

原 著

胎仔マウス顎下腺の分枝形態形成における integrin $\alpha 5$ サブユニットの役割

赤 井 崇 浩¹⁾ 式 守 道 夫¹⁾ 住 友 伸 一 郎¹⁾ 柏 俣 正 典²⁾

Role of integrin $\alpha 5$ subunit in branching morphogenesis in fetal mouse submandibular glands

AKAI TAKAHIRO¹⁾, SHIKIMORI MICHIO¹⁾, SUMITOMO SHINICHIRO¹⁾, KASHIMATA MASANORI²⁾

マウス顎下腺は胎生11日目(E11)に舌の基部に位置する上皮細胞と、神経堤細胞由来の間葉細胞の相互作用によって上皮組織が肥厚し、間葉側へ陥入することから発生する。その後、上皮の先端は分枝と伸長を繰り返して、外分泌腺特有の枝分かれ構造を形成していく。この現象は分枝形態形成とよばれており、重要な器官形成機構の一つとしてよく知られている。Integrin は細胞外の情報を細胞内へ伝達 ('outside-in' signal) するほか、細胞内の情報を細胞外へ伝達 ('inside-out' signal) することで細胞の接着、分化、増殖、移動およびアポトーシスに関わることから上皮間葉相互作用を制御する因子と考えられている。本研究では、顎下腺の分枝形態形成における integrin $\alpha 5$ の役割について検討を行った。すでに顎下腺原基に発現していることが知られている各種インテグリンサブユニット ($\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$ および $\beta 4$ サブユニット) の mRNA をリアルタイム RT-PCR により定量解析した結果、顎下腺発生の初期 (E13-E14) に $\alpha 5$ サブユニットの発現が高いことが分かった。他のインテグリンサブユニットでは $\beta 1$ が初期で高値を示した。培養顎下腺原基に抗 integrin $\alpha 5$ 抗体を添加すると $5\mu\text{g/ml}$ の濃度以上で濃度依存的に分枝形態形成が抑制された。高濃度の抗 integrin $\alpha 5$ 抗体 ($20\mu\text{g/ml}$) では顎下腺原基の分枝形態形成はほぼ完全に抑制された。顎下腺上皮のみの培養系を用いた解析から、抗 integrin $\alpha 5$ 抗体 ($10\mu\text{g/ml}$) は EGF が誘導する cleft 形成と FGF10 が誘導する elongation を共に抑制した。抑制の程度は cleft 形成で約20%、elongation 形成で50%であった。また、抗 integrin $\alpha 5$ 抗体の添加により、FGF10で惹起される E13顎下腺原基の ERK1/2 のリン酸化の亢進が抑制された。

以上の結果から、integrin $\alpha 5$ サブユニットは発生の初期段階で分枝形態形成に関わることが示唆された。また、integrin $\alpha 5$ サブユニットは分枝形態形成を構成する cleft 形成と elongation に共に関与しており、elongation には ERK1/2 経路の活性化を介していると考えられた。

キーワード：分枝形態形成、インテグリン、細胞成長因子、情報伝達

Branching morphogenesis (BrM) is a developmental process by which many organs, such as the lungs, kidneys, and all exocrine glands, including the salivary glands, are formed. BrM is a dramatic biological event regulated by epithelial-mesenchymal interactions. The fundamental process of epithelial-mesenchymal interactions depends both on a variety of growth factors and their receptors and on the extracellular matrix (ECM) and integrins. The mouse submandibular gland (SMG) is a well-characterized model system for the study of epithelial-mesenchymal interactions involved in fetal organogenesis both in vivo and in vitro. There are several reports describing the molecular mechanisms of the BrM of SMG rudiments. For example, BrM requires both the mesenchyme and the epithelial basement membrane, and these components involve the interactions of both several integrins and their ligands in the ECM. In this study, we demonstrated the role of the integrin $\alpha 5$ subunit in the BrM of developing mouse SMG. The BrM of cultured E13

¹⁾ 朝日大学歯学部口腔病態医療学講座口腔外科学分野

²⁾ 朝日大学歯学部口腔感染医療学講座歯科薬理学分野
〒501-0296 岐阜県瑞穂市穂積1851番地1

¹⁾ Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Division of Oral Pathogenesis and Disease Control

²⁾ Department of Dental Pharmacology, Division of Oral Infections and Health, Asahi University School of Dentistry
1851-1 Hozumi, Mizuho city, 501-0296 Gifu
(平成30年3月9日受理)

SMG was dose-dependently suppressed by administration of a blocking antibody for the integrin $\alpha 5$ subunit. The suppression of epithelial morphogenesis of SMG rudiments was also shown in mesenchyme-free epithelial culture system. These results suggest that the integrin $\alpha 5$ plays a critical role in the branching morphogenesis of fetal mouse SMG.

Key words : branching morphogenesis, integrin, cell growth factor, signal transduction

緒 言

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では間葉細胞に落ち込んだ上皮の細胞集団が二方向に分割した後、伸長してその先端がさらに分割する現象、すなわち分枝形態形成 (branching morphogenesis) によって、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¹⁾。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、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²⁾。近年、急速に上皮-間葉相互作用の分子機構が解明されつつあり、細胞成長因子や細胞接着因子は分枝形態形成の調節因子として多くの研究者に認識されている³⁾。

胎仔マウス顎下腺の形態形成に影響を及ぼす細胞成長因子として epidermal growth factor (EGF)^{4,5)} や fibroblast growth factor (FGF)^{6,7)} などが知られている。これらの細胞成長因子は細胞膜上のチロシンキナーゼ型受容体と結合して細胞の増殖、分化および移動などの反応を惹起させる。細胞成長因子が受容体と結合すると受容体分子内のチロシンキナーゼが活性化され、受容体自身がリン酸化される (自己リン酸化)⁸⁾。自己リン酸化された受容体分子のチロシン残基にはその後、Grb や Sos とよばれるアダプタータンパク質が結合して下流の情報伝達系が活性化される⁹⁾。Mitogen activated protein kinase (MAPK) カスケードは細胞成長因子受容体の下流で活性化される主要なシグナル伝達経路として理解されている。MAPK カスケードは extra cellular regulated protein kinase1/2 (ERK1/2)、c-Jun N-terminal kinase および p38MAPK の3種類からなるスーパーファミリーが存在している¹⁰⁾。

一方、細胞接着因子の integrin は細胞膜上に存在して細胞と細胞外基質との接着に関わるタンパク質である¹¹⁾。 α 鎖と β 鎖の2種類のサブユニットからなるヘテロダイマーの構造をしている。現在までに数種の α 鎖および β 鎖が存在することが明らかにされており、異なっ

た α 鎖と β 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 integrin 分子が知られている¹²⁾。

Integrin は細胞外基質と結合すると細胞膜上で集まり、アクチンフィラメントのアセンブリを形成し、細胞骨格やシグナリングコンプレックスを形成する。また、integrin 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) を有していることにより、さまざまな生物学的現象に関与していると考えられている¹³⁾。

発生期の顎下腺原基には integrin $\alpha 6$ サブユニットが発現しており¹⁴⁾、培養顎下腺原基に anti-integrin $\alpha 6$ を作用させると分枝形態形成が抑制されることが報告されている⁵⁾。さらに、Koyama ら¹⁵⁾ は anti-integrin $\alpha 6$ が顎下腺上皮の分枝 (cleft) 形成を強く阻害していることを見出している。また、種々の integrin と細胞成長因子受容体が複合体を形成することが報告された¹⁶⁾。例えば NIH3T3 細胞では integrin $\alpha V\beta 3$ と自己リン酸化した platelet derived growth factor (PDGF) 受容体が結合していることが証明されたのに加え¹⁷⁾、A431 細胞抽出液を EGF 受容体抗体で免疫沈降すると integrin 分子が共沈してくることも明らかになっている¹⁸⁾。さらに、integrin の活性化が細胞成長因子受容体の機能を修飾しているとの報告もあり^{19,20)}、細胞膜に存在する両タンパク質が相互作用することによって細胞の機能を調節していると考えられる。

本研究では integrin $\alpha 5$ が胎生顎下腺原基の分枝形態形成にどのような役割を果たしているのかを明らかにするため検討を行った。

材料および方法

1. 試薬および抗体

Anti-integrin $\alpha 5$ (rat anti-mouse CD49e, コスモバイオ, 東京) を用いた。正常 rat IgG は R&D Systems Inc. (Minneapolis, USA) より購入した。Anti β -actin, anti total-ERK1/2 および anti phospho-ERK1/2 は Cell Signaling Technology (Danvers, USA) のものを用いた。EGF と FGF10 は R&D System Inc. (USA) のものを使用した。

2. 顎下腺原基の摘出

ICR 系妊娠マウス（日本 SLC, 浜松）を KN 式炭酸ガス安楽死装置（夏目製作所, 東京）で安楽死させて子宮を取り出した。子宮は直ちに α -MEM（和光純薬工業, 大阪）を含むシャーレに移して子宮から胎仔を分離した。顎下腺原基は実体顕微鏡下（島津製作所, 京都）で胎仔マウスから摘出した。なお、本研究の動物実験は朝日大学動物実験専門委員会の承認を得て実施した（承認番号：2015-13）。

3. 顎下腺原基の器官培養

摘出した顎下腺原基は、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)/F-12 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) に 100 units/ml ペニシリン (Sigma, St Louis, USA), 100 μ g/ml ストレプトマイシン (Sigma), 50 μ g/ml トランスフェリン (Sigma) および 150 μ g/ml ビタミン C (Sigma) を添加した培養液 350 μ l に浮かべたフィルター (Nuclepore membrane, 0.1 μ m pore size; GE healthcare UK LTD, Amersham, UK) 上で培養した。

培養顎下腺原基の分子形態形成に及ぼす anti-integrin $\alpha 5$ の影響は matched pair 法によって観察した。すなわち、E13 の顎下腺原基一対から得られる一方の顎下腺原基は anti-integrin $\alpha 5$ (0, 10 および 20 μ g/ml) 含有の培養液上の膜に、もう一方の顎下腺原基は対照群として正常 rat IgG (0, 10 および 20 μ g/ml) 含有の培養液上の膜に静置して培養を行った。一定時間の培養後、顎下腺原基の形態を写真に記録（オリパス, 東京）して分葉 (bud) 数を計測し、比較した。

4. 顎下腺上皮の培養

E13 マウスから分離した顎下腺原基を 500 unit/ml ディスパーゼ（エーディア, 東京）で 12 時間インキュベートした。処理後、Hank's balanced salt solution (HBSS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) で洗浄した後、実体顕微鏡（島津製作所, 京都）下で 1 μ g/ml bovine serum albumin-fraction V (Sigma, St Louis, USA) 含有の HBSS 中で 26G 注射針により上皮と間葉を分離した。

分離した上皮は、100 units/ml ペニシリン (Sigma), 100 μ g/ml ストレプトマイシン (Sigma), 50 μ g/ml トランスフェリン (Sigma) および 150 μ g/ml ビタミン C (Sigma) を含有した DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) に浮かべた Nuclepore フィルター上に静置し、さらにマトリゲルで覆って培養を行った。この際、培養液に EGF (R & D) 20 ng/ml^[21], FGF10 (R & D) 500 ng/ml^[15] を添加して

培養を行い、cleft 形成あるいは伸長反応 (elongation 形成) を誘導させた。上皮の形態変化は処理後 0, 24 および 48 時間に写真に撮影して記録した。Cleft 形成は培養後の bud 数により、elongation 形成は唾液腺上皮の伸長距離の総和として評価した。

5. リアルタイム RT-PCR 法による mRNA の発現量の解析

E13-E18, 新生仔 (NB) および生後 7 日齢 (P7) マウスの顎下腺から Tissue Total RNA Mini Kit (Favorgen Biotech Corporation, Nongke, China) を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA は Nano Drop 2000C (Thermo Fisher Scientific) を用いて濃度と純度の測定を行い、SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Thermo Fisher Scientific) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。

Integrin $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$ および $\beta 4$ サブユニットの mRNA は、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (タカラバイオ, 草津) を用い、 $\Delta\Delta$ CT 法によるリアルタイム RT-PCR により相対定量を行った。反応条件は初期変性 95°C 30 秒を行った後、熱変性 95°C 5 秒、アニーリングと伸長反応 30 秒を 40 サイクルとした。また、プライマーはタカラバイオより入手した。プライマー配列は表 1 に示した。

6. Western blot 分析

E13 顎下腺原基を取り出し、上述したように DMEM/F12 培養液に浮かべた Nuclepore 膜上で器官培養を行った。培養液中に anti-integrin $\alpha 5$ あるいは正常 rat IgG を 10 μ g/ml 添加して 24 時間培養を行った。その後、一方の群には EGF (20 ng/ml), 他方の群には FGF10 (500 ng/ml) を加えて 0, 10, 30 および 60 分間の刺激を行った。その後、顎下腺原基を回収して 1 mM sodium orthovanadate (Sigma) 含有の phosphate buffered saline (PBS) で 3 回洗浄し、1 mM sodium orthovanadate と 1 mM PMSF 含有の cell lysis buffer (Cell Signaling Technology) を用いてホモジネートを作製して上清を回収した。

上澄のタンパク質量は BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量し、5 μ g のタンパク質を 10% の濃度のゲルの SDS-PAGE によって電気泳動により分析した。泳動後、ゲル中のタンパク質をポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜に転写し、PVDF 膜に 1 次抗体を処理した後、peroxidase 結合 2 次抗体で処理した。洗浄後の PVDF 膜は ECL Western Blotting Detection Reagent (GE healthcare) で化学発光させて検出した。

Integrin $\alpha 3$:	
(F)5'-CTTTGGCATCTCTATAGCCAGCATC-3'	(R)5'-AGACTTTGCCCAAGCCCTCA-3'
Integrin $\alpha 5$:	
(F)5'-AGTCCTATCCAGTGCACCACCA-3'	(R)5'-TTGCTCCGAACCACTGCAAG-3'
Integrin $\alpha 6$:	
(F)5'-GTCACCGCTGCTGCTCAGAATA-3'	(R)5'-AGCATCAGAATCCCGGCAAG-3'
Integrin $\beta 1$:	
(F)5'-ATCATGCAGGTTGCGGTTTG-3'	(R)5'-GGTGACATTGTCCATCATTGGGTA-3'
Integrin $\beta 4$:	
(F)5'-GCAGAGCCAGCTGAGACCAA-3'	(R)5'-CAGATTCTCAATGAGCAGCATCC-3'
Rps29:	
(F)5'-CGGTCTGATCCGCAAATACG-3'	(R)5'-TCCATTCAAGGTCGCTTAGTCC-3'

表1. リアルタイム RT-PCR による mRNA の相対定量に用いたプライマー配列
(F) は forward プライマー, (R) は reverse プライマーを示す. Rps29 は内部標準として標準化に使用した遺伝子のプライマー配列である.

7. 統計解析

各解析によるデータ間の比較, 検討は Student-T 検定による両側検定を行い評価し, $p < 0.05$ の場合を有意差有りとした.

