ち込んだ上皮の細胞集団からはじまる。その後、落ち込んだ上皮先端が二方向に分割・伸長し、その先端がさらに分割することで、まるで木の枝が発達するようにダクトシステムが形成されるのである。このような発達様式を分枝形態形成 (branching morphogenesis) と呼んでいる (図1)。分枝形態形成は唾液腺をはじめ膵臓、乳腺、前立腺などの全ての外分泌腺のほか、腎臓や肝臓に存在する一部の組織や肺などの発生過程でも認められている重要な発達様式である。

顎下腺の分枝形態形成は、無血清培地中で器官培養した場合でも観察できることや顎下腺原基から間葉を取り除いて培養すると腺上皮の発達は完全に停止してしまうことなどから<sup>3)</sup>、上皮-間葉相互作用によって制御されていると考えられる。上皮-間葉相互作用は、唾

液腺などの外分泌腺だけではなく、歯胚、毛根、肺、神経系および腎臓などの発生過程に共通する機構である。したがって、これらの分子メカニズムを解明することが器官形成研究の1つの要であると考えられる。

一方、顎下腺は分枝形態形成の進行とともに細胞分化も同時に進行して発達する。胎生15日目以降の顎下腺では、管腔や導管の形成が認められるほか、導管周囲の細胞に分泌顆粒が認められるようになり、細胞分化は著しさを増してくる<sup>4)</sup>。このように顎下腺の発生は、多くの細胞の分化と増殖が秩序的・階層的に進行している総合的な生体反応によって成り立っていると考えられる。したがって、これらの生体反応の制御機構を解明し、それぞれの機構が導き出す現象を厳密に規定することによって、上皮-間葉相互作用、すなわち器官形成メカニズムを解明できるはずである。われわれはこの考えに基づいて研究を進めており、上皮と間葉の境界面に出現しているタンパク質、とくに、器官形成に重要な役割を果たすと考えられている細胞成長因子と細胞接着因子の機能について解析している。

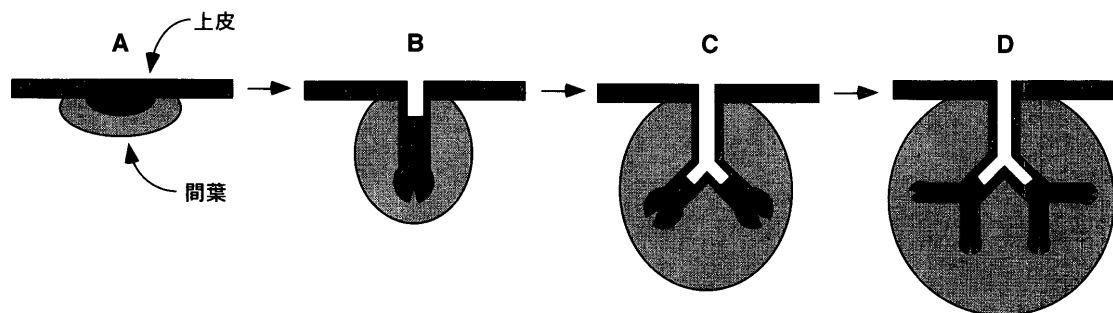


図1. 分枝形態形成 (branching morphogenesis) の模式図

A. 上皮細胞が間葉に向かって増殖し集団を形成する。B. 上皮がさらに間葉に向けて伸長し上皮の先端が二方向に分かれはじめる。また、上皮表層部が上皮に向けて落ち込みはじめ管腔ができる。C. 分かれた上皮が伸長し先端が再び分かれる。D. 分かれた先端がさらに伸長し先端が分かれる。

### 2. 分枝形態形成と上皮成長因子 (EGF) およびその受容体 (ErbB)

EGF受容体は多くの胎児組織から検出されること  
(平成14年1月12日 受理)

から、EGFは器官形成過程において何らかの役割を果たしていると考えられてきた。事実、EGFは、肺<sup>5)</sup>、腎臓<sup>6)</sup>、歯胚<sup>7)</sup>などの多くの胎児器官の発達を促進させる。

また、無血清培地で器官培養された顎下腺にEGFを作用させると腺の分枝形成が促進することが報告されていることから<sup>8)</sup>、EGFは顎下腺の発生過程に重要な役割を果たしていると考えられている。われわれは、EGF受容体に結合することが知られているtransforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ )を含めた3種のタンパク質(EGF, TGF- $\alpha$ およびEGF受容体)に注目し、胎仔マウス顎下腺内のそれぞれのmRNAをRNase protection assayにより定量し、加齢にともなう変動について報告した<sup>9)</sup>。その結果、EGF受容体は顎下腺発生の初期の段階ですでに多く発現しており、発育にともなうゆるやかに増加していくこと、EGFおよびTGF- $\alpha$ は発生初期に高濃度の発現は認められないが、その後、EGFは発達に伴って急激に増加すること、TGF- $\alpha$ は胎生16日に若干の増加が見られるが発達の全体を通して低値であることを明らかにしている。このように胎仔顎下腺にはEGF受容体だけでなくリガンドとなるEGF自身も存在していることから、顎下腺の分枝形態形成は、少なくともその一部が、EGFにより制御されていると考えられた。

EGFのcDNA解析の結果から、EGFは巨大な前駆タンパク質として生合成されることが明らかにされている<sup>9)</sup>。EGFの前駆タンパク質は、分子内に膜貫通ドメインを持った細胞膜タンパク質(1,217アミノ酸)であり、プロセシング酵素によりプロセシングを受け低分子化(53アミノ酸)される。しかし、プロセシング酵素が存在しない細胞ではリガンドは膜タンパク質のまま機能すると考えられる<sup>10)</sup>。胎生期の顎下腺にはEGFのプロセシング酵素の存在は知られておらず、EGFは膜タンパク質として存在する可能性がある。われわれは、<sup>35</sup>S-methionineで代謝ラベルした胎生18日の顎下腺ホモジ

ネート中のEGFを免疫沈降法により解析し、高分子量のEGF(135kD)が存在していることを確認している。細胞膜上のEGFは、膜の外側にEGFドメインを有していることや膜型EGFも低分子EGFと同じように生物活性を有することから、EGFは隣接した細胞のEGF受容体と結合することで、細胞間の接触を感知する分子あるいは細胞の接着に関与する分子として機能している可能性もある<sup>11)</sup>。

さらに、近年、EGFおよびEGF受容体にはそれぞれ類似の構造をもったファミリー分子が存在していることが明らかになった。リガンドであるEGFには少なくとも10種類の分子が、またEGF受容体には少なくとも4種類の分子(ErbBファミリー; ErbB1~4)が存在している。EGFファミリーの10種類のペプチドは、その生物学的特徴からつぎの4グループに分類されている。EGF, TGF- $\alpha$ およびamphiregulin (AR)はErbB1に親和性を示すリガンドファミリーであり、betacellulin (BTC), heparin binding (HB)-EGFおよびepiregulin (EPR)はErbB1とErbB4の両受容体に親和性を示すリガンドである。また、neuregulin (NRG)-1とNRG-2はErbB3とErbB4に、NRG-3とNRG-4はErbB4に親和性を示すリガンドファミリーである。現在、ErbB2のリガンドは同定されておらず、今後新たなEGFファミリーメンバーが発見されるかも知れない。図2には、上述したEGFファミリーとErbBファミリーの関係を示した。われわれは、胎仔マウス顎下腺にはこれらの分子の多くが発現していることをRT-PCRとイムノプロット法により明らかにしており(未発表)、現在、これらのEGFファミリーおよびErbBファミリーの分子が顎下腺の器官形成に如何に関わっているかを検討している。

