

# マウス顎下腺における Jmjd3 の発現と局在の変化

齋藤 敦史

## Postnatal Changes in the Expression and Localization of Jmjd3 in the Mouse Submandibular Gland

Atsushi SAITO

日本歯科大学大学院生命歯学研究科歯科基礎系専攻

(指導：菊池 憲一郎教授)

The Nippon Dental University

Graduate School of Life Dentistry at Tokyo

(Supervisor: Prof. Ken-ichiro KIKUCHI)

(2023 年 2 月)

この論文の内容は、つぎの形式で公表した。

論文題名 : Postnatal Changes in the Expression and Localization of  
Jmjd3 in the Mouse Submandibular Gland

雑誌名 : Journal of Hard Tissue Biology (Vol. 32, No. 1, 2023, in press)

著者名 : Atsushi Saito, Kanji Hirashima, Rie Ikeda, Kiyomi Ogawa,  
Sumie Sato and Ken-ichiro Kikuchi

この論文を齋藤敦史の博士(歯学)学位論文として提出することを承諾します。

平島 寛司 印

池田 利恵 印

小川 清美 印

佐藤 住美江 印

菊池 憲一郎 印

## 目次

抄錄.....	1
緒言.....	1
方法.....	2
結果.....	5
考察.....	8
謝辭.....	10
参考文献.....	11

# マウス顎下腺における Jmjd3 の発現と局在の変化

## 抄 録

顎下腺は上皮-間葉相互作用によって発生し、出生時には腺房と導管は未成熟な状態であるが、生後に腺房と導管の増殖と分化が起こる。唾液腺初期発生へのヒストン修飾を介したエピジェネティック修飾に関する報告はほとんど認められない。本研究では、生後早期のマウス顎下腺発育に対する H3K27me3 関連エピジェネティック修飾の関与を明らかにするため、Jumonji-domain containing 3 (Jmjd3) の発現や局在の変化について検討を行った。

生後 0 日から 10 週のマウス顎下腺を用いて、形態学的解析、免疫組織学的解析および分子生物学的解析を行った。

生後 0 日ではマウス顎下腺は豊富な結合組織の中に終末部と導管が存在した。生後 7 日に顎下腺の導管細胞の増殖と分化がピークを迎え、生後 28 日以降は成体と類似した構造を示すことが明らかとなった。Jmjd3 陽性細胞は生後 0 日では結合組織中に多く出現するが、生後 7 日以降は導管に多数認められ、その後の顎下腺の発達に伴い、存在部位に関わらず著しく減少することが明らかになった。Jmjd3 の mRNA 発現量も生後 7 日までは増加したものの、生後 14 日以降は減少する傾向を示した。

本研究の結果より、出生後早期のマウス顎下腺組織形態の成長・分化と Jmjd3 発現と局在の著しい変化が同時に起こることが明らかとなり、顎下腺組織形成時にヒストン H3K27me3 脱メチル化によるエピジェネティック修飾が行われている可能性が示唆された。

## 緒 言

唾液腺は口腔環境の維持に不可欠な唾液の分泌を担う器官である。大唾液腺の一つである顎下腺は、唾液を産生する腺房、唾液を外部に流出させる導管、それらの間を埋める結合組織で構成される。マウス顎下腺の発生は胎生 11.5 日頃、口腔の上皮細胞と間葉細胞の相互作用によって始まる。顎下腺は出生時には、腺房も導管も未成熟な状態であるが、生後に腺房と導管の増殖と分化が起こる<sup>1-4)</sup>。Aquaporin5 (AQP5) は唾液分泌に重要な役割を果たしており<sup>5-7)</sup>、唾液中に分泌される消化酵素である Amylase 1 (Amy1)<sup>4)</sup> と併せて唾液腺マーカーとして用いられている。Cytokeratin 14 (KRT14) は導管細胞のマーカーである<sup>8-10)</sup>。また、唾液腺発生時に Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) を発現する増殖細胞が出現する<sup>1)</sup>。

エピジェネティクスとは、DNA やヒストンへの後天的な化学修飾を通して塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現が制御される仕組みである。エピジェネティクスの主要な制御機構は DNA のメチル化とヒストン修飾であり、後者はヒストンタンパク質のアセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化などのエピジェネティック修飾によりクロマチン構造を変化させ、遺伝子転写を調節することができる。ヒストン H3 のリジン 27 (H3K27)は、可逆的なメチル化修飾を受けられる部位の一つであり、この H3K27 のトリメチル化(H3K27me3)修飾によって器官形成の制御が行われる例として、唾液腺と同じ外分泌腺である膵臓や乳腺などが知られている<sup>11, 12)</sup>。ヒストンリジンのメチル化酵素として enhancer of zeste homolog 1 (Ezh1)と enhancer of zeste homolog 2 (Ezh2)が、脱メチル化酵素として Jumonji C-domain をもつ Jumonji-domain containing3 (Jmjd3, also known as KDM6B) と Ubiquitously Transcribed Tetratricopeptide Repeat Protein X-Linked (UTX, also known as KDM6A)がある<sup>13, 14)</sup>。Jmjd3 と UTX は発生、細胞可塑性、免疫系、神経変性疾患、および癌の発生に関与するとの報告がある<sup>15)</sup>。また、Jmjd3 は transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )を介して上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition: EMT)を促進し、組織再生や臓器の線維化、癌の転移や浸潤に関与することが明らかとなった<sup>16)</sup>。唾液腺初期発生へのエピジェネティック機構の関与は DNA のシトシンメチル化が報告されているものの<sup>17)</sup>、ヒストン修飾を介したエピジェネティック修飾の例は知られていない。本研究では、マウス顎下腺発育に対する H3K27me3 関連エピジェネティック修飾の関与を明らかにするため、Jmjd3 の発現や局在の変化について検討を行った。

## 方 法

実験動物は雌性 C57BL/6Jcl 仔マウスを用いた。離乳期までは母マウスと共に飼育し、実験の都度、外生殖器の形態から雌性仔マウスを使用した。実験動物は日本歯科大学生命歯学部生物科学施設で温度  $23 \pm 1$  °C、湿度 40 - 60%、12 時間明暗環境下で固形飼料(CE-2、日本クレア)を与え、水を自由に摂取させて飼育した。出生時を生後 0 日とし、生後 0 日、7 日、14 日、21 日、28 日および 10 週の雌の左右の顎下腺を採取した。左側顎下腺から、Total RNA とタンパク質を抽出した。右側顎下腺は、以下の方法でパラフィン包埋試料を作製し、組織学的検討と抗 Jmjd3 抗体による免疫組織学的検討に用いた。10%中性緩衝ホルマリンで 18 ~24 時間浸漬固定後、通法に従いアルコール系列で脱水、透徹、パラフィンに包埋した。本実験は日本歯科大学生命歯学部動物実験委員会による審査と承認を受け(承認番号: 19-24-7)、日本歯科大学生命歯学部動物実験規程に従って実施した。

### **形態学的解析**

厚さ 5  $\mu$ m のパラフィン切片を作製し、脱パラフィン、蒸留水で洗浄後、形態観察のためのヘマトキシリン・エオジン(HE)染色や酸性ムコ多糖類検出のための Alcian Blue(AB)染色(pH2.5)、中性ムコ多糖類検出のための Periodic acid-Schiff(PAS)染色を施した後、光学顕微鏡 (fluorescence microscope BZ-X800, KEYENCE, Osaka, Japan)を用いて観察・撮影を行った。

### **抗 Jmjd3 抗体による免疫組織学的解析**

顎下腺での Jmjd3 の局在を明らかにする目的で、抗 Jmjd3 抗体を用いた免疫染色を行った。厚さ 5  $\mu$ m のパラフィン切片を用い、脱パラフィンした後、内因性ペルオキシダーゼ阻害のために 3%過酸化水素加メタノールにて 15 分間処理した。0.01 M phosphate buffer saline (PBS)(pH 7.2-7.4)にて 5 分間 3 回洗浄し、非特異的反応阻害のために Histofine Simple stain SAB-PO (R)キット (ニチレイバイオサイエンス株式会社, Tokyo, Japan) の 10%正常ヤギ血清で 30 分反応させた。PBS で 5 分間 3 回洗浄後に、1 次抗体 Rabbit anti human JMJD3 polyclonal antibody [C2], C-term (1:1000, GTX124222, GeneTex, CA, USA)で 4  $^{\circ}$ Cで一昼夜、抗原抗体反応を行った。PBS で 5 分間 3 回洗浄後に、Histofine Simple stain mouse MAX PO(R)で 30 分反応させた。PBS で 5 分間 3 回洗浄後に、Histofine Simple stain DAB 溶液(ニチレイバイオサイエンス株式会社, Tokyo, Japan)で 8 分間処理した。蒸留水洗浄後、ヘマトキシリンで核染色、脱水、透徹、封入を行い、光学顕微鏡で観察した。なお、一次抗体との反応のみ 4  $^{\circ}$ Cで行い、他の反応は室温下で実施した。また、ネガティブコントロールとして、一次抗体の代わりに正常ウサギ血清あるいは PBS を用いて、同様の方法で染色を行った。

### **Jmjd3 陽性細胞出現率算出**

抗 Jmjd3 抗体陽性細胞出現率算出のために、各日(週)齢 3 個体から得られた標本を用いた。抗 Jmjd3 抗体で免疫染色を施した 1 切片あたり、無作為に 5 ヶ所を抽出し、ImageJ Fiji (the Research, Service Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA)<sup>18)</sup>にて、一面積 ( $1 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ ) 当たりの抗 Jmjd3 陽性細胞数および陰性細胞数を計測した。得られたデータから、顎下腺を構成する終末部または腺房、導管および結合組織における抗 Jmjd3 抗体陽性細胞出現率を算出し、平均値  $\pm$  標準誤差で示した。抗 Jmjd3 抗体陽性細胞出現率の測定の結果は、Kruskal-Wallis test と Steel-Dwass test (IBM SPSS Statistics, Tokyo, Japan, KyPlot 6.0, KyensLab Inc., Tokyo, Japan) にて統計学的解析を行い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

## 定量RT-PCR

Total RNA を TRIzol<sup>®</sup> Reagent (15596026, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) 処理で抽出後、ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT kit (FSQ-101, TOYOBO, Tokyo, Japan) を用いて RT-PCR を行った。定量 PCR は THUNDERBIRD<sup>®</sup> SYBR qPCR Mix (QPX-201, TOYOBO, Tokyo, Japan) を用い、StepOnePlus (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) にて 95 °C の denaturation 5 秒、60-63 °C の annealing 15 秒の反応を 40 サイクル行い、*Jmjd3*、*AQP5*、*Amy1*、*PCNA*、*KRT14*、*UTX* について Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) を内部コントロールとして発現量を測定した。各プライマーは、NCBI Gene より入手したリファレンス配列を参考に、Primer-BLAST を用いて設計した。用いたプライマーの配列を Table 1 に示す。*GAPDH* プライマーは *Jmjd3*、*AQP5*、*Amy1*、*PCNA*、*KRT14* には No.1 の配列を、*UTX* には No.2 の配列を用いた。全ての qPCR ではサンプルをトリPLICATEで測定し、データ解析は  $\Delta\Delta CT$  法にて行った。結果は平均値  $\pm$  標準誤差で表記し、データは KaleidaGraph5 (HU links, Tokyo, Japan) を用いて統計解析を行った。統計解析では one-way analysis of variance (ANOVA) と、事後検定に Bonferroni test を行い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

Table 1. Primer sequences for qRT-PCR

Gene	Forward	Reverse
<i>Jmjd3</i>	5'-ggagagcaaacgagatgcct-3'	5'-tacggacctccaccgtatgt-3'
<i>Aquaporin5</i>	5'-ggccctcttaatagcaacc-3'	5'-ttgctggtgtgtgtgtt-3'
<i>Amylase1</i>	5'-gactttcctggagttccctatc-3'	5'-ctgagcagcatcttggtagt-3'
<i>PCNA</i>	5'-ctagccatgggcgtgaac-3'	5'-gaatactagtctaaggtgtctgcatt-3'
<i>KRT14</i>	5'-atcgaggacctgaagagcaa-3'	5'-tcgatctgcaggaggacatt-3'
<i>UTX</i>	5'-tattggcccaggtgactgtgaa-3'	5'-cagatctccaggtcgctgaataaac-3'
<i>GAPDH</i> (No.1)	5'-ggagaaacctgccaagtatga-3'	5'-tcctcagtgtagcccaaga-3'
<i>GAPDH</i> (No.2)	5'-gtcttcaccaccatggagaagg-3'	5'-ctaagcagttggtggtgcagga-3'

## SDS-PAGE とウエスタン・ブロッティング法

タンパク質は TