

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590187

研究課題名（和文） 顎下腺の分化におけるアンドロゲンの作用機序の研究

研究課題名（英文） Study on the functional mechanisms of androgens in differentiation of the mouse submandibular gland

研究代表者

井関 尚一（ISEKI SHOICHI）

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：50167251

研究成果の概要（和文）：

マウス顎下腺の導管系は著しい性差をもち、顆粒性導管（GCT）が雄においてのみ発達するが、その分子メカニズムは明らかでない。本研究では、マウス顎下腺の線条部導管細胞がアンドロゲンによりGCT細胞に分化する際、JunDやCREBなど、細胞膜受容体の下流で働く転写因子が核から消失することが明らかになり、顎下腺導管系の分化においてアンドロゲン受容体と他の転写因子との間の特別な相互作用が関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The duct system of mouse submandibular gland has a pronounced sexual dimorphism, in which granular convoluted tubules (GCT) are developed preferentially in males, but its molecular mechanisms are unclear. The present study has revealed that JunD and CREB, which belong to the transcription factors functioning downstream of transmembrane receptors, disappear from the nuclei as a result of androgen-induced differentiation of GCT cells from striated duct cells. These results suggest that a special kind of cross-talk between the androgen receptor and other transcription factors is involved in the differentiation of the submandibular duct system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：組織学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：細胞分化・組織形成・顎下腺・導管系・顆粒性導管・アンドロゲン・転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

マウス顎下腺の導管系は著しい性差をもち、各種増殖因子の産生で知られる顆粒性導管

（GCT）は雄でのみ発達する。雄マウスで精巣を除去するとGCT細胞は線条部導管細胞に転換し、逆に雌マウスや精巣切除マウスへの

アンドロゲン投与により、線条部導管細胞がGCT細胞に転換する。一般的に、アンドロゲンは、他のステロイドホルモンと同様に、細胞内受容体に結合して活性化し、このアンドロゲン受容体が核に移行してDNAに結合し、転写因子として作用することにより遺伝子発現が促進される。しかし顎下腺導管分化におけるアンドロゲン作用の分子メカニズムは明らかでない。最近の研究では、ステロイド-ステロイド受容体系が、細胞膜の受容体の下流にあるシグナル伝達系、例えばMAPキナーゼ系を活性化することにより働く新たな経路(非ゲノム作用)の存在が、脳、卵巣、精巣などにおいて示唆されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、マウス顎下腺導管系におけるアンドロゲンによる細胞分化の分子機構を明らかにすることを目的とした。アンドロゲン-アンドロゲン受容体系が、細胞膜受容体の下流にある他のシグナル伝達系との相互作用を行なうという仮説のもとに、顎下腺導管系で性差をもって発現し、またアンドロゲン投与により発現が誘導されるシグナル伝達関連遺伝子を探索する。

## 3. 研究の方法

雄と雌の顎下腺の比較、またアンドロゲンであるテストステロン投与後各時間での雌の顎下腺の比較において、既に知られている各種のシグナル伝達関連遺伝子とその産物の発現と局在を調べた。またこれらの各条件下で顎下腺のmRNAをマイクロアレイ法により網羅的に解析し、アンドロゲンにより顎下腺で発現が誘導される遺伝子の中からシグナル伝達関連遺伝子を探索した。

## 4. 研究成果

転写因子AP-1複合体のメンバーであるJunDは、がん抑制遺伝子MEN1の産物であるメニンと結合することにより、主に細胞を分化させる方向に働く。またCyclic AMP response element-binding protein (CREB)は、さま

ざまなシグナル伝達系の下流でリン酸化により活性化して転写因子として働く。雌雄の成熟マウス顎下腺におけるJunDとメニン、およびCREBとリン酸化CREB (p-CREB)の発現と局在を、また雌および精巣切除雄へのアンドロゲン投与による顆粒性導管(GCT)の分化におけるその変化を、免疫組織化学とWesternブロット法により調べた。JunDとメニン、およびCREBとp-CREBとも、免疫反応性は雄より雌の顎下腺で有意に高く、雌では介在部導管および線条部導管遠位部の細胞の核に局在したが、雄の顎下腺で導管系の大部分を占めるGCTの細胞の核には全く認められなかった。雄で精巣切除を行うといずれの因子も有意に発現量が増加し、雌や精巣切除した雄にテストステロンを連続投与すると減少した。このとき全CREBに対するp-CREBの割合は変化しなかった。またJunD、メニン、CREBとも、mRNAの量には性差がなく、テストステロン投与による変化もなかった。雌にテストステロンを1回投与すると、線条部導管近位部の細胞の核において投与後1~6時間でCREBとp-CREB、また6~24時間でJunDとメニンの発現が一過性に増加し、投与後48時間で線条部導管細胞がGCT細胞に分化するとともにいずれも消失した。これらの結果から、アンドロゲンによるGCT細胞の分化において、核でのJunD-メニン複合体やCREBの蛋白量の一過性の増加およびその後の消失が関与することが示された。GCT細胞におけるこれら転写因子の消失は転写レベルではなく転写後レベルの調節によることが示唆された。

雌マウスへのテストステロン投与により発現が亢進する遺伝子産物をマイクロアレイ法で解析した結果、受容体型蛋白チロシンフォスファターゼβ (RPTPβ)がそのひとつとして検出された。RPTPβは中枢神経系においてニューロンの伸張等に関与するとされる蛋白であり、長、短2種類の膜貫通受容体蛋白および長、短2種類の分泌蛋白の計4つの亜型をもつ。受容体型のRPTPβに対するリガンドとしていくつかの接着分子のほか、増殖因子のプレイオトロピンなどが

知られ、受容体に結合することによりフォスファターゼ活性を抑制してシグナル伝達機構を作動させる。マウス顎下腺におけるRPTP $\beta$ ファミリーのmRNA発現をRT-PCR法で解析したところ、4つの亜型のうち短鎖の受容体型 (RPTP $\beta$ -S) が主に検出され、その発現量は雌よりも雄で高く、雌へのテストステロン投与で増加した。RPTP $\beta$ -Sに対する抗体を作成して免疫組織化学を行なったところ、雄では介在部導管のみに強く局在して顆粒性導管では全く陰性であったが、雌では介在部導管と線条部導管に広く弱く分布した。次にRPTP $\beta$ ファミリーのリガンドとして知られるいくつかの分子の顎下腺におけるmRNA発現をRT-PCR法で調べたところ、プレイオトロピンのみが検出され、雄雌で発現量の差は見られなかった。免疫組織化学では、プレイオトロピンはRPTP $\beta$ とほぼ同じ分布を示した。これらの結果から、マウス顎下腺の導管系においてプレイオトロピンが自己分泌、傍分泌的にRPTP $\beta$ -Sに作用し、雄の顆粒性導管の分化を始めとする性差の形成と維持に関与している可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

1) Keattikunpairoj S, Wakayama T, Yamamoto M, Nakaya M, Nakata H, Hipkaeo W, Sakulsak N, Iseki S (2009) Expression of cAMP response element-binding protein in the duct cell system of the mouse submandibular gland. *Histochem Cell Biol* 132:647-657, 査読有

2) Hipkaeo W, Sakulsak N, Wakayama T, Yamamoto M, Nakaya MA, Keattikunpairoj S, Kurobo M, Iseki S (2008) Coexpression of menin and JunD during the duct cell differentiation in mouse submandibular gland. *Tohoku J Exp Med* 214: 231-245, 査読有

[学会発表] (計9件)

1) Phanmatchaya K, Keattikunpairoj S, 若山友彦, 山本美由紀, 井関尚一: マウス

顎下腺における受容体型蛋白質チロシンホスファターゼ $\beta$ の発現と局在. 第88回日本生理学会大会第116回日本解剖学会総会・学術集合同大会, 2011年3月29日, パシフィコ横浜 (神奈川県) (集会中止につき、学会抄録により紙上発表)

2) Phanmatchaya K, 仲田浩規, 若山友彦, 井関尚一: アンドロゲン受容体欠損マウスにおける顎下腺の解析. 日本解剖学会第70回中部支部学術集会, 2010年10月17日, じゅうろくプラザ (岐阜県)

3) 井関尚一, Keattikunpairoj S, Phanmatchaya K, 若山友彦, 山本美由紀, 仲田浩規: マウス顎下腺における受容体型蛋白質チロシンホスファターゼの発現と局在. 第51回日本組織細胞化学学会総会・学術集会, 2010年9月24日, 秋葉原コンベンションホール (東京都)

4) 山本美由紀, 乙田敏白, 箕 俊成, 村田茂穂, 田中啓二, 金子周一, 井関尚一: プロテアソーム活性低下マウス雄顎下腺の形態的研究. 日本解剖学会第115回総会・全国学術集会, 2010年3月28日, 岩手県民会館 (岩手県)

5) Keatthikunpairoj S, 井関尚一: マウス顎下腺導管系の分化における転写因子 CREB の発現. 日本解剖学会第114回総会・全国学術集会, 2009年3月29日, 岡山理科大学 (岡山県)

6) Keatthikunpairoj S, 井関尚一: マウス顎下腺導管系の分化における転写因子 CREB の発現と活性化. 日本解剖学会第68回中部支部学術集会, 2008年10月12日, 名古屋市立大学医学部 (愛知県)

7) 井関尚一, Keattikunpairoj S: マウス顎下腺導管系における転写因子 CREB の発現. 第49回日本組織細胞化学学会総会・学術集会, 2008年10月5日, 長崎大学医学部 (長崎県)

8) Iseki S, Keattikunpairoj S, Sakulsak N, Nakaya M-A, Wakayama T: The role of cyclic AMP response element-binding protein in the duct cell differentiation in mouse submandibular gland. 13th Congress of the International Federation of Societies for

Histochemistry and Cytochemistry,  
2008.8.25, Medical University of Gdansk  
(Poland)

9) Iseki S: The duct system of mouse submandibular gland: a model of hormone-dependent cell differentiation. 3<sup>rd</sup> International Conference on Forensic Science and Medical Science, Naresuan University, 2008.7.29, Naresuan University (Thailand)

[その他]

ホームページ等

<http://web.kanazawa-u.ac.jp/~med01/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井関 尚一 (ISEKI SHOICHI)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：50167251

### (2) 研究分担者

(なし)

### (3) 連携研究者

若山 友彦 (WAKAYAMA TOMOHIKO)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：70305100

中谷 雅明 (NAKAYA MASAOKI)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：70422095