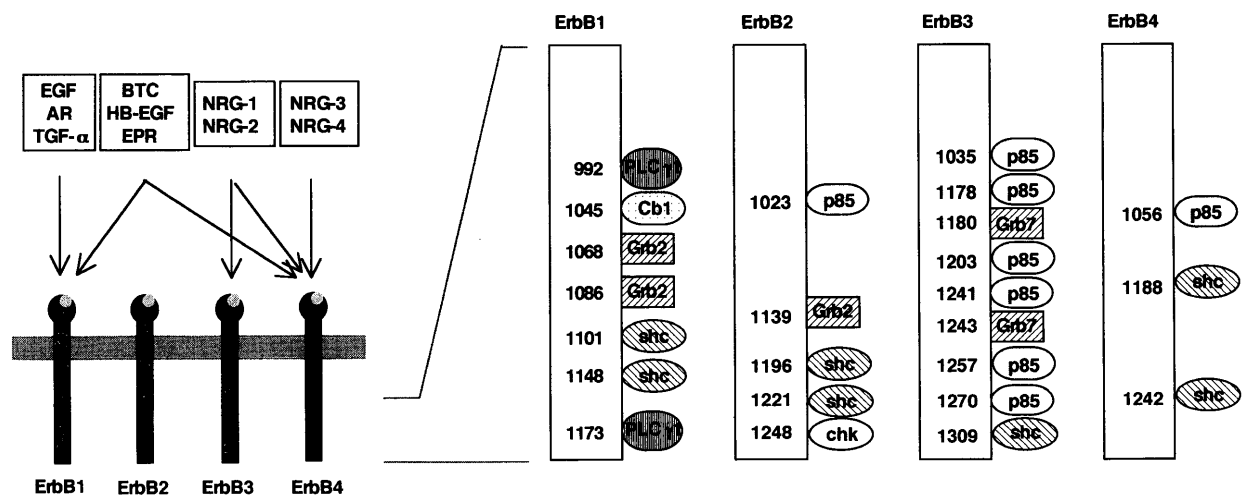


図2. EGFファミリーとErbBファミリーの関係

左図: EGFファミリーは4種のグループ(1; EGF, AR, TGF- $\alpha$ , 2; BTC, HB-EGF, EPR, 3; NRG-1, NRG-2, 4; NRG-3, NRG-4)から成る。それぞれのグループは特異なErbBと親和性を示している。ErbB2と親和性を示すリガンドは同定されていない。

右図: ErbBファミリーのリン酸化チロシン残基の位置とそれぞれに親和性を示す細胞質内タンパク質を図示した。

### 3. 分枝形態形成とインテグリン

インテグリンは細胞と細胞外基質の接着に関わる細胞膜タンパク質で、 $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖とが結合したヘテロダイマーである(図3)。現在までに数種の $\alpha$ 鎖および $\beta$ 鎖が存在することが明らかにされており、異なった $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖の組み合わせにより、リガンドとの親和性を異にする約20種類のインテグリン分子が知られている。たとえば、 $\alpha 1 \beta 1$ インテグリンは細胞外基質のラミニンおよびコラーゲンに、 $\alpha 6 \beta 4$ インテグリンはラミニンに特異的に結合する。また、インテグリンは細胞外基質との接着および脱接着を感知し細胞内にそのシグナルを発生させるほか(outside-in signal)、細胞内からのシグナルに応じて細胞外基質との結合能力を変化させている機能(inside-out signal)を有している。これらのことからインテグリンは、細胞の接着だけではなく、細胞増殖と分化、細胞移動およびアポトーシス等の多彩な生物学的現象に関与していると考えられ、器官形成をはじめ癌浸潤・転移、血管新生および損傷治癒などについての多くの研究対象となっている。

われわれは、 $\alpha 6$ インテグリンサブユニットの中和抗体を顎下腺器官培養液中に添加すると分枝形態形成が著しく抑制されることを見いだした<sup>4)</sup>。さらに、培養顎下腺にEGFを作用させることにより、インテグリン $\alpha 6$ サブユニットの生合成が促進することから、EGFの分枝形成促進作用はインテグリン( $\alpha 6$ サブユニット)を介して発揮すると考えられた。門谷らは<sup>12)</sup>、EGFが胎生顎下腺の細胞外基質の一つであるnidogenの生合成を促進されることを報告しており、EGFはインテグリン分子の合成促進および細胞外基質の合成促進の両作用によってインテグリンの活性化を促し、分枝形態形成を促進させていると考えられる。さらに、われわれは、胎仔マウス顎下腺には $\alpha 6$ サブユニットの他に $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 5$ および $\alpha 7$ サブユニットと、 $\beta 1$ 、 $\beta 4$ および $\beta 7$ サブユニットが発現していることを確認しており(未発表)、これらのインテグリン分子が唾液腺の器官形成過程で協力して作用することにより、成熟した唾液腺へと導いていると考えている。

