

ラット顎下腺の発育に伴うBMPおよび その受容体の局在

色井亮仁

Immunohistochemical Localization of BMP and BMP Receptor in Developing Rat Submandibular Gland

Akihito IROI

Bone morphogenetic proteins (BMPs) were originally identified as the active components within osteoinductive extracts derived from bone. The BMPs are known to include a large family of proteins within the TGF- β super family of growth factors. More recent studies have shown BMPs are multifunctional cytokines that regulate the proliferation and differentiation of various cell types, function in organogenesis and apoptosis. In order to clarify the role of BMPs in the process of morphogenesis in salivary gland, the expression of BMPs and BMP receptors (BMPRs) were investigated in submandibular gland of developing rat by immunohistochemistry.

At fetal 20 days, immunoreactivity of BMP-2 and BMP-4 were detected on some cells in a part of terminal tubule. BMP-2 and BMP-4 positive cells decreased with the progression of acinar differentiation, they were not observed at postnatal 14 days. However, immunoreactivity of BMP-2 and BMP-7 appeared in the ductal cells in postnatal 14 days. Expression of BMPR-I and BMPR-II were observed on some cells in a part of terminal tubule. At birth, they were also expressed in the ductal cells, and increased with age and growth. BMPR-I and BMPR-II positive cells in acinus were not seen at after postnatal 14 days.

These results suggest that BMP-2 and BMP-4 are involved in the differentiation of acini, and BMP-2, BMP-7 in the development of the ductal system. In addition, BMP-2, -4, -7 and BMPR -I, -II may have important roles in the morphogenesis of the rat submandibular gland.

Key words : BMP, BMP receptor, submandibular gland, immunohistochemistry

緒 言

Bone Morphogenetic Protein (BMP)は、異所性の骨誘導能をもつタンパクとして発見された¹⁾。しかし最近、BMPは単に骨形成を誘導するだけ

ではなく、種々の細胞の増殖や分化^{2,3)}、胎児期中胚葉誘導⁴⁾、個体の発生や分化^{5,6)}、アポトーシスの誘導⁷⁾、各種組織や器官の形態形成^{7,8)}などその多様性が報告されている。また、BMPの発現は骨組織や軟骨組織とその隣接組織に限らず、胃⁹⁾、

受付：平成17年10月4日，受理：平成18年1月20日
奥羽大学大学院歯学研究科口腔組織構造生物学専攻
(指導：山本茂久教授)

Department of Oral Histology, Ohu University
Graduate School of Dentistry
(Director : Prof. Shigehisa YAMAMOTO)

心臓¹⁰⁾、脳¹¹⁾、末梢神経¹²⁾、腎臓¹³⁾、肺¹⁴⁾や歯^{15,16)}など数多くの組織、器官にも認められることが報告され、個体の発生過程にBMPは不可欠な因子であることが判明している。唾液腺においても各種BMPの存在¹⁷⁻²¹⁾は確認されているものの、唾液腺の形態形成におけるBMPの局在や分布、その動態を検索した報告はない。

そこで、本研究では、唾液腺の発育過程にBMPおよびその受容体 (BMP receptor: BMPR) がどのように関与しているかを解明する目的で、他の組織、器官の形態形成において重要な役割をもつBMP-2, -4, -7およびその受容体であるBMPR-I, -IIについて、ラット顎下腺における局在とその推移を免疫組織化学的に検索した。

材料および方法

1. 研究材料

材料にはWistar系雄性ラット各10匹の顎下腺を左右の区別なく使用した。観察期間は、顎下腺の発生初期である胎生20日齢から、生後0, 7, 14, 21日齢、および顎下腺がほぼ成熟する生後50日齢までとした。

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で脱血した。その後、4% paraformaldehyde固定液 (pH6.2, 浸透圧700mOsm) で灌流固定を行い、顎下腺周囲組織ごと摘出した。さらに、同液で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、液体窒素で急速凍結し、クリオスタット (MICROM, Germany) で厚さ10 μ mの連続切片を作製した。

2) 免疫染色

凍結切片を0.3% H₂O₂含有メタノール溶液にて10分間処理し、内因性ペルオキシダーゼを不活性化した。次いで、10%正常ウサギ血清 (DAKO Corp., CA, USA) にて10分間、ブロッキング処理を行い、一次抗体を反応させた。

本研究に使用した一次抗体は、goat anti human BMP-2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Cat #

sc6895, CA, USA), mouse anti mouse BMP-4 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Cat # sc12721, CA, USA), goat anti human BMP-7 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Cat # sc6899, CA, USA), goat anti human BMPR-I (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Cat # sc5678, CA, USA), goat anti human BMPR-II (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Cat # sc5683, CA, USA)の5種類で、それぞれ10時間反応させた。

次に、二次抗体としてbiotinylated rabbit anti goat immunoglobulin (DAKO Corp., CA, USA), biotinylated anti rabbit mouse immunoglobulin (DAKO LSAB 2 Kit, DAKO Corp., CA, USA), をそれぞれ30分間、その後peroxidase標識streptavidin (DAKO LSAB 2 Kit, DAKO Corp., CA, USA) を15分間反応させた。0.3% H₂O₂を含む0.05% 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 溶液 (0.05M Tris-HCl緩衝液pH7.6) にて発色を行い、5% methyl green (武藤化学薬品, 東京) で核染後、顕微鏡観察を行った。なお、切片の洗浄および抗血清の希釈には0.05M Tris-HCl緩衝液 (pH7.6) を用いた。

対照実験は、一次抗体のかわりに正常ヤギ血清 (DAKO Corp., CA, USA) を用いて同様の反応を行った。

結 果

1. 胎生20日齢

胎生20日齢の顎下腺は腺房様の細胞集団と管腔を有する導管様構造物で構成されていたが、その分布は比較的疎であった (図1, 2)。

BMP-2の局在は、腺房様の細胞集団の一部に認められたが、導管様構造物ではみられなかった (図1-a)。また、BMP-4の局在は、BMP-2と同様に腺房様の細胞集団の一部の細胞にのみ認められたが、抗BMP-4抗体による免疫染色で陽性を示す細胞数はBMP-2に比べ多数観察された (図1-b)。一方、BMP-7の局在は、顎下腺を構成する細胞ではみられなかった (図1-c)。