結 果

1. 各種 *integrin* の発現パターン

E13-E18, NB および P7 マウスの顎下腺に発現している *integrin $\alpha 3$* , *$\alpha 5$* , *$\alpha 6$* , *$\beta 1$* および *$\beta 4$* の各種サブユニットの mRNA の定量結果を図1に示した. *$\alpha 3$* サブユニットの発現は発生過程で大きな変化を示さなかった. *$\alpha 6$* と *$\beta 4$* サブユニットは E16 と E18 にそれぞれピークを有する山なりの発現パターンを示した. *$\alpha 5$* と *$\beta 1$* サブユニットは発生の初期に高値を示し, その後徐々に低下することが分かった. E13 の *integrin $\alpha 5$* の mRNA 発現量は E15~P7 間で有意差を認め ($p < 0.05$), *integrin $\beta 1$* では E13 と P7 に有意差が認められた ($p < 0.05$).

2. Anti-integrin $\alpha 5$ による顎下腺分枝形態形成の阻害

顎下腺原基の培養液に中和抗体である anti-integrin $\alpha 5$ を添加したときにみられる分枝形態形成の変化について検討した. その結果を図2に示した. 対照群と比較して $5 \mu\text{g/ml}$ の anti-integrin $\alpha 5$ 群では軽度の分枝形態形成の変化が認められたが, $10 \mu\text{g/ml}$ で 48 時間後に顎下腺原基の明確な分枝形態形成の阻害が認められた (図2A). また, $20 \mu\text{g/ml}$ の anti-integrin $\alpha 5$ では間葉が黒色に変化し, 形態変化はほとんど示さなかった (図2A).

各実験群の培養顎下腺原基の bud 数を計測した結果, 対照群と比較して実験群では $5 \mu\text{g/ml}$ の anti-integrin $\alpha 5$ で bud 数の有意差な減少が認められた ($p < 0.05$). $10 \mu\text{g/ml}$ の anti-integrin $\alpha 5$ では bud 数が

有意に減少しており ($p < 0.05$), $20 \mu\text{g/ml}$ においても有意な減少 ($p < 0.05$) が認められた. また, anti-integrin $\alpha 5$ による bud 数は用量依存的に減少していることがわかった (図2B).

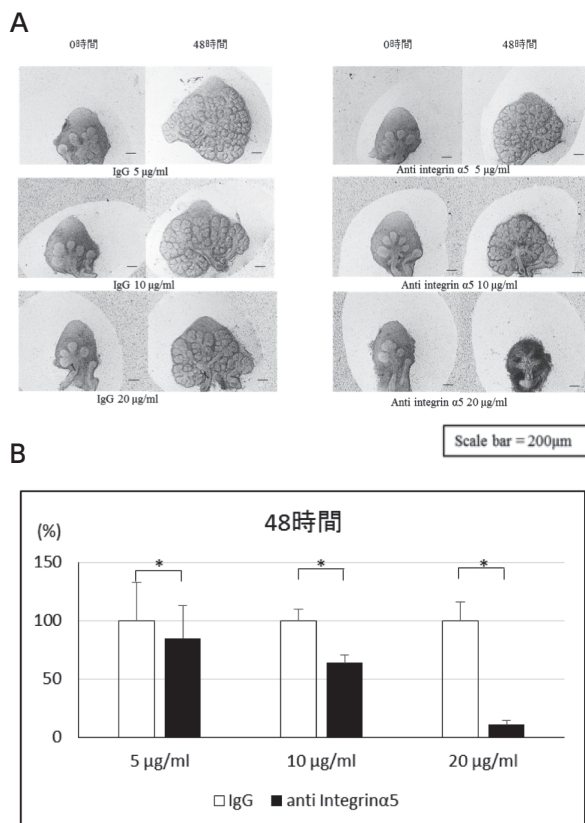


図2. 顎下腺原基の分枝形態形成におよぼす anti-integrin $\alpha 5$ の影響

A. 顎下腺原基の培養後48時間の写真 (Scale bars=20 μm)

B. 培養顎下腺原基の bud 数に及ぼす anti-integrin $\alpha 5$ の影響 (%). 顎下腺原基の培養後48時間の bud 数それぞれ正常 rat IgG(100%) と比較した. * $p < 0.05$

3. Anti-integrin $\alpha 5$ による顎下腺上皮の形態形成の阻害

細胞成長因子の EGF と FGF10 を顎下腺上皮に作用させた場合, cleft 形成と elongation 形成をそれぞれ誘導することが知られている^{4,22)}. 次に著者は顎下腺上皮におよぼす anti-integrin $\alpha 5$ の影響について検討した (図 3 A). 対照実験である正常 rat IgG を添加してさらに EGF を処理した群 (IgG + EGF) では, 顎下腺上皮は多数の cleft が形成されて bud 数が増加した. しかし, anti-integrin $\alpha 5$ を添加した場合は cleft 形成が抑制されて bud 数が減少していた (図 3 A, 図 3 B). Bud 数を計測した結果, 対照実験 (IgG+EGF) に比較して, 22.6% にまで有意に抑制されることが分かった (図 3 B).

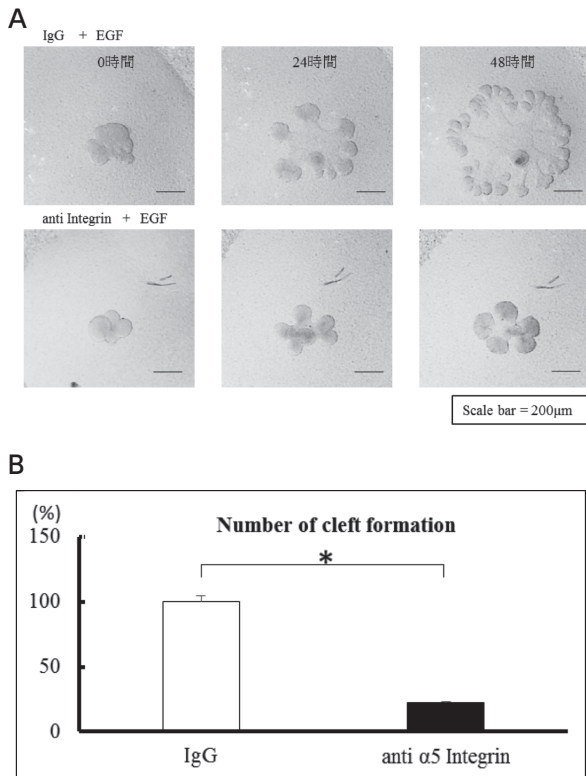


図 3. EGF によって誘導される顎下腺上皮の cleft 形成におよぼす anti-integrin $\alpha 5$ の影響

- A. マトリゲルで覆って培養した顎下腺上皮が EGF によって誘導される cleft 形成の anti-integrin $\alpha 5$ (anti-integrin $\alpha 5$ +EGF) の効果とその対照 (IgG+EGF) の写真を示した.
- B. A で撮影された顎下腺上皮の bud 数を計測して anti-integrin $\alpha 5$ (anti-integrin $\alpha 5$ +EGF) の効果をその対照 (IgG + EGF) とで比較した. * $p < 0.05$

一方, FGF10 が誘導する elongation については, 対照実験である正常 rat IgG を添加してさらに FGF10 を処理した群 (IgG+FGF10) では, 顎下腺上皮は elongation が亢進された. この elongation は anti-integrin $\alpha 5$ を添加した場合, 抑制されて伸長距離が減少していた (図 4 A と図 4 B). 総伸長距離を計測した結果, 対照実験 (IgG+FGF10) に比較して, 52.2% にまで有意に抑制されることが分かった (図 4 B).

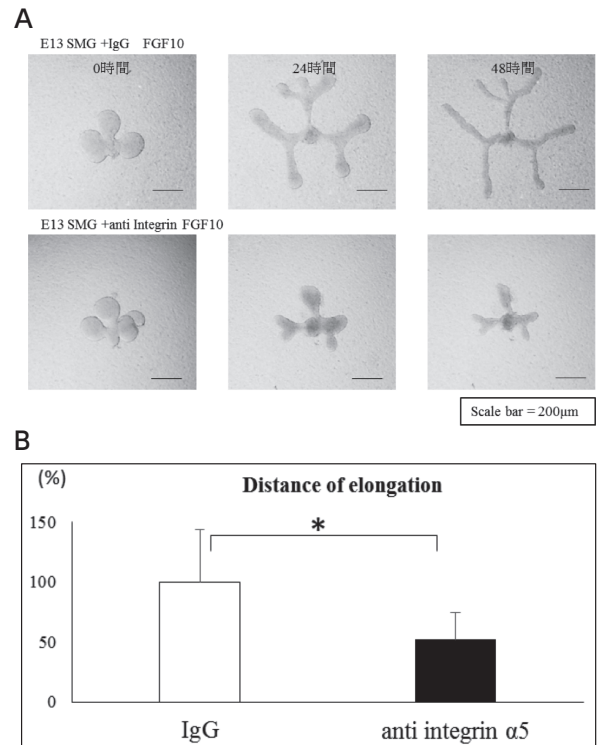


図 4. FGF10 によって誘導される顎下腺上皮の elongation 形成におよぼす anti-integrin $\alpha 5$ の影響

- A. マトリゲルで覆って培養した顎下腺上皮が FGF10 によって誘導される elongation 形成の anti-integrin $\alpha 5$ (anti-integrin $\alpha 5$ +FGF10) の効果とその対照 (IgG+FGF10) の写真を示した.
- B. A で撮影された顎下腺上皮の形成された elongation の総伸長距離を計測して anti-integrin $\alpha 5$ (anti-integrin $\alpha 5$ +EGF) の効果をその対照 (IgG+EGF) とで比較した. * $p < 0.05$

4. EGF と FGF10 で誘導される ERK1/2 のリン酸化におよぼす anti-integrin $\alpha 5$ の影響

図 5 に western blot 解析の結果を示した. 対照実験として正常 IgG 処理後に EGF を添加すると, ERK1/2 は 10 分後に明らかにリン酸化が亢進した. その後, 30 分後にはリン酸化の程度は定常状態に戻った (図 5 B). Anti-integrin $\alpha 5$ で処理した場合, 対照 (IgG

前処理)と同様に, EGF の添加後10分で ERK1/2 のリン酸化の亢進がみられ, その後定常状態に戻った(図 5 A). FGF10の添加では, IgG の前処理によって, 10分後に ERK1/2 のリン酸化が最大に達し, 30分まで亢進状態が継続した後, 定常の状態に戻った (図 5 D).

それに対し, anti-integrin $\alpha 5$ の前処理では FGF10の添加による ERK1/2 のリン酸化の亢進は著しく減弱し, 10分以降わずかにリン酸化の亢進がみられるのみであった (図 5 C).

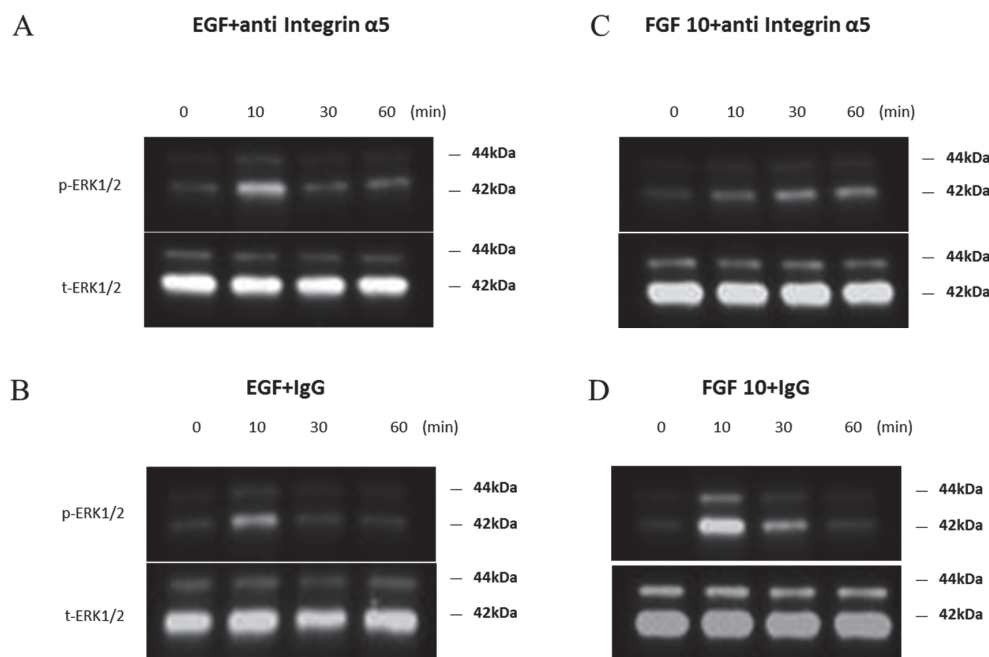


図 5. EGF あるいは FGF10で誘導される ERK1/2のリン酸化におよぼす anti-integrin $\alpha 5$ の影響

- A. Anti-integrin $\alpha 5$ で24時間前処理を行い, EGF で刺激した.
- B. IgG で24時間前処理を行い, EGF で刺激した.
- C. Anti-integrin $\alpha 5$ で24時間前処理を行い, FGF10で刺激した.
- D. IgG で24時間前処理を行い, FGF10で刺激した.

考 察

Integrin は α 鎖と β 鎖の二種類のサブユニットからなるヘテロダイマーで細胞の膜上に存在して細胞外基質との接着に関わっている¹¹⁾. 本研究において, マウス顎下腺原基で存在することが報告されている各種 *integrin* $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$ および $\beta 4$ サブユニット¹⁴⁾の mRNA の発現パターンの経時的变化をリアルタイム RT-PCR によって検討を行った (図 1). その結果, 各種 *integrin* サブユニットは少なくとも 3 種類の発現パターン (①-③) に分類された. ①; *Integrin* $\alpha 3$ サブユニットは発生過程をとおして増減の変動がみられなかったのに対し, ②; *integrin* $\alpha 5$ と $\beta 1$ サブユニットは発生の初期に大きな値を示してその後徐々に減少することが示された. また, ③ *integrin* $\alpha 6$ と $\beta 4$ サブユニットは胎生の中期 (E16と E18) にそれぞれ最大発現を示した. これらの結果が

ら, 発生の初期に最大の発現を示す *integrin* $\alpha 5$ が顎下腺原基の発生初期に何らかの重要な役割を果たしていることが推察される. また, 同様の発現パターンは $\beta 1$ サブユニットにもみられたが, 現在までに *integrin* $\alpha 5\beta 1$ 以外のヘテロダイマーは知られておらず¹²⁾, 顎下腺原基で発現している *integrin* $\alpha 5$ もまた $\beta 1$ サブユニットとヘテロダイマーを形成し, フィブロネクチンをリガンドとしている可能性が高い¹²⁾.

培養顎下腺原基を用いた実験から, anti-integrin $\alpha 5$ は, $5\mu\text{g/ml}$ 濃度以上で用量依存的に分枝形態形成を抑制した (図 2). Sakai ら²³⁾は E13顎下腺原基の cleft 形成には上皮系細胞とフィブロネクチンとの接着が重要であることを報告した. さらに今回の結果から同様の接着機構に *integrin* $\alpha 5$ が関わっていることも考えられた. また, 高濃度 ($20\mu\text{g/ml}$) の anti-integrin $\alpha 5$ により処理した顎下腺原基は萎縮した. このことから *integrin* $\alpha 5$ サブユニットと細胞外基質

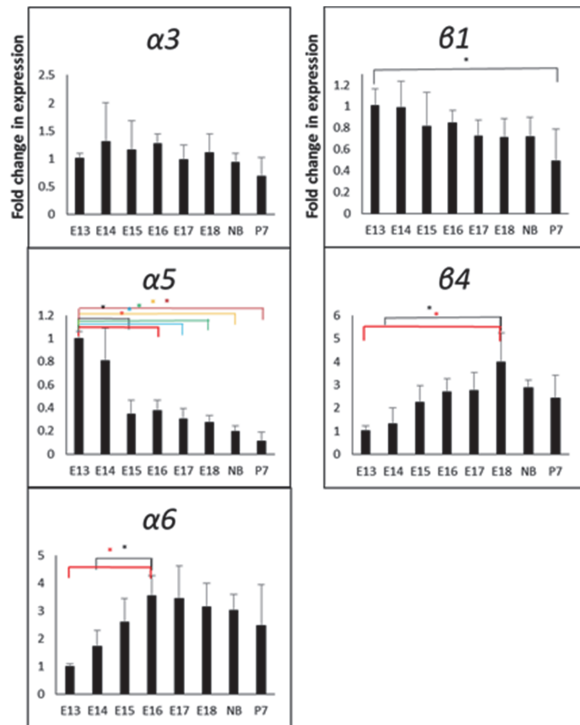


図1. リアルタイム RT-PCR による各種 *integrin* サブユニットの mRNA の相対定量
E13顎下腺に発現している各種 *integrin* サブユニットの mRNA 量を1として相対的に定量した. * $p < 0.05$

(フィブロネクチン) との接着は顎下腺原基を構成する細胞の生存に必須のシグナルを惹起していると考えられる。

分枝形態形成は多くの器官形成に関与している重要な機構である。発生経過にともない上皮細胞が木の枝が発達するように cleft 形成と elongation を繰り返して進行して行く。この2つの現象は分離顎下腺上皮を用いた培養系でそれぞれを評価することが可能である^{4,22)}。そこで EGF による cleft 形成と FGF10 による elongation を指標にして anti-integrin $\alpha 5$ の分枝形態形成阻害の機序について検討した。その結果、anti-integrin $\alpha 5$ は cleft 形成と elongation 形成のどちらの反応も抑制することが分かった (図3, 図4)。このことは integrin $\alpha 5$ が cleft 形成と elongation の両方に関わっていることを意味している。上述した integrin と分枝形態形成の関係は、integrin $\alpha 6$, integrin $\alpha 5$ および integrin $\beta 1$ と乳腺上皮¹⁴⁾, integrin $\alpha 3$ と肺上皮, integrin $\alpha 6\beta 1$, integrin $\alpha 3$ と腎臓上皮の間でもみられ、それぞれ上皮の分枝形態形成に関与することが明らかになっている²⁴⁾。

細胞成長因子は細胞膜上のチロシンキナーゼ受容体と結合すると受容体のチロシンキナーゼにより受容体

自身のチロシン残基をリン酸化させる⁸⁾。このリン酸化チロシン残基に種々のアダプタータンパク質が結合して下流のシグナル伝達経路を活性化させる⁹⁾。また、細胞外基質と integrin との接着により活性化されるシグナル伝達経路は細胞成長因子受容体のシグナルと一部共通していることや integrin と細胞成長因子が相互作用していることが示唆されている。例えば、細胞外基質と integrin が結合すると細胞成長因子受容体を含む膜タンパク質がクラスター化し、その結果、focal adhesion kinase (FAK) や MAPK カスケードが活性化される。また、この際、細胞成長因子が非存在下でも細胞成長因子受容体が活性化されることを示唆する報告もある¹⁶⁾。

著者らは、つぎに、分枝形態形成を制御する主要なシグナル伝達経路である ERK1/2 のリン酸化状態について検討を行った。Western blot 解析により、EGF が誘導する ERK1/2 のリン酸化の亢進反応は anti-integrin $\alpha 5$ の処理によって変化しなかったが、FGF10 が誘導する ERK1/2 のリン酸化は著しく抑制された (図5)。この結果から、EGF による cleft 形成は ERK1/2 以外のシグナル伝達経路が関与していると考えられるが、FGF10 が誘導する顎下腺上皮の elongation は ERK1/2 のシグナル伝達が関与していると考えられた。

すでに Koyama ら¹⁵⁾ は anti-integrin $\alpha 6$ が培養顎下腺原基の分枝形態形成を抑制することを報告している。また、顎下腺上皮の実験系から、anti-integrin $\alpha 6$ による分枝形態形成の抑制は cleft 形成を強く阻害した結果であることを示唆している。本研究の結果から、anti-integrin $\alpha 5$ は cleft 形成と elongation の両方を抑制した。したがって、integrin $\alpha 6$ は主に cleft 形成に関与するのに対し、integrin $\alpha 5$ は cleft 形成と elongation に関与していることが強く示唆された。

顎下腺原基の発生に関わる分枝形態形成は複数の細胞接着因子や細胞成長因子、またこれらの活性化によって生じる複雑なシグナル伝達経路によって制御されていると考えられた。器官形成の機構の解明にはこれらの詳細な生物現象を解明して行く必要があるものと思われた。

結 論

マウス顎下腺原基に発現する integrin $\alpha 5$ の機能について検討を行い、以下のような結果を得た。

1. Integrin $\alpha 5$ の mRNA 発現パターンは発生の初期に高値を示し、その後徐々に低下した。
2. Integrin $\alpha 5$ は顎下腺原基の分枝形態形成に関与していた。

3. Integrin $\alpha 5$ は顎下腺上皮の cleft 形成, elongation に関与していた.
4. Integrin $\alpha 5$ は FGF10による ERK1/2シグナルの活性化経路に関連していた.

以上の結果から integrin $\alpha 5$ は胎仔マウス顎下腺の分枝形態形成に重要な役割を果たしていると考えられた.

引用文献

- 1) 柏俣正典. 顎下腺分枝形態形成における上皮-間葉相互作用の分子メカニズム. 岐歯学誌. 2002; 28: 291-296.
- 2) Takahashi Y and Nogawa H. Branching morphogenesis of mouse salivary epithelium in basement membrane-like substratum. *Development*. 1991; 111: 327-335.
- 3) 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*. 1997; 124: 683-691.
- 4) 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*. 1991; 112: 855-861.
- 5) 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*. 1997; 208: 149-161.
- 6) Moerlooze LD, Spencer-Dene B, Revest JM, Hajhosseini M, Rosewell I and Deckson C. An important role for the IIIb isoform of fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis. *Development*. 2000; 127: 483-492.
- 7) Ohuchi H, Hori Y, Yamasaki M, Harada H, Sekine K, Kato S and Itoh N. FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 III b in mouse multi-organ development. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000; 277: 643-649.
- 8) Ushiro H and Cohen S. Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes. *J Biol Chem*. 1980; 47: 49-57.
- 9) Seger R and Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J*. 1995; 9: 726-735.
- 10) Eyster KM. Introduction of signal transduction, a primer for untangling the web of intracellular messengers. *Biochem Pharmacol*. 1998; 55: 1827-1838.
- 11) Giancotti FG and Ruoslahti E. Integrin Signaling. *PQHMC*. 1999; 285: 1028-1032.
- 12) Young SA, Graf R and Stupack DG; Shimada H, ed. Neuroblastoma. Croatia: InTech; 2013: 185-214.
- 13) Shen B, Delaney MK and Du X. Inside-out, outside-in, and inside-outside-in: G protein signaling in integrin-mediated cell adhesion, spreading, and retraction. *Curr Opin Cell Biol*. 2012; 24: 600-606.
- 14) Pozzi A and Zent R. Extracellular matrix receptors in branched organs. *Curr Opin Cell Biol*. 2011; 23: 547-553.
- 15) Koyama N, Hayashi T, Gresik EW and Kashimata M. Role of $\alpha 6$ integrin subunit in branching morphogenesis of fetal mouse submandibular gland: investigation by mesenchyme-free epithelial culture system. *J Med Invest*. 2009; 56: 247-249.
- 16) Yamada KM and Even-Ram S. Integrin regulation of growth factor receptors. *Nat Cell Biol*. 2002; 4: E75-E76.
- 17) 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*. 1997; 16: 5600-5607.
- 18) 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. 1999; 18: 1148-1154.
- 19) Mizushima H, Wang X, Miyamoto S and Mekada E. Integrin signal masks growth-promotion activity of HB-EGF in monolayer cell cultures. *J Cell Sci*. 2009; 122: 4277-4286.
- 20) Stereuli CH and Akhtar N. Signal co-operation between integrins and other receptor systems. *Biochem J*. 2009; 418: 491-506.
- 21) Wei C, Larsen M, Hoffman MP and Yamada KM. Self-organization and branching morphogenesis of primary salivary epithelial cells. *Tissue Eng*. 2007; 13: 721-735.
- 22) Koyama N, Hayashi T, Ohno K, Siu L, Gresik EW and Kashimata M. Signaling pathways activated by epidermal growth factor receptor or fibroblast growth factor receptor differentially regulate branching morphogenesis in fetal mouse submandibular glands. *Dev Growth Differ*. 2008; 50: 565-576.
- 23) Sakai T, Larsen M and Yamada KM. Fibronectin requirement in branching morphogenesis. *Nature*. 2003; 19: 876-881.
- 24) Arcangeli AD, Mark M, Kreidberg J, Sorokin L and Georges-Labouesse E. Synergistic activities of $\alpha 3$ and $\alpha 6$ integrins are required during apical ectodermal ridge formation and organogenesis in the mouse. *Development*. 1999; 126: 3957-3968.