最近、種々のインテグリンと細胞成長因子受容体が

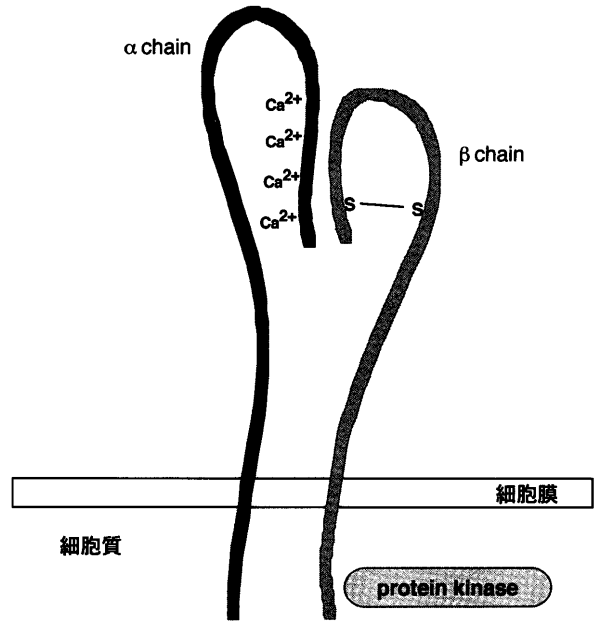


図3. インテグリン分子の構造  
 $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖から成るヘテロダイマーである。数種の $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖が存在し、それぞれの組み合わせによって認識する細胞外基質を異にしている。 $\beta$ 鎖の下流域には応答するprotein kinaseが存在することが知られている。

複合体を形成していることが報告された。NIH3T3細胞ではインテグリン $\alpha V \beta 3$ と自己リン酸化したPDGF受容体が結合していることが証明されたのに加え<sup>13)</sup>、A431細胞抽出液をEGF受容体抗体で免疫沈降するとインテグリン分子が共沈してくること<sup>14)</sup>も明らかになっている。また、インテグリンの活性化(細胞外基質との結合による細胞内情報伝達機構の活性化)が細胞成長因子受容体をモデュレーションしているとの報告もあり<sup>15)</sup>、これらの細胞膜タンパク質は互いに協力して細胞を制御していると考えられる。今後、細胞成長因子およびインテグリンが如何なる細胞内情報伝達機構を介して生物反応を引き起こしているのか、その詳細な機構を明らかにし、それぞれの情報伝達系の相互作用を解き明かしていくことが重要であると思われる。

### 4. 分枝形態形成を制御する細胞内情報伝達機構

EGF受容体からの細胞内情報を伝達する主要な経路としてmitogen-activated protein kinase(MAPK)カスケードが知られている。MAPKスーパーファミリーは多数のサブファミリーから成り、細胞外の刺激に応じてある種のMAPKが活性化することで下流の分子に情報を伝達している。EGFのように細胞増殖・分化を誘導する細胞成長因子は、extracellular responsible kinase(ERK)が、その作用を伝達する主要な経路の1つと考えられている。例えば、EGFが受容体と結合す

ると細胞膜上のEGF受容体(ErbB1)の2量体化が起こり、EGF受容体は受容体分子自身のチロシン残基をリン酸化する。リン酸化されるチロシンは細胞内のキナーゼ活性ドメイン下方の、それぞれ、992, 1045, 1068, 1086, 1148および1173番目のアミノ酸に位置している。チロシンリン酸化されたEGF受容体は細胞質内のSHドメインを有するタンパク質と親和性を示すようになり、数種のタンパク質と結合するようになる。Grb 2と呼ばれるタンパク質はリン酸化EGF受容体に親和性

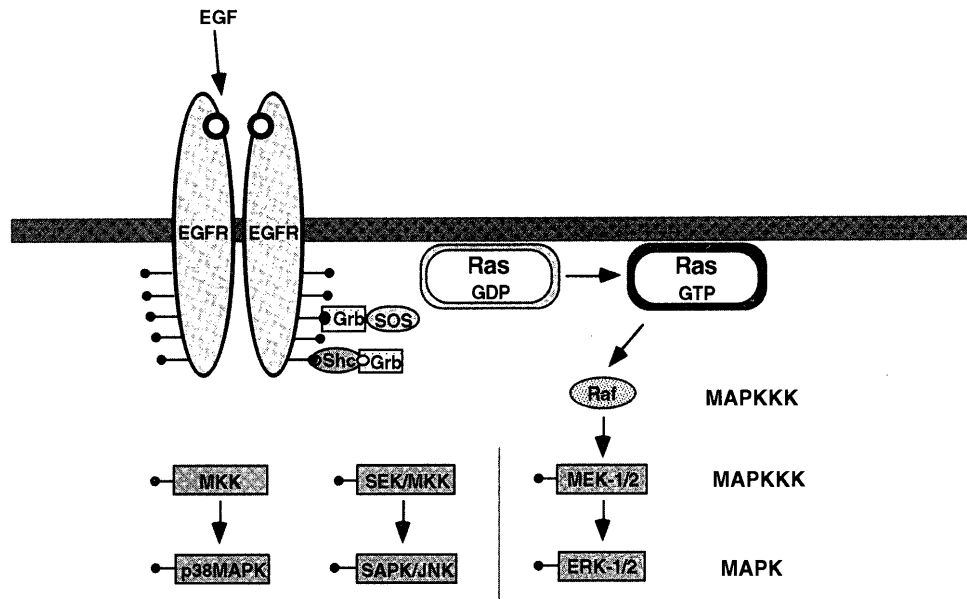


図4. MAPKカスケード

細胞膜上のEGF受容体の活性化(自己リン酸化)によりERKの活性化が誘導される。

を示す分子の一つであり、Grb2はさらにsosと、sosはGタンパク質のRasと結合して活性化がおこる。RasはMAPKキナーゼキナーゼのRafを活性化し、MEKのリン酸化反応(活性化)を経て、最終的にERK(古典的MAPK)を活性化させる。活性化されたERKは、さらに種々の転写因子等をリン酸化させ、特異的タンパク質の転写が開始される(図4)。このようにして、細胞成長因子が有する多くの生物活性を細胞自身に引き出しているのである。前述したようにEGFファミリーは、それぞれ異なった生物活性を持っており、4種類に大別されている。これらの4種は結合するErbBファミリー分子に特異性があり、結合によって自己リン酸化されるチロシンの位置およびリン酸化チロシンに親和性を示す細胞質分子が異なっている(図2)。この機構が生物活性の違いを生み出していると考えられている。

われわれは、胎仔マウス顎下腺の上皮細胞にEGF受容体(ErbB1)が存在していることを免疫組織化学的手法により明らかにした<sup>16)</sup>。そこで、EGF受容体の下流に位置するERKが、EGFの刺激により反応するの否かについて検討した。培養胎仔マウス顎下腺(胎生14、胎生16および胎生18日)にEGFを5分間または30分間作用させた。顎下腺ホモジネートを試料として、抗リン酸化ERK抗体を用いたウエスタンブロットにより、それぞれの試料中のリン酸化(活性化)ERKの出現パターンを解析した。その結果、EGFはERKのリン酸化反応を促進させたが、胎生14日の顎下腺はEGFとの5分間のインキュベーションによりERKのリン酸化が顕著に認められるのに対し、胎生16日ではリン酸化の程度は5分間と30分間のインキュベーションでほぼ同程度であり、さらに胎生18日ではERKのリン酸化応答能はやや減弱していることがわかった。すなわち、顎

下腺の発達にともない、EGFによるERKの活性化状態が変化していると考えられた。さらに、ERKのリン酸化酵素であるMEKの特異的阻害剤(PD98059)を用いて、ERKの顎下腺形成過程における役割について検討を行った。その結果、PD98059を培養液に添加した場合、胎仔顎下腺の分枝形態形成を著しく抑制することがわかった<sup>17)</sup>。したがって、ERKは分枝形態形成を促進的に制御しているシグナル伝達経路であると考えられた。上述した顎下腺の発達にともなうERKのリン酸化応答能の変化が何を意味するのかは、現在明らかではない。しかし、このリン酸化応答能の変化が胎生15日以降に急速に進行する細胞分化反応(導管管腔や分泌顆粒の形成)と関係する可能性もあると考えている。

EGF受容体により活性化をうける他の主要なシグナル伝達系として、phospholipase C $\gamma$ 1(PLC $\gamma$ 1)とphosphatidylinositol 3-kinase(PI3K)を介した経路が知られている。われわれは、両酵素が胎仔顎下腺に発現しているの否かをRT-PCRとウエスタンブロット法により解析した。その結果、PLC $\gamma$ 1は顎下腺形成の初期に発現量が多く、その後徐々に減少するが、PI3Kの発現量は発達に伴って増加していることがわかった。また、両酵素の下流で機能しているprotein kinase C(PKC)およびprotein kinase B(PKB)/Aktについて検討したところ、少なくとも8種類のPKCアイソザイム(PKC $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\lambda$ ,  $\zeta$ )とPKB/Aktが発現していることがわかった。これらのシグナル伝達系もまた顎下腺の発生を制御していることが示唆されることから、われわれは、顎下腺発生におけるこれらの細胞内情報伝達関連タンパク質の機能について詳細に検討している。

## 5. おわりに

器官形成過程に重要な役割を果たしていると考えられてきた上皮-間葉相互作用の分子機構が徐々に解明されている。おそらく今後十数年の間に器官形成機構の謎が解き明かされると思われる。細胞成長因子や細胞接着因子がこの機構に深く関わっていることは間違いのないことであり、これらの因子の発現を調節している遺伝子制御機構と併せて解明されるはずである。

現在、再生治療を可能にすべく歯科を含めた医科領域で研究が行われている。器官発生メカニズムを分子レベルで究明することは再生医学の基礎を築くために必須であり、個々の分子がそれぞれの器官発生におい

て如何なる役割を果たしているのかを特定する必要がある。ヒトや実験動物のゲノム解析が進み、誰もがこれらの情報を得られるようになった。また、培養技術や分子生物学技術が一般化し、複数の細胞や器官を扱って細胞間相互作用を理解することは、以前よりも容易になってきている。

われわれは、胎仔マウス顎下腺が上皮-間葉相互作用の分子メカニズムを究明するための優れた実験モデルであると考えており、この研究がさらに発展し器官形成機構の謎が解明されることを強く望んでいる。

## 引用文献

- 1) Borghese, E. : The development in vitro of the sub-mandibular and sub-lingual glands of *Mus Musculus*. *J. Anat.*, **84** : 287~302, 1950.
- 2) Borghese, E. : Explantation experiments on the influence of the connective tissue capsule on the development of the epithelial part of the submandibular gland of *Mus musculus*. *J. Anat.*, **84** : 303~318, 1950.
- 3) Takahashi, Y. and Nogawa, H. : Branching morphogenesis of mouse salivary epithelium in basement membrane-like substratum separated from mesenchyme by the membrane filter. *Development*, **111** : 327~335, 1991.
- 4) Kashimata, M. and Gresik, WE. : Epidermal growth factor system is a physiological regulator of development of the mouse fetal submandibular gland and regulates expression of the  $\alpha 6$ -integrin subunit. *Dev. Dyn.*, **208** : 149~161, 1997.
- 5) Warburton, D., Seth, R., Shum, L., Horcher, P., Hall, F., Werb, Z., and Slavkin, H. : Epigenetic role of epidermal growth factor expression and signaling in embryonic mouse lung morphogenesis. *Development Biol.*, **149** : 123~133, 1995.
- 6) Avner, E. and Sweeny, WE. : Polypeptide growth factors in metanephric growth and nephron differentiation. *Pediatr. Nephrol.*, **4** : 372~377, 1990.
- 7) Kronmiller, JE., Upholt, W., and Koller EJ. : Expression of epidermal growth factor mRNA in the developing mouse mandibular process. *Arch. Oral Biol.*, **36** : 405~410, 1991.
- 8) Nogawa, H. and Takahashi, Y. : Substitution for mesenchyme by basement-membrane-like substratum and epidermal growth factor in inducing branching morphogenesis of mouse salivary epithelium. *Development*, **112** : 855~861, 1991.
- 9) Gray, A., Dull, TJ., and Ullrich, A. : Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128,000-molecular weight protein precursor. *Nature*, **303** : 722~725, 1983.
- 10) Rall, LB., Scott, J., Bell, I., Crawford, RJ., Penschow, JD., Niall, HD., and Coghian, JP. : Mouse prepro-epidermal growth factor synthesis by the kidney and other tissues. *Nature*, **313** : 228~231, 1985.
- 11) Parries, G., Chen, K., Misono, KS., and Cohen, S. : The human urinary epidermal growth factor (EGF) precursor : isolation of a biologically active 160-kilodalton heparin-binding pro-EGF with a truncated carboxyl terminus. *J. Biol. Chem.*, **270** : 27954~27960, 1995.
- 12) Kadoya, Y., Salmivirta, K., Talts, JF., Kadoya, K., Mayer, U., Timpl, R., and Ekblom, P. : Importance of nidogen binding to laminin  $\gamma 1$  for branching epithelial morphogenesis of the submandibular gland. *Development*, **124** : 683~691, 1997.
- 13) Schneller, M., Vuori, K., and Ruoslahti, E. : AlphaVbeta3 integrin associates with activated insulin and PDGFBeta receptors and potentiates the biological activity of PDGF. *EMBO J.*, **16** : 5600~5607, 1997.
- 14) Yu, X. and Mekada, E. : インテグリンと複合体を形成する増殖因子レセプター. *細胞工学*, **18** : 1148~1154, 1999.
- 15) Renshaw, MW., Ren, XD., and Schwartz, MA. : Growth factor activation of MAP kinase requires cell adhesion. *EMBO J.*, **16** : 5592~5599, 1997.
- 16) Gresik, WE., Kashimata, M., Kadoya, Y., Mathews, R., Minami, N., and Yamashina, S. : Expression of epidermal growth factor receptor in fetal mouse submandibular gland detected by a biotinyltyramide-based catalyzed signal amplification method. *J. Histochem. Cytochem.*, **45** : 1651~1657, 1997.
- 17) Kashimata, M., Sayeed, S., Ka, A., Onetti-Muda, A., Sakagami, H., Faraggiana, T., and Gresik, WE. (1999) : The ERK-1/2 signaling pathway is involved in the stimulation of branching morphogenesis of fetal mouse submandibular glands by EGF. *Development Biol.*, **220** : 183~196, 2000.

## Molecular Mechanisms of Epithelio-mesenchymal Interactions in Morphogenesis of Fetal Mouse Submandibular Gland

MASANORI KASHIMATA

Department of Dental Pharmacology, Asahi University School of Dentistry

**Key words :** Epithelio-mesenchymal interaction, EGF, Integrin, Signaling cascade, Submandibular gland

**Abstract** Epithelio-mesenchymal interactions regulate fetal development and differentiation of many organs. The submandibular gland (SMG) of fetal mouse is a fruitful model for the study of mechanisms of the epithelio-mesenchymal interactions. The SMG begins development on day 12 gestation of oral epithelium into underlying mesenchyme, and continues to grow by repeated dichotomous branching of the distal ends of its epithelial buds ; this process is called branching morphogenesis. There is considerable evidence that a variety of growth factors and cell adhesion molecules operate during development and differentiation of fetal tissues, including the epidermal growth factor (EGF) and integrins. We have reported that EGF stimulate branching morphogenesis of fetal SMG, and the mRNAs for EGF, transforming growth factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) and EGF receptor (EGFR), and their proteins are expressed in the SMG throughout late fetal development. Recently, we showed that the activated EGFR triggers the RAS/MEK/ERK signaling cascade in the fetal SMG, and that there is age-dependent variation in this pathway. An inhibitor (PD98059) for enzymatic activity of MEK significantly inhibit the branching morphogenesis. These results imply that the ERK signaling is responsible, at least in a part, for the stimulatory effect of EGF on branching morphogenesis of fetal mouse SMG. Moreover, we have also confirmed that other signaling pathways through some specific enzymes such as phospholipase C $\gamma$ 1, phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase C (PKC) and protein kinase B/Akt are expressed in developing fetal SMG. Many studies have demonstrated that the epithelial branching depends both on the mesenchyme and the epithelial basement membrane. Such epithelio-mesenchymal interactions most probably involve interaction of integrins with their ligands in the extracellular matrix. We also reported that a monoclonal antibody against  $\alpha$ 6 integrin subunit significantly inhibit the branching morphogenesis, and EGF stimulates synthesis of integrin  $\alpha$ 6 subunit in developmental SMG. These finding suggested that the function of EGF system to stimulate branching morphogenesis regulates, in a part, expression of  $\alpha$ 6 integrin subunit by the epithelial cells of the gland rudiment. Since both integrin ( $\alpha$ 6 subunit) and growth factor (EGF) support the gland development (branching morphogenesis), further study is necessary to analyze, in detail, the signaling cascades and their cross-talking systems stimulated by both membrane receptors for understanding the mechanisms of normal organogenesis and epithelio-mesenchymal interactions.