BMPR-Iの局在はBMP-2, -4と類似しており、腺房様の細胞集団の一部の細胞にみられた (図2-a)。また、BMPR-IIの局在も細胞集団の一部

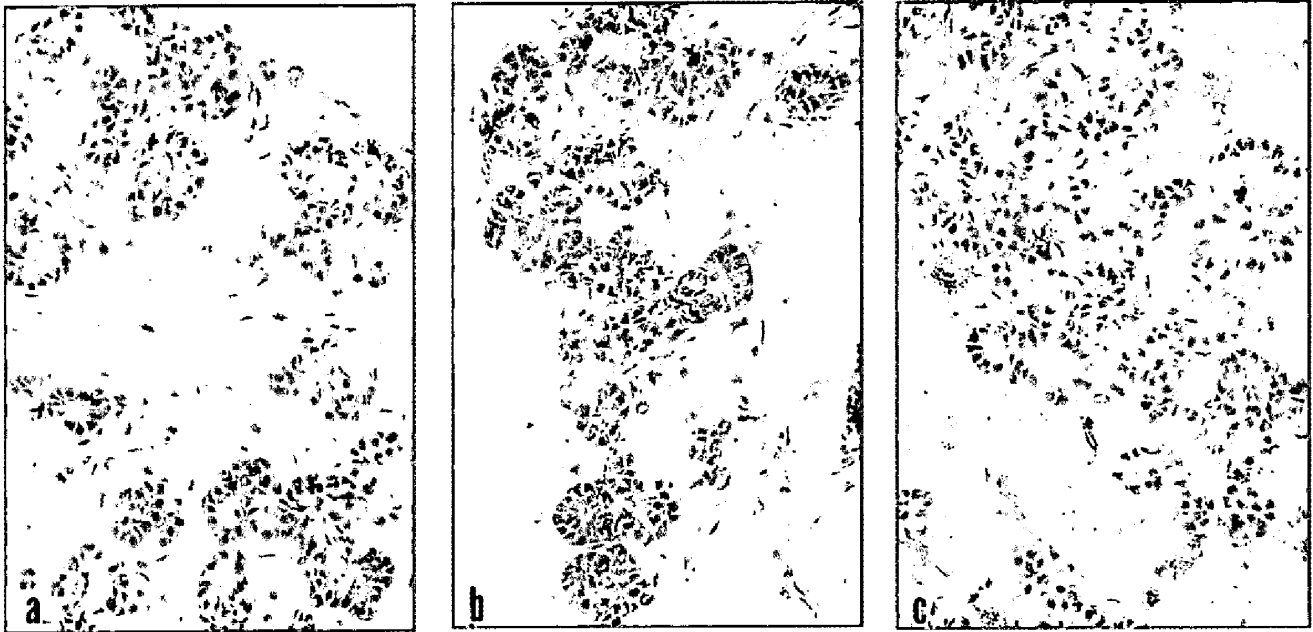


図1 胎生20日齢 抗BMP反応像

a : BMP-2の局在は、腺房様の細胞集団を構成する一部の細胞に確認される。 ×100

b : BMP-4の局在は、腺房様の細胞集団の細胞に認められるが、抗BMP-4陽性を示す細胞数はBMP-2に比べ多い。 ×100

c : BMP-7の局在は、顎下腺を構成する細胞にはみられない。 ×100

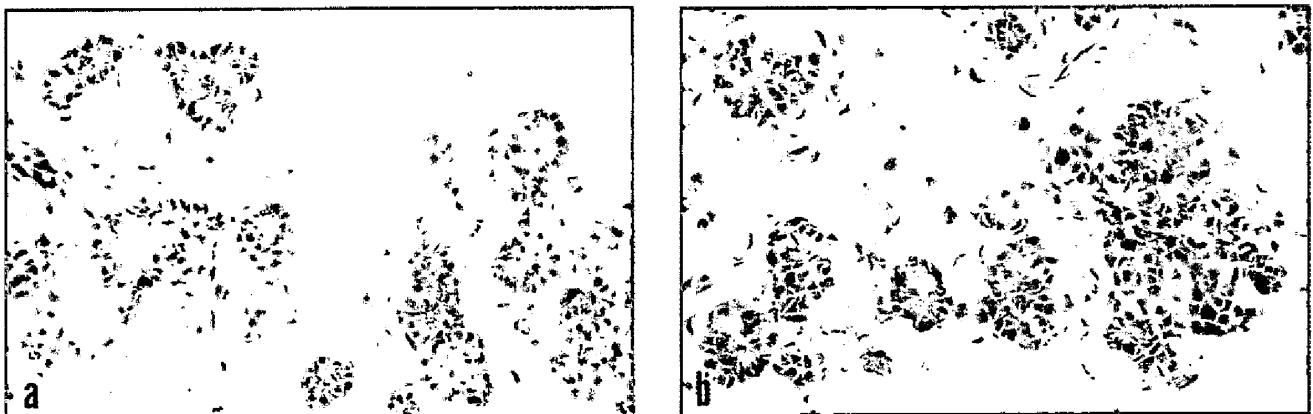


図2 胎生20日齢 抗BMPR反応像

BMPR-I (a), BMPR-II (b)の局在は、腺房様の細胞集団を構成する一部の細胞に確認される。 ×100

にみられたが、導管様構造物では確認されなかった (図2-b)。

2. 生後0日齢

顎下腺組織全体に細胞増殖が進み、腺房と導管系の構築が明瞭になった (図3, 4)。

BMP-2の局在は、胎生20日齢同様、腺房の一部の細胞にみられ、その数は増加した。しかし、導管系の細胞では認められなかった (図3-a)。

BMP-4の局在も腺房を構成する細胞にみられたが、その数は胎生20日齢に比べ減少していた (図

3-b)。また、BMP-7の局在は、腺房、導管系ともに確認されなかった (図3-c)。

BMPR-Iの局在は、腺房の一部の細胞に認められたが、0日齢では導管系を構成する細胞にもみられた (図4-a)。BMPR-IIの局在もBMPR-Iと同様に、腺房の一部の細胞にみられ、導管系を構成する細胞にも確認された (図4-b)。

3. 生後7日齢

生後0日齢に比べ、細胞増殖がさらに進み、腺房の増加と導管系の発育が観察された。(図5,

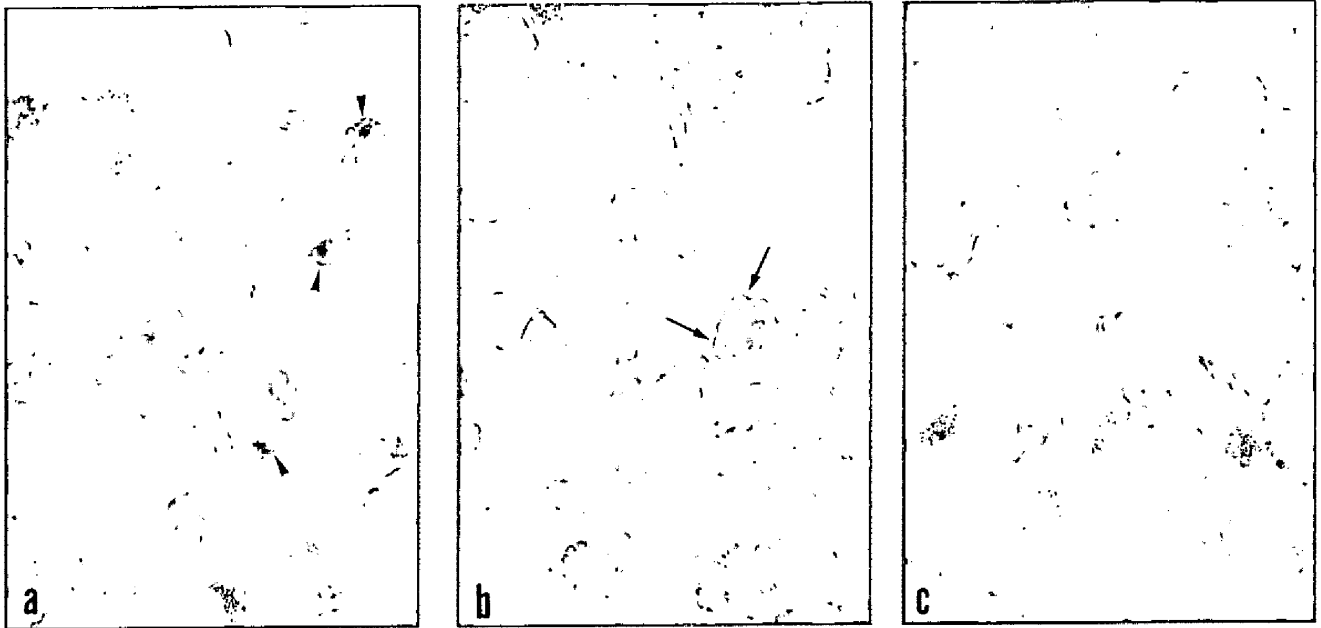


図3 生後0日齢 抗BMP反応像

- a : BMP-2の局在は、腺房の一部の細胞にみられ、その数は胎生20日齢に比べ増加している (矢頭)。 ×100
 b : BMP-4の局在は腺房を構成する細胞にみられるが、その数は減少している (矢印)。 ×100
 c : BMP-7の局在は、腺房、導管系ともにみられない。 ×100

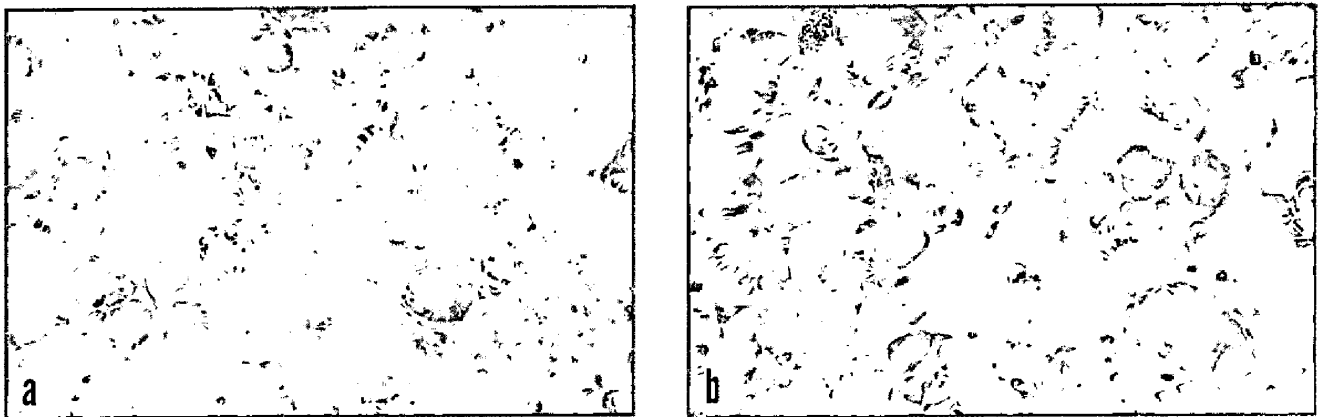


図4 生後0日齢 抗BMPR反応像

- BMPR-I (a), BMPR-II (b)の局在は、腺房の一部の細胞、導管系を構成する細胞にみられる。 ×100

6)。

BMP-2の局在は、依然として腺房の一部の細胞にのみ認められたが、その数は生後0日齢に比べ、やや増加していた (図5-a)。BMP-4の局在は、腺房、導管系ともにほとんど確認できなかったが、腺房を構成する一部の細胞において認められた (図5-b)。これに対し、BMP-7の局在は、これまでとは異なり、導管系に観察された (図5-c)。

BMPR-Iの局在は、生後0日齢と同様に導管系の細胞と腺房の一部の細胞にみられた (図6-

a)。また、BMPR-IIの局在も導管系を構成する細胞に認められ、腺房においても一部の細胞にBMPR-IIの局在が観察された (図6-b)。

4. 生後14日齢

小葉構造が明瞭となり、導管系の発育も顕著となり、介在部や線条部なども区別できるようになった (図7, 8)。

BMP-2の局在は、7日齢までみられなかった介在部、線条部などの導管系において認められるようになった。また、腺房では抗BMP-2陽性細胞は確認されなかった (図7-a)。BMP-4の局在

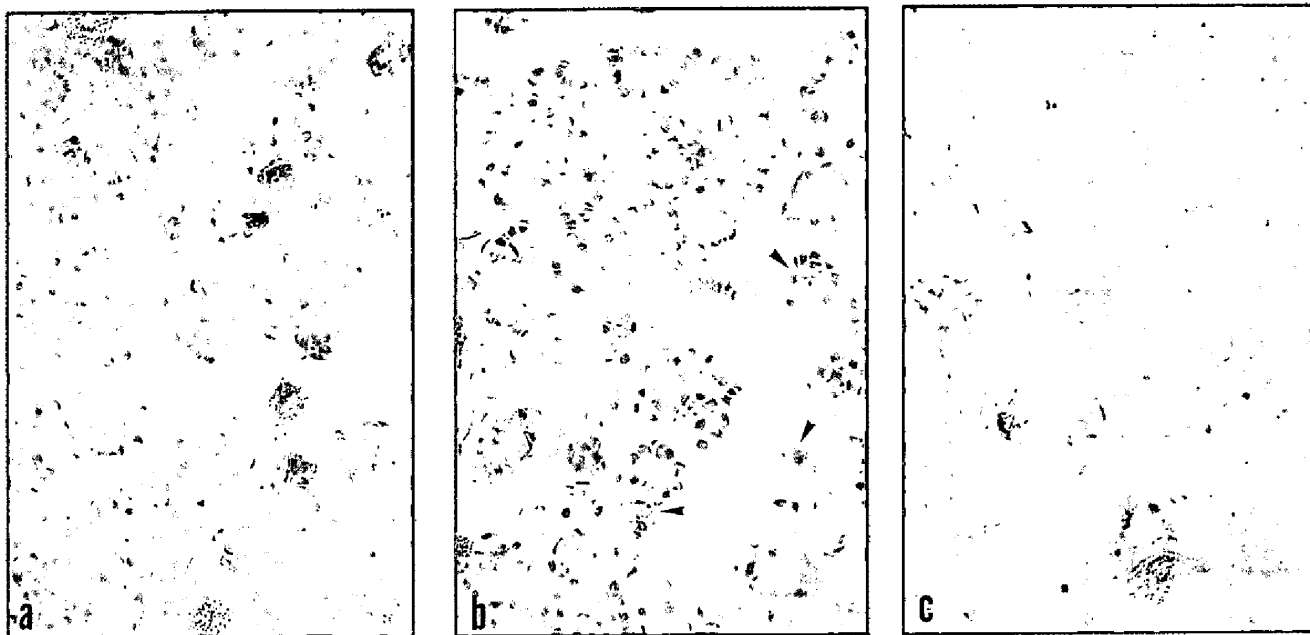


図5 生後7日齢 抗BMP反応像
 a : BMP-2の局在は、腺房の一部の細胞にのみ存在している。 ×100
 b : BMP-4の局在は、一部の腺房を構成する細胞に観察される (矢頭)。 ×100
 c : BMP-7の局在は、導管系にみられる。 ×100

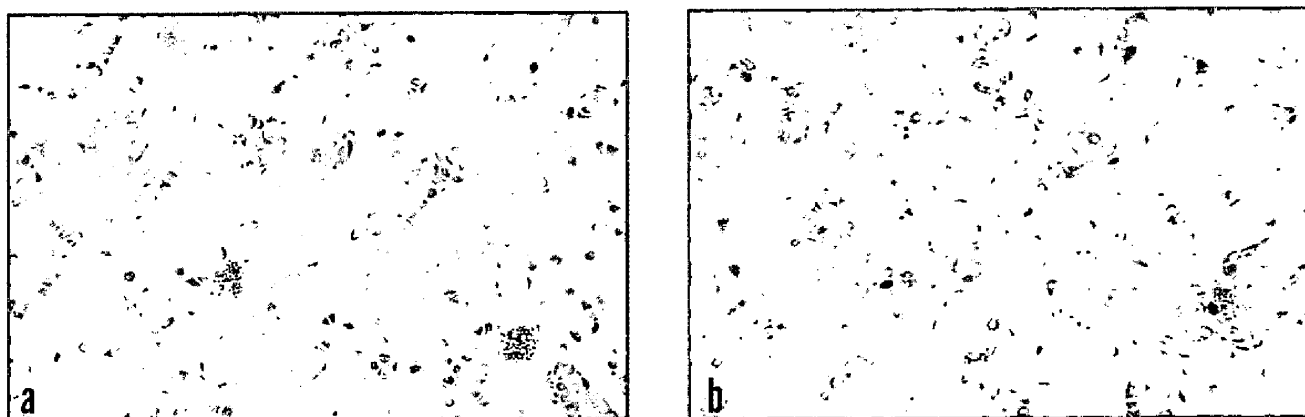


図6 生後7日齢 抗BMPR反応像
 BMPR-I (a) , BMPR-II (b)の局在は、導管系を構成する細胞に認められ、腺房ではほとんど確認されない。
 ×100

は、腺房、導管系ともにみられなかった (図7-b)。一方、BMP-7の局在は、7日齢と同様に腺房では観察されず、導管を構成する細胞にのみ認められた (図7-c)。

BMPR-I, IIの局在は類似しており、線条部、介在部を含むすべての導管系においてのみ認められ、腺房では確認されなかった (図8-a, b)。

5. 生後21日齢

生後21日齢になると、顎下腺は豊満な細胞質を有する腺細胞からなる腺房が増加していた (図9,

10)。

BMP-2の局在は、14日齢と同様に線条部、介在部で観察されたが、腺房においては認められなかった (図9-a)。また、BMP-4の局在は腺房、導管系ともにみられなかった (図9-b)。BMP-7の局在は、BMP-2に類似しており、腺房では確認されなかった。しかし、抗BMP-7抗体による免疫染色では、導管系、特に線条部に陽性反応が確認され、介在部でも弱陽性反応が観察された (図9-c)。

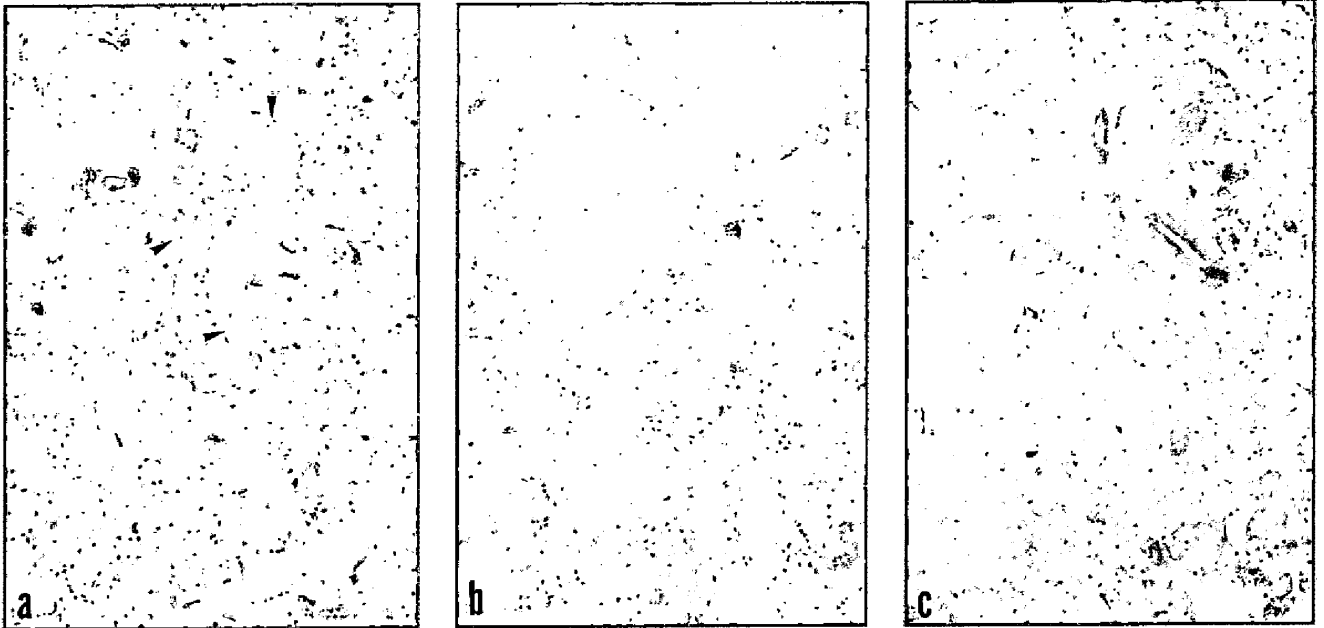


図7 生後14日齢 抗BMP反応像

- a: BMP-2の局在は、線条部、介在部に観察される(矢頭)が、腺房では確認されない。×50
 b: BMP-4の局在は腺房、導管系ともに認められない。×50
 c: BMP-7の局在は、導管を構成する細胞にのみ限局している。×50

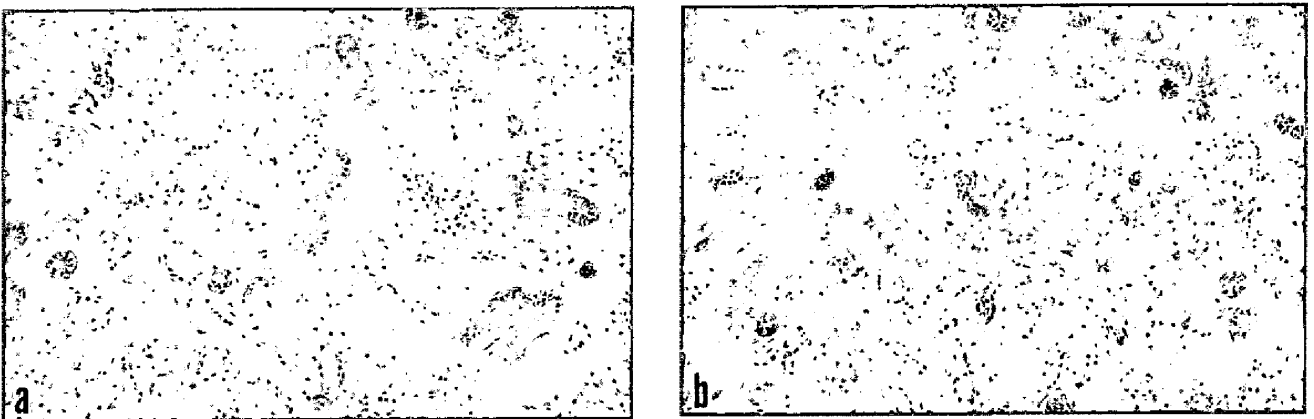


図8 生後14日齢 抗BMPR反応像

BMPR-I (a), BMPR-II (b)の局在は、すべての導管系を構成する細胞にのみ観察される。×50

BMPR-I, IIの局在は14日齢と同様、介在部、線条部を含むすべての導管系で認められ、腺房ではみられなかった(図10-a, b)。

6. 生後50日齢

生後50日齢になると顎下腺は、細胞が密に配列する腺房と顆粒性導管を含む発育した導管系から構成され、ほぼ成熟した組織像を呈していた。(図11, 12)。

BMP-2の局在は導管系にのみ認められ、腺房では21日齢と同様に観察されなかった。導管系におけるBMP-2の局在は介在部、顆粒性導管、線

条部を含むすべての導管系にみられた(図11-a)。また、BMP-4の局在は、顎下腺を構成するすべての細胞に確認されなかった(図11-b)。BMP-7の局在は、BMP-2と同様に導管系にのみ認められたが、介在部ではみられなかった(図11-c)。

BMPR-IとBMPR-IIの局在は類似しており、両者の発現は導管系(介在部、顆粒性導管、線条部)のみに認められ、腺房では確認されなかった。(図12-a, b)。

なお、顎下腺の発育に伴うBMP-2, -4, -7およびBMPR-I, -IIの局在の推移を図13に示す。

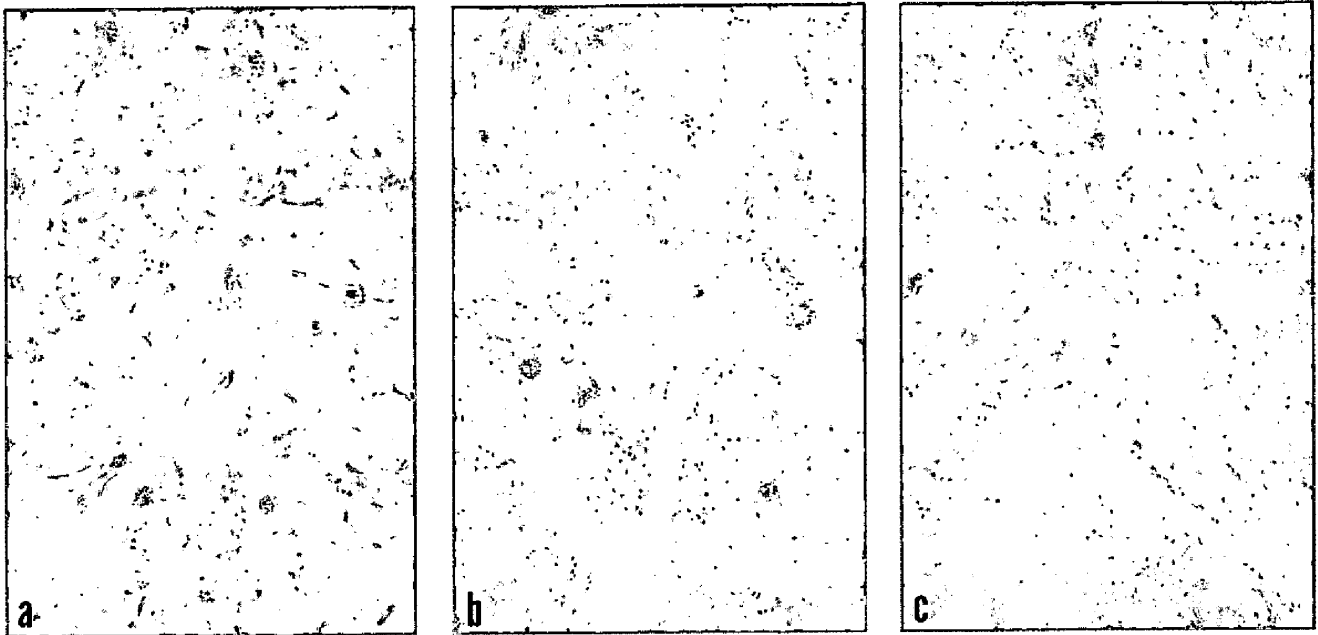


図9 生後21日齢 抗BMP反応像

- a : BMP-2の局在は、線条部、介在部で観察されるが、腺房は認められない。 ×50
 b : BMP-4の局在は腺房、導管系ともに認められない。 ×50
 c : BMP-7の局在は、線条部、介在部で観察される。 ×50

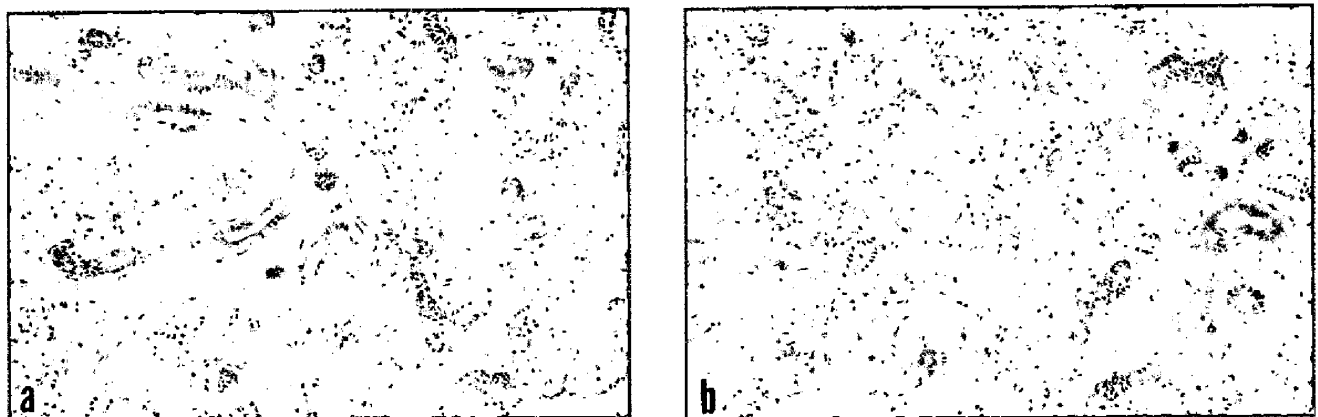


図10 生後21日齢 抗BMPR反応像

- BMPR-I (a), BMPR-II (b)の局在は、導管系に認められるが、腺房では観察されない。 ×50

考 察

これまで、唾液腺の成長発育における細胞増殖因子の動態を検索した報告²²⁻²⁷⁾は数多くみられるが、腺細胞の分化に関連する報告はほとんどない。また、*in vitro*における細胞増殖因子の添加実験で、腺細胞の分化やアミラーゼ分泌などの形態変化や機能発現を検索した報告^{28,29)}はみられるが、必ずしも*in vivo*における局在や発現と一致をみない。

近年、唾液腺における各種BMPとその受容体

の存在^{17,18)}やmRNAの発現¹⁹⁻²¹⁾が検索され始め、唾液腺とBMPの関連性が検討されている。しかし、Jaskollら¹⁷⁾の報告では観察期間が胎生期に限局され、Kawaguchiら²⁰⁾の報告においても、成獣ラットにおける各BMPmRNAの定量的解析のみで、唾液腺の形態形成におけるBMPの関与については検索されていない。したがって、本研究はBMPファミリーが、ラット顎下腺の成長発育、特に腺細胞の分化や導管系の構築に、どのように関与するかを重点的に検討した。

一般的に各種BMPの作用や役割に関しては、

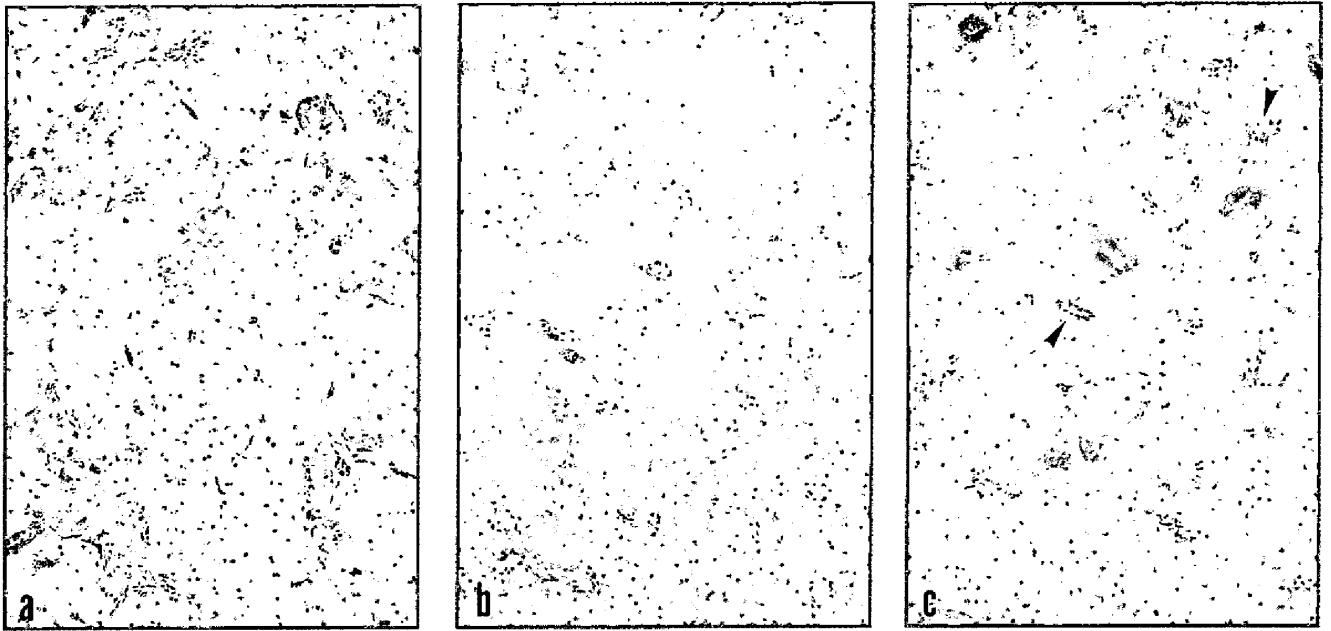


図11 生後50日齢 抗BMP反応像

a: BMP-2の局在は、すべての導管系細胞に認められる。×50

b: BMP-4の局在は観察されない。×50

c: BMP-7の局在は、顆粒性導管、線条部導管では観察されるが、介在部導管では認められない(矢頭)。×50

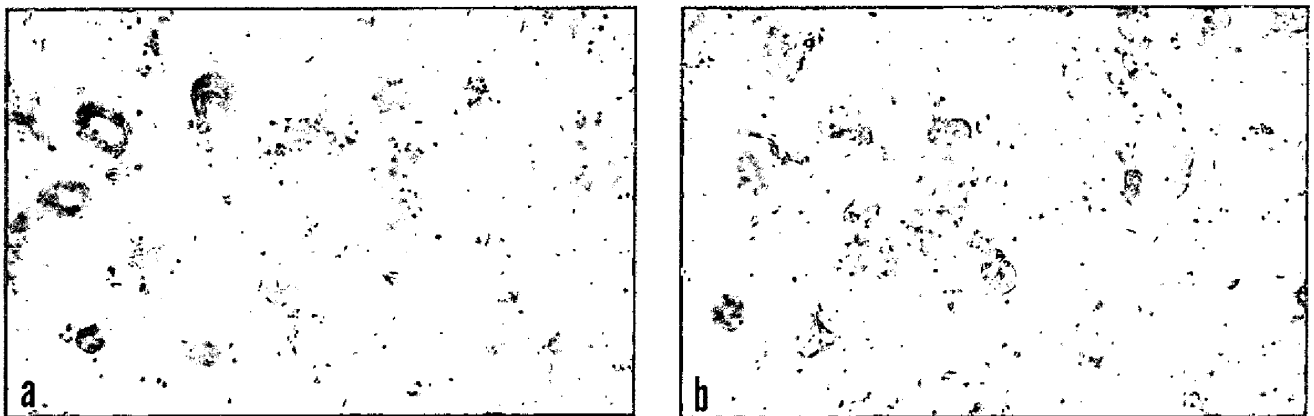


図12 生後50日齢 抗BMPR反応像

BMPR-I (a), BMPR-II (b)の局在は、介在部導管、顆粒性導管、線条部導管の細胞に観察される。×50

BMP-2は未分化な細胞の分化促進²⁾やアポトーシスの誘導⁷⁾などの作用をもつことが報告されている。一方、BMP-4は主として上皮間葉相互作用の器官発生に関与すること¹³⁻¹⁵⁾、神経堤細胞の移動や分化に関連すること¹¹⁾が報告され、BMP-7に関しては軟骨の形成過程においてコラーゲンを誘導すること³⁰⁾が報告されている。このように、BMPファミリーは多様な生物学的作用をもち、動物種によっても発現が異なることから、その作用は不明な点が多いのが現状である。

本研究結果によると、胎生20日齢から生後7日

齢までの腺房に、BMP-2およびBMP-4の陽性細胞が確認された。この結果は未分化な細胞が腺細胞に分化し、成熟した腺房を形成する過程にBMP-2、-4両者が関与すると考えられる。BMPはTGF- β スーパーファミリーに属するタンパクである。ラット顎下腺におけるTGF- β の局在^{26,31)}と本研究結果とを比較すると、レセプターの発現は両者とも未分化な腺房に発現している。一方、そのリガンドはTGF- β では腺細胞に確認されず、BMPは未熟な腺細胞で発現がみられた。このことは、BMPがautocrine的に作用する結果であり、

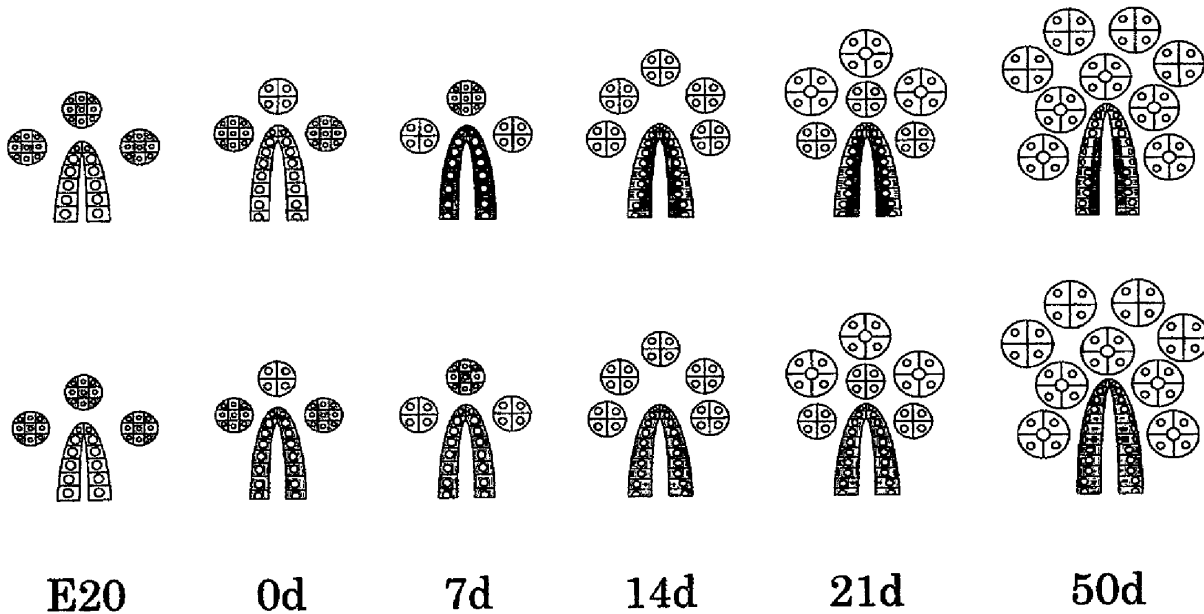


図13 顎下腺の発育に伴うBMP(上段)およびBMPR(下段)の推移

□ : BMP-2 ■ : BMP-4
 ■ : BMP-7 ■ : BMPR-I, -II

腺細胞の分化にBMPはTGF- β と比較して、より重要であることが明らかとなった。

また、腺細胞の分化におけるBMP-2, -4の関連性についてみると、胎生20日齢では、BMP-4陽性細胞はBMP-2陽性細胞に比べ多く観察され、増齢に伴いBMP-2陽性細胞は増加したが、BMP-4陽性細胞は減少傾向を示した。その後、生後14日齢ではBMP-2, -4陽性細胞は観察されなくなった。発生初期のラット顎下腺腺房は、terminal tubule cell (TT cell), proacinar cell (PA cell), acinar cell (A cell) の三種類の分泌細胞より構成される^{32, 33)}。その後、成長発育に伴いTT cellは徐々に減少し、介在部導管細胞へと移行する³⁴⁾。また、PA cellは出生直後には増加傾向を示すが、A cellへと分化することにより、その数は減少する^{34, 35)}。BMP-2陽性細胞とBMP-4陽性細胞の増減とこれらの報告^{34, 35)}とから考えると、顎下腺の発生初期に存在するTT cellのtransformに関与する因子がBMP-4であり、PA cellのA cellへの分化に関連する因子がBMP-2であることが示唆された。また、成熟した顎下腺において、A cellの分化は介在部導管の細胞が担っている^{36, 37)}。本研究結果では、生後14日齢より介在部導管に弱い抗BMP-2陽性反応が出現し、生後50日齢まで

持続していた。すなわち、これらの事象は、A cellの分化を引き起こす因子がBMP-2であることを示す結果であると考えられる。

導管系における細胞増殖因子の局在についての報告²²⁾は多数みられる。なかでも、マウスやラットなど齧歯類の導管系に特徴的な顆粒性導管部には、EGF²³⁾を初めとしてNGF²³⁾, IGF²⁴⁾, TGF- α ²⁵⁾, - β ²⁶⁾, HGF²⁷⁾など多数の細胞増殖因子が産生されることが指摘されている。本研究結果からも、顎下腺の導管系の構築が進むにつれ、導管系を構成する細胞でBMP-2, -7の産生が確認された。このことは、ラット顎下腺の導管系の発育に伴い、顆粒性導管、線条部導管、排泄管導管といった形態的、機能的にも異なった様々な細胞への分化を促進するために、BMP-2, -7の供給が必要である可能性を推測させる結果である。また、前述した多くの細胞増殖因子の存在が指摘されていることから、ラット顎下腺の導管系における細胞分化や各部位の構築、成熟後のターンオーバー等による形態維持や機能保持には、BMP-2, -7が他の増殖因子と相補的に関与しているとも考察される。

しかし、生後50日齢の介在部導管におけるBMP-2, -7の反応性は異なっていた。つまり、

BMP-2の陽性反応は、生後14日齢より50日齢まで介在部導管を含むすべての導管系に観察された。これに対して、BMP-7は生後7日齢から21日齢までは、BMP-2と同様に、すべての導管系で陽性反応が確認されたが、50日齢では介在部導管のみが陰性となった。この結果からBMP-2、と-7の作用の違いを考えると、前述のごとくBMP-2は、PA cellがA cellに分化する際に必要な因子であり、腺房が成熟したのちは、介在部導管の細胞がA cellに分化することに関与していると考えられる。したがって、本研究の観察期間より以降も介在部導管にはBMP-2が発現し続けることが予想される。

一方、ラット顎下腺の導管系の発育および構築は、生後7週における顆粒性導管の出現において、ほぼ完成をみる^{32,33)}。生後50日齢でBMP-7の局在が介在部導管の細胞に観察されなかったことは、BMP-7は介在部導管以外の導管系での細胞増殖と各部（顆粒性導管、線条部導管、排泄管導管）の分化に関与する因子であることを示唆する結果であると思われる。この点については、観察結果からみる限りBMP-2の関与も否定はできない。

近年、ラットの顎下腺から産生されるEGFが消化管より吸収され、胃や食道の粘膜上皮の防御や修復、再生を促進するという報告^{38,39)}がなされたことは興味深い。また、Naritaら⁹⁾により、BMP-2が胃腺の形成に深く関連することが報告されている。この報告と本研究結果を考え合わせると、導管系細胞が産生するBMPの機能は、単に導管系細胞の増殖や分化にとどまらず、唾液を介して放出され、消化管で再吸収されることにより、上皮系、軟骨や骨といった多くの組織、器官の再生、治癒に何らかの影響を有する可能性も伺える。

また、*in vivo*におけるBMPRの局在に関しては、関節軟骨⁴⁰⁾や心臓⁴¹⁾、腎臓⁴²⁾、歯¹⁶⁾などで報告されているが、これらの報告は一種類のBMPRの分布や発現を検索したものであり、これまでBMPR-I、-II両者の発現時期や局在を比較した報告はない。しかし、二種類のレセプターは単独では、リガンドとそれほど強い結合性をもたず、両者の存在下で初めて高い親和性でリガンドに結

合する⁴³⁾ことが*in vitro*の実験から明らかにされたことから、二種類のBMPRの発現を検索し、比較検討する必要があると考えた。その結果、ラット顎下腺の成長発育におけるBMPR-I、-IIの発現状況は、図13に示すごとく、発現時期、発現部位ともに一致していた。このことは、先に述べた*in vitro*の実験結果と同様に、二つのレセプターが同時に発現し、高い結合活性を発揮するということを裏付ける結果である。したがって、腺房における各細胞の分化や導管系細胞の分化には、BMPR-IおよびBMPR-IIの両者が発現し、各リガンドとより強力に結合することが示唆された。

結 論

胎生20日齢から生後50日齢までのラット顎下腺の成長発育におけるBMPおよびその受容体の局在について免疫組織化学的に検索し、以下の結論を得た。

1. BMP-2の局在は、胎生20日齢の顎下腺において腺房様細胞集団の一部の細胞に認められた。生後0日齢では腺房における抗BMP-2陽性細胞は増加したが、14日齢では消失、代わって導管系を構成する細胞にのみBMP-2の局在が確認された。

2. BMP-4の局在は、胎生20日齢において腺細胞の一部に観察されたが、その後減少し、生後14日齢以降、腺房、導管系ともに認められなかった。

3. BMP-7の局在は、生後7日齢から導管系に認められ、増齢に伴いその反応性は増強した。生後50日齢では介在部を除くすべての導管系にBMP-7の局在がみられた。一方、腺房は観察期間を通してBMP-7の局在は確認されなかった。

4. BMPR-Iおよび-IIの局在は観察期間を通して類似しており、胎生20日齢では、腺房様細胞集団の一部で認められたが、生後14日齢以降、腺房では観察されなかった。また、導管系においては生後0日齢よりBMPR-I、-IIの局在がみられ、その後、介在部、線条部を含むすべての導管系に両者の局在が認められた。

以上のことから、BMPおよびその受容体はラット顎下腺の形態形成に深く関与することが明らかと

なった。また、腺房の発育にBMP-2, -4が、導管系の発育にはBMP-2, -7が重要な役割を担うことが示唆された。一方、BMP-2, -4, -7のシグナル伝達には、BMPR-I, -IIの二種のレセプターが発現することが示された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました奥羽大学歯学部生体構造学講座口腔組織学分野山本茂久教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究を遂行するにあたり、御協力をいただいた教室員各位に感謝いたします。

本論文の要旨は、日本解剖学会第49回東北・北海道連合支部学術集会（平成15年9月 盛岡）、第58回日本口腔科学会総会（平成16年5月 横浜）、日本解剖学会第50回東北・北海道連合支部学術集会（平成16年10月 札幌）、第39回奥羽大学歯学会（平成17年6月 郡山）、第47回歯科基礎医学会（平成17年9月 仙台）において発表した。

文 献

- 1) Urist, M. R. : Bone : Formation by autoinduction. *Science* **150** ; 893-899 1965.
- 2) 山口 朗 : 間葉系細胞の分化過程におけるBMPの役割. *J Hard Tissue Biol* **5** ; 63-65 1996.
- 3) Shou, J., Rim, P. C. and Calof, A. L. : BMPs inhibit neurogenesis by a mechanism involving degradation of a transcription factor. *Nat Neurosci* **2** ; 339 1999.
- 4) Macias, D., Ganam, Y., Sampath, T. K., Piedra, M. E. *et al.* : Role of BMP-2 and OP-1 (BMP-7) in programmed cell death and skeletogenesis during chick limb development. *Development* **124** ; 1109-1117 1997.
- 5) Suzuki, A., Thies, R. S., Yamaji, N., Song, J. J. *et al.* : A truncated bone morphogenetic protein receptor affects dorsal-ventral patterning in the early *Xenopus* embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* **91** ; 10255-10259 1994.
- 6) 別府秀幸 : マウス発生におけるBMPシグナル伝達分子の作用. *Molecular Medicine* **37** ; 648-653 2000.
- 7) Niswander, L. and Martin, G. R. : FGF-4 and BMP-2 have opposite effects on limb growth. *Nature* **361** ; 68-71 1993.
- 8) Takahashi, H. and Ikeda, T. : Transcripts for two members of the transforming growth factor- β superfamily BMP-3 and BMP-7 are expressed in developing rat embryos. *Dev Dyn* **207** ; 439-449 1996.
- 9) Narita, T., Saitoh, K., Kameda, T., Kuroiwa, A. *et al.* : BMPs are necessary for stomach gland formation in the chicken embryo : a study using virally induced BMP-2 and Noggin expression. *Development* **127** ; 981-988 2000.
- 10) Monzen, K., Shiojima, I., Hiroi, Y., Kudoh, S. *et al.* : Bone morphogenetic proteins induce cardiomyocyte differentiation through the mitogen-activated protein kinase kinase TAK1 and cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4. *Mol Cell Biol* **19** ; 7096-7105 1999.
- 11) Mehler, M. F., Mabie, P. C., Zhu, G., Gokhan, S. *et al.* : Developmental changes in progenitor cell responsiveness to bone morphogenetic proteins differentially modulate progressive CNS lineage. *Dev Neurosci* **22** ; 74-85 2000.
- 12) Schneider, C., Wicht, H., Enderich, J., Wegner, M. *et al.* : Bone morphogenetic proteins are required *in vivo* for the generation of sympathetic neurons. *Neuron* **24** ; 861-870 1999.
- 13) Cain, J. E., Nion, T., Jeulin, D. and Bertram, J. F. : Exogenous BMP-4 amplifies asymmetric ureteric branching in the developing mouse kidney *in vitro*. *Kidney International* **67** ; 420-431 2005.
- 14) Weaver, M., Yingling, J. M., Dunn, N. R., Belusci, S. *et al.* : Bmp signaling regulates proximal-distal differentiation of endoderm in mouse lung development. *Development* **126** ; 4005-4015 1999.
- 15) Vainio, S., Karavanova, I., Jowett, A. and Thesleff, I. : Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell* **75** ; 45-58 1993.
- 16) 中田智子 : マウス歯胚におけるBMP-2およびBMPR-1Bの遺伝子発現—two-color FISH法を用いた検索—. *日大歯学* **75** ; 318-326 2001.
- 17) Jaskoll, T., Zhou, Y. M., Chai, Y., Makarenkova, H. P. *et al.* : Embryonic submandibular gland morphogenesis : Stage-specific protein localization of FGFs, BMPs, Pax6 and Pax9 in normal mice and abnormal SMG phenotypes in *FgfR2-IIIc^{+/-}*, *BMP7^{-/-}* and *Pax6^{-/-}* mice. *Cells Tissues Organs* **170** ; 83-98 2002.
- 18) Thomadakis, G., Ramoshebi, L. N., Crooks, J., Rueger, D. C. *et al.* : Immunolocalization of bone morphogenetic protein-2 and -3 and osteogenic protein-1 during murine tooth root morphogenesis and in other cranio-facial structures. *Eur J Oral Sci* **107** ; 368-377 1999.
- 19) Heikinheimo, K. A., Laine, M. A., Ritvos, O. V.

- P., Voutilainen, R. J. *et al.* : Bone morphogenetic protein-6 is a marker of serous acinar cell differentiation in normal and neoplastic human salivary gland. *Cancer Res* **59** ; 5815-5821 1999.
- 20) Kusafuka, K., Yamaguchi, A., Kayano, T., Fujiwara, M. *et al.* : Expression of bone morphogenetic proteins in salivary pleomorphic adenomas. *Virchows Arch* **432** ; 247-253 1998.
- 21) Kawaguchi, M., Sawaki, K., Wang, Y. H., Okubo, M. *et al.* : The basic research for developing methods of diagnosis and examination of the function of salivary glands : Existence and characterization of BMP and lactoferrin and their receptors in salivary glands. *Bull Tokyo Dent Coll* **44** ; 127-128 2003.
- 22) 天野 修, 井関尚一 : 唾液腺における細胞増殖因子の発現と局在. *解剖誌* **76** ; 201-212 2001.
- 23) Watson, A. Y., Anderson, J. K., Siminoski, K., Mole, J. E. *et al.* : Cellular and subcellular colocalization of nerve growth factor and epidermal growth factor in mouse submandibular glands. *Anat Rec* **213** ; 365-376 1985.
- 24) 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.
- 25) Wu, H. H., Kawamata, H. and Wang, D. D. : Immunohistochemical localization of transforming growth factor α in the major salivary glands of male and female rats. *Histochem J* **25** ; 613-618 1993.
- 26) 安部仁晴, 中川敏浩, 土肥宏樹, 臼井龍一ほか : ラット顎下腺の成長発育に伴うTGF- β の局在. *奥羽大歯学誌* **26** ; 111-116 1999.
- 27) Amano, O., Matsumoto, K., Nakamura, T. and Iseki, S. : Expression and localization of hepatocyte growth factor in rat submandibular gland. *Growth Factors* **10** ; 145-151 1994.
- 28) 田中徳昭 : 唾液腺培養細胞の腺房細胞への分化における細胞内シグナル伝達に関する研究. *阪大歯学誌* **45** ; 1-14 2001.
- 29) 東 雅之 : 唾液腺の構築と再生の基礎的研究. *口腔組織培養学会誌* **8** ; 95-108 1999.
- 30) 野田政樹, 二藤 彰, 辻 邦和, 山下照仁ほか : Noggin, ヘッジホッグ, BMPと骨・軟骨形成. *Molecular Medicine* **37** ; 654-661 2000.
- 31) 藤山正之 : ラット唾液腺の発育に伴うTGF- β 受容体の局在. *奥羽大歯学誌* **25** ; 32-46 1998.
- 32) Gresik, E. W. : Postnatal developmental changes in submandibular glands of rats and mice. *J Histochem Cytochem* **28** ; 860-870 1980.
- 33) Yamashina, S. and Barka, T. : Development of endogenous peroxidase in fetal rat submandibular gland. *J Histochem Cytochem* **21** ; 42-50 1973.
- 34) 井口雅夫 : 離乳期におけるrat顎下腺terminal tubule cellの形態的变化. *神奈川歯学* **21** ; 99-119 1986.
- 35) 小園 知, 佐藤一芳, 田上英明 : ラット顎下腺のproacinar cell. *神奈川歯学* **16** ; 328-329 1981.
- 36) 林 弘之 : マウス顎下腺介在部細胞の分化について. *神奈川歯学* **21** ; 332-349 1986.
- 37) 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.
- 38) 今井新平 : 上皮細胞増殖因子 (EGF) の胃粘膜防御および修復作用に関する研究—顎下腺摘出ラットにおける内因性, 外因性EGFの検討—. *名市大医誌* **46** ; 85-96 1995.
- 39) 藤原靖弘, 樋口和秀, 浜口正輝, 高島隆ほか : ラット食道炎モデルにおけるEpidermal growth factor receptor, Transforming growth factor- α の動態. *実験潰瘍* **29** ; 1-4 2002.
- 40) Yamamoto, T. : Immunohistochemical localization of bone morphogenetic proteins and their receptors in rat and human articular cartilage. *Med J Kagoshima Univ* **50** ; 123-131 1999.
- 41) Schneider, M. D., Gaussin, V., Zwijsen, A., Huylebroeck, D. *et al.* : Conditional, heart-specific deletion unmasks multiple roles for the BMP receptor ALK3 in cardiac organogenesis. *Japanese Circulation J* **65** ; 46 2001.
- 42) Martinez, G., Mishina, Y. and Bertram, J. F. : BMPs and BMP receptors in mouse metanephric development : *in vivo* and *in vitro* studies. *Int J Dev Biol* **46** ; 525-533 2002.
- 43) 藤井万紀子, 宮園浩平 : BMPのレセプターとSmadを介する細胞内シグナル伝達系. *Molecular Medicine* **37** ; 640-647 2000.

著者への連絡先 : 色井亮仁, (〒963-8611) 福島県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 : Akihito IROI, Division of Oral Histology, Department of Morphological Biology, Ohu University School of Dentistry.

31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, Fukushima, 963-8611, Japan