

ラット顎下腺の成長発育における IGF- I 受容体mRNAの局在

安部仁晴 岡本浩史 中川敏浩 山本茂久

In Situ Localization of mRNA for Insulin-like Growth Factor Receptor Type I in the Developing Rat Submandibular Gland

Kimiharu AMBE, Hiroshi OKAMOTO, Toshihiro NAKAGAWA and Shigehisa YAMAMOTO

Insulin-like growth factor I(IGF-I) stimulates the growth of a variety of cell types *in vivo* and *in vitro*, and its plasma concentration is closely regulated by growth hormone. Histochemical studies on the distribution of IGF-I immunoreactivity and IGF-I mRNA in adult and fetal tissues of several species have also shown multiple sites for the synthesis of IGF-I, implying a paracrine/autocrine as well as an endocrine mechanism for the action of this growth factor. In order to clarify the role of IGF in process of morphogenesis, the expression of mRNA for IGF-I receptor (IGF-IR) was investigated in the submandibular gland of developing rats by *in situ* hybridization technique.

The expression of the IGF-IR mRNA signal was observed in the cell of terminal portion and in the duct at newborn. The signal in ductal cell at newborn was stronger than that in the cell of terminal portion. Beside, the signal of IGF-IR mRNA was shown in the endothelial cell around the ductal system. With the differentiation of submandibular gland, the signal of IGF-IR mRNA was shown negatively with aciner cells, however, those signal were observed at undifferentiated cells in acinus. In contrast, although the ductal system was identified as intercalated ducts, striated ducts and excretory ducts at postnatal 21 days, the signal of IGF-IR mRNA had been observed continuously since newborn stage. At postnatal 50 days, the IGF-IR mRNA signal localized exclusively in the granular convoluted tubules and intercalated ducts, but it was not observed in acinus.

These results suggest that IGF-IR induces proliferation and growth of cells in early stage of submandibular gland development. In addition, the expression of IGF-IR mRNA signal may have an important role in the differentiation into aciner cells and granular convoluted tubule cells in morphogenesis of the rat submandibular gland.

Key words : IGF-IR, *in situ* hybridization, rat, submandibular gland

緒 言

Insulin like-growth factor (IGF) は、インス

リン様の作用を持つ増殖因子であり、細胞の増殖や分化を促進し、さらに、個体の成長においても深く関与している^{1,2)}。IGFにはIGF-IおよびIGF-

受付：平成16年2月7日，受理：平成16年4月12日
奥羽大学歯学部生体構造学講座口腔組織学分野

Division of Oral Histology, Department of Morphological Biology, Ohu University School of Dentistry

IIの二種類が同定されており、その受容体はインスリンレセプターを含め、IGF-Iレセプター(IGF-IR)、IGF-IIレセプター(IGF-II R)の三種類が報告されている。リガンドとレセプターの関係はそれぞれ特異的ではなく、固有のレセプターに対して高い親和性をもつが、他のレセプターにも交差結合性をもつことが知られている^{3,4)}。

IGF-I⁵⁻⁹⁾については従来、その体内分布や産生細胞が報告されており、IGF-IR^{10,11)}についても様々な組織における存在が報告されている。IGF-IRの生物学的作用としては、細胞増殖、形質転換、アポトーシスの抑制が考えられている^{2,12)}が、その生体内での機能あるいは発育との関連性については、いまだ不明な点が多い。

そこで、ラット顎下腺の成長発育におけるIGF-IR mRNAの発現の推移をin situ hybridizationにて検索した。

材料および方法

1. 研究材料

材料にはWistar系雄性ラット各5匹の顎下腺を左右の区別なく使用した。観察期間は、生後0, 7, 21, 50日齢とした。

2. 研究方法

1) 標本作製

標本の作製手順は、まずペントバルビタール(40mg/kg)で腹腔内麻酔後開胸し、左心室より生理食塩水にて脱血した。その後、4%paraformaldehyde固定液(pH6.2 浸透圧700mOsm)で灌流固定を行い顎下腺を摘出した。さらに、同液にて6時間浸漬固定後、30%ショ糖液にて氷結防止処理を行い、Tissue Mount(白井松器機、東京)に包埋し、液体窒素で急速凍結、クリオスタット(MICROM, Germany)にて厚さ5 μ mの連続切片を作製した。

2) in situ hybridization

まず、切片をProteinase Kにて10分間の前処理し、4%PFA/PBSにて後固定を行った。本研究に使用したプローブはHybriProbe™ IGF-1 Receptor α , rat, unlabelled (Biagnostik GmbH Göttingen, Inc. Cat #B421681HO, Germany)で、ハイブリダイゼーション溶液(50%formamide,

10mM Tris HCl, 1mM EDTA, 600mM NaCl, 10mMDTT, Denhardt's溶液, 0.25%SDS, 10% polyethyleneglycol, 200 μ g/ml *E. coli* tRNA, DEPC 水)にて希釈し、切片に滴下、カバーガラスで覆い、50%formamideで湿潤させたインキュベーションチャンバー内で、50°C, 18時間ハイブリダイゼーションした。その後通法に従い免疫染色し、5-bromo 4-chloro 3-indoxyl phosphate/nitro blue tetrazolium chloride (BCIP/NBT)にて発色、水性封入後、顕微鏡観察を行った。

結 果

1. 0日齢

顎下腺組織のほぼ全体にIGF-IR mRNAのシグナルが発現していたが、導管系では強く、末端の細胞集団では弱い傾向にあった。また、導管周囲の血管や神経線維においてもシグナルの発現が観察された(図1-a, b)。

2. 7日齢

0日齢と同様、導管系細胞でのシグナルは強く認められた。また腺房における発現は全般に弱いものの、未分化な細胞ほど強い傾向が認められた(図2)。一方、導管周囲の神経線維および血管でのシグナルは0日齢に比べ減弱していた(図2)。

3. 21日齢

増齢とともに、腺房が発育し、導管系の構築も進んでいた。依然として、導管系においてはIGF-IR mRNAのシグナルが強いが、腺房での発現は弱かった(図3-a)。しかし、一部の腺房でのシグナルは、7日齢と同様、細胞質の豊富な発達した腺細胞に比べ、細胞質に乏しい未分化な細胞において強い発現がみられた(図3-b)。

4. 50日齢

50日齢では、成熟した顎下腺像を呈していた。IGF-IR mRNAのシグナルの発現は、導管系の細胞にのみ限局しており、腺房ではその発現は確認されなかった。さらに、導管系において、介在部および顆粒性導管では強いシグナル発現がみられたが、線条部あるいは口径の大きい導管部ではほとんど観察されなかった(図4)。

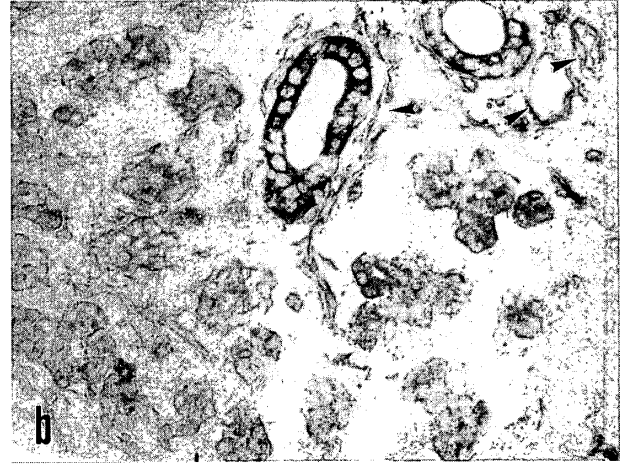
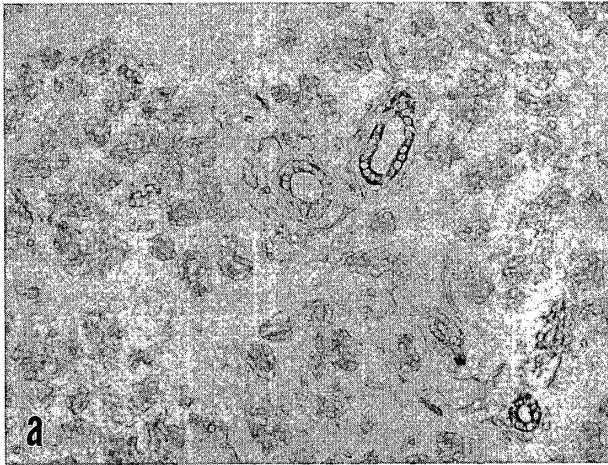


図1 0日齢 IGF-IR mRNAの局在

- a: 陽性反応は、未分化な細胞集団と導管系に観察される。×40
 b: シグナルは導管系で強く、末端の細胞集団では比較的弱い。
 また、導管周囲の血管にシグナル発現が観察される(矢頭)。×80

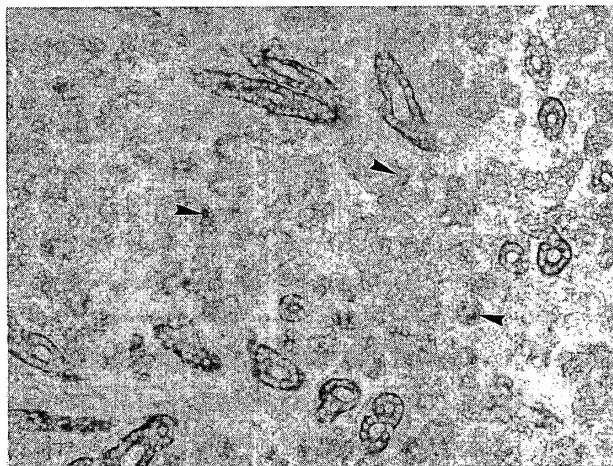


図2 7日齢 IGF-IR mRNAの局在

導管系細胞で強いシグナル発現が認められ、腺房では比較的弱い。腺房におけるシグナル発現は未分化な細胞ほど強い傾向が認められる(矢頭)。×40

考 察

IGF-Iはエンドクリン機構によって、生後の個体の成長に重要な役割を果たすことが知られている¹³⁾。しかし近年、胎児期や生後の個体のほとんどすべての組織でIGF-Iが発現していることが見出され、一部の組織においてはIGF-Iがオートクライン/パラクライン機構で、細胞の増殖と分化を調節していることが明らかとなった^{2,4,14)}。

一方、IGF-IRは軟骨細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、下垂体、甲状腺、膵臓や消化管などに広く分布することが報告されている^{10,11)}。しかし、唾液腺の形態形成におけるIGF-IRの発現状況を遺伝子レベルで検索した報告はなく、本研究ではラットの顎下腺を材料として、in situ hybridizationにより顎下腺の形態形成および機能発現におけるIGF-IRの関連性について検索した。

顎下腺の発生や形成初期にはEGFをはじめとしてNGF、TGF- α 、 $-\beta$ など数多くの細胞増殖因子の関与が指摘されており¹⁵⁻¹⁹⁾、IGFについてもIGF-I、-IIの存在が報告されている²⁰⁻²⁴⁾。本研究結果からも0日齢の顎下腺組織において、IGF-IR mRNAのシグナル発現が幼弱な導管系と末端の未分化な細胞集団に確認された。IGF-IRの生物学的作用としては、細胞増殖、形質転換、アポトーシスの抑制が考えられている^{2,12)}。顎下腺の形成初期に、IGF-IRが細胞増殖に重要であることが、本研究結果から示唆された。

増齢に伴い、腺細胞は分化し、腺房として発育するが、ラット顎下腺の形態形成において、7日齢から14日齢までの期間は、proaciner cellの数が減少し、aciner cellが分化、増殖し、発生初期の分泌機能を担うterminal tubule cellの減少といった様々な分化過程の観察される時期である^{25,26)}。この時期にIGF-IR mRNAのシグナルの

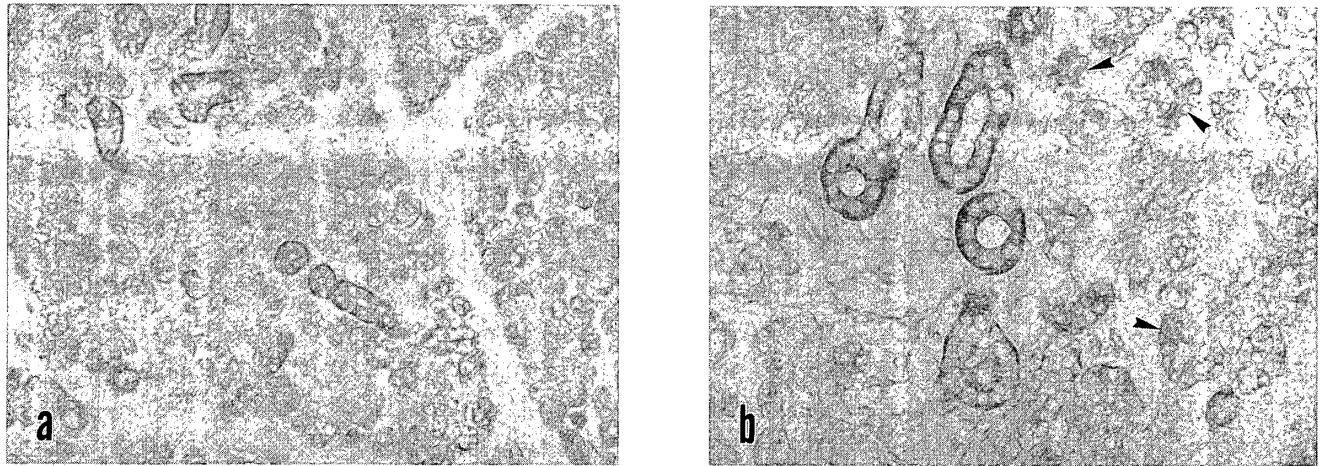


図3 21日齢 IGF-IR mRNAの局在

a: 導管系ではIGF-IR mRNAのシグナルは強く観察されるが、腺房での発現は弱い。×40
b: 腺房でのシグナル発現は、発達した腺細胞に比べ、未分化な細胞で強い(矢頭)。×80

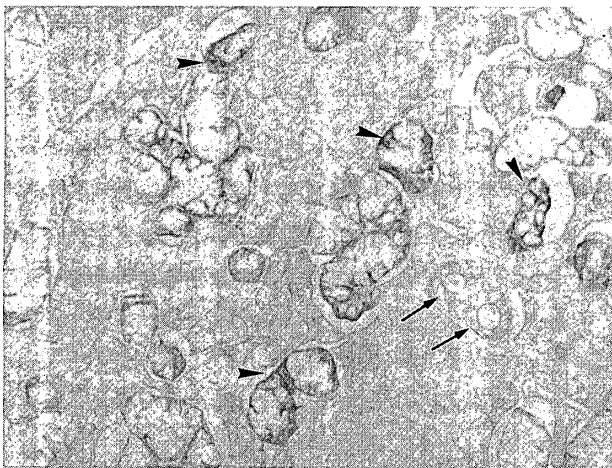


図4 50日齢 IGF-IR mRNAの局在

シグナルの発現は、導管系の細胞にのみ限局し、腺房では確認されない。介在部および顆粒性導管では強いシグナル発現がみられたが(矢頭)、線条部では発現していない(矢印)。×40

低下がみられたことから、腺細胞の分化過程においてはIGF-IRの発現が関与しているものと考えられる。

しかし、導管系におけるIGF-IR mRNAのシグナルは観察期間を通じ、その発現が維持されていた。ラット顎下腺の導管系は0日齢において、唾液の輸送に耐うる形態に分化しており、その後の分泌唾液の増加に伴い、細胞増殖が盛んになる。同時に、腺細胞から分泌された原唾液の組成の調

整と種々の蛋白の分泌などの機能発現がみられる。特に、50日齢ごろに確認される介在部と線条部の間に位置する顆粒性導管は、EGFをはじめとしてNGF、TGF- β などの細胞増殖因子の産生を行う導管系として、げっ歯類では研究が盛んな部位である¹⁵⁻¹⁸⁾。本研究結果においてIGF-IR mRNAのシグナル発現が、0日齢から持続して確認されたことは、導管を構成する細胞の増殖にIGF-IRが重要であることが考えられる。

さらに、50日齢の導管の構築が完成した時期では、IGF-IR mRNAのシグナルは介在部および顆粒性導管では強い発現がみられたが、線条部あるいは口径の大きい導管部では発現がほとんど観察されなかった。この結果は導管系の形成初期の段階において、IGF-IRは細胞増殖に重要であるものの、導管系の構築が完了した以後においては、ターンオーバーやリモデリング等の細胞増殖時には、IGF-IRが積極的に関与しないことを示唆している。また、介在部や顆粒性導管にIGF-IR mRNAのシグナル発現が限局する傾向を示したことは、興味深い。つまり、腺細胞に分化し、腺細胞の供給源として考えられる介在部の細胞にIGF-IR mRNAのシグナルが発現していたことは、細胞の増殖のみならず、未分化な介在部の細胞が腺細胞に分化する際にも、IGF-IRが密接に関与することを示す結果であると推察される。ま

た、介在部とは異なるが顆粒性導管におけるIGF-IR mRNAのシグナル発現は、げっ歯類における顆粒性導管の機能を考え合わせると、IGF-IRは細胞増殖を含め、その分化に重要な役割を担う可能性が示唆された。

鈴木²⁴⁾は、ラット顎下腺の生後発達に伴うIGF-I、-IIの分布を検索している。その結果によると、0日齢においては腺房と導管にIGF-Iが局在するが、IGF-IIは両者に発現しておらず、7日齢になりIGF-I、-IIとも導管系、特に線条部に限局する傾向を示した。この報告と本研究結果からリガンドとレセプターの関係を考えて、局在の推移の類似性からみて、オートクライン/パラクライン機構によるIGF-Iの作用発現が示唆された。加えて従来より報告されていたエンドクライン機構に関しては、生後初期の導管周囲に存在する血管内皮細胞にもIGF-IR mRNAのシグナルが発現していたことから、顎下腺の形成初期にはエンドクライン機構は主として関与せず、オートクライン/パラクライン機構によりIGF-Iの作用発現が行われると考えられる。成熟した顎下腺の一部の導管系に関しては、エンドクライン的なIGF-Iの作用発現という機構も否定できないが、オートクライン/パラクライン的な作用発現機構が主体をなすと推察され、生後初期の血管内皮細胞におけるIGF-IR mRNAのシグナルが発現は、血管系の増殖にもIGF-IRが重要であることを示唆している。

結 論

生後0日齢から50日齢までのラット顎下腺の発育過程におけるIGF-IR mRNAの発現の推移をin situ hybridizationにて検索し、以下の結論を得た。

1. IGF-IR mRNAの発現は0日齢では顎下腺の組織全体に認められたが、未分化な細胞集団に比べ、導管系の細胞に強いシグナルが観察された。

2. 腺房におけるシグナル発現は、増齢とともに低下したが、細胞質の豊富な発達した腺細胞に比べ、細胞質に乏しい未分化な細胞では比較的強い発現が認められた。

3. 導管系においては、増齢にともない、介在部および顆粒性導管にシグナル発現が限局する傾向を示し、線条部や口径の大きい導管部では発現が消失した。

以上の結果から、IGF-IRはラット顎下腺の発育において、発生初期段階の細胞増殖に重要な役割を果たすことが明らかとなった。また、導管系におけるmRNAの発現の推移から、IGF-IRは腺細胞や一部の導管系細胞の分化に関連する可能性が示唆された。

本論文の要旨の一部は第41回歯科基礎医学会学術大会(平成11年9月 東京)および第105回日本解剖学会総会全国学術集会(平成12年3月 横浜)にて発表した。

文 献

- 1) 清水淑子：インスリンの増殖因子作用。蛋・核・酵 **36**；1078-1087 1991.
- 2) Baker, J., Liu, J. -P., Robertson, E. J. and Efstratiadis, A. : Roll of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* **75**；73-82 1993.
- 3) 播 稷治, 横野浩一, 春日雅人：IGF-Iレセプターキナーゼを介する情報伝達系。蛋・核・酵 **36**；1008-1013 1991.
- 4) 門脇 孝：インスリンとIGFの作用, メカニズム, 細胞増殖因子の作用と疾患(宮園浩平編)；38-47 羊土社 東京 1998.
- 5) Beck, F., Samani, N. J., Penschow, J. D., Thorley, B. *et al.* : Histochemical localization of IGF- I and IGF- II mRNA in developing rat embryo. *Development* **101**；175-184 1987.
- 6) Hansson, H. -A., Nilsson, A., Isgaard, J., Isaksson, O. *et al.* : Immunohistochemical localization of insulin-like growth factor I in the adult rat. *Histochem* **89**；403-410 1988.
- 7) Han, V. K. M., D' Ercole, A. J. and Lund, P. K. : Cellular localization of somatomedin(Insulin-like growth factor) messenger RNA in the human fetus. *Science* **236**；193-196 1987.
- 8) Brown, A. L., Graham, D. E., Nissley, S. P., Hill, D. J. *et al.* : Development regulation of Insulin-like growth factor II mRNA in different rat tissues. *J Bio Chem* **261**；13144-13150 1986.
- 9) Klempt, M., Hutchins, A. -M., Gluckman, P. D. and Skinner, S. J. M. : IGF binding protein-2 gene expression and the location of IGF- I and IGF- II in fetal rat lung. *Development* **115**；765-772 1992.

- 10) 福山隆一, 清水信義: 増殖因子受容体の組織分布. 蛋・核・酵 **36**; 1282-1291 1991.
- 11) Liu, J. -P., Baker, J., Perkins, A. S., Robertson, E. J. *et al.*: Mice carrying null mutations of the genes encoding Insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor(Igf1r). Cell **75**; 59-72 1993.
- 12) Ward, A., Bierke, P., Pettersson, E. and Engström, O.: Insulin-like growth factors: Growth, transgenes and imprinting. Zoological Science **11**; 167-174 1994.
- 13) 大久保由美子: インスリン様成長因子結合蛋白の病態生理的意義に関する研究. 東女医大誌 **65**; 123-130 1995.
- 14) 佐々木憲夫: IGF- Iのオートクリン作用. 蛋・核・酵 **36**; 1095-1100 1991.
- 15) Poulsen, S. S., Nexø, E., Olsen, P. S. and Hess, J.: Immunohistochemical localization of epidermal growth factor in rat and man. Histochem **85**; 389-394 1986.
- 16) Gresik, E. W., Kashimata, M., Kadoya, Y., Mathews, R. *et al.*: 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) Schwab, M. E., Stockel, K. and Thoenen, H.: Immunocytochemical localization of nerve growth factor(NGF) in the submandibular gland of adult mice by light and electron. Cell Tissue Res **169**; 289-299 1976.
- 18) 藤山正之: ラット顎下腺の発育に伴うTGF- β 受容体の局在. 奥羽大歯学誌 **25**; 32-64 2001.
- 19) 原田 直, 高木章司, 佐野倫三, 松尾 士: ヒト胎児唾液腺におけるtransforming growth factor α (TGF- α)とc-myc p62の発現とその意義. 口科誌 **44**; 889 1995.
- 20) Amano, O. and Iseki, S.: Expression, localization and developmental regulation of insulin-like growth factor I mRNA in rat submandibular gland. Arch Oral Biol **38**; 671-677 1993.
- 21) Kerr, M., Lee, A., Wang, P. -L., Purushotham, K. R. *et al.*: Detection of insulin and insulin-like growth factors I and II in saliva and potential synthesis in the salivary glands of mice. Biochemical Pharmacology **49**; 1521-1531 1995.
- 22) Patel, D. G., Begum, N. and Smith, P. H.: Insulin-like material in parotid and submaxillary salivary glands of normal and diabetic adult male mice. Diabetes **35**; 753-758 1986.
- 23) Phillip, H., Smith, P. H. and Patel, D. G.: Immunohistochemical studies of the insulin-like material in the parotid glands of rat. Diabetes **33**; 661-666 1984.
- 24) 鈴木章夫: ラット顎下腺の発育過程における増殖因子の発現. 奥羽大歯学誌 **28**; 72-86 2001.
- 25) 小園 知, 佐藤一芳, 田神英明: ラット顎下腺のproacinar cell. 神奈川歯学 **16**; 328-339 1981.
- 26) Segawa, A., Sahara, N., Suzuki, K., Yamashina, S. *et al.*: The formation, fusion and discharge of rat submandibular gland acinar secretory system. J Cell Sci **78**; 67-85 1985.

著者への連絡先: 安部仁晴, (〒963-8611) 郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部生体構造学講座口腔組織学分野
 Reprint requests: Kimiharu AMBE, Division of Oral Histology, Department of Morphological Biology, Ohu University School of Dentistry
 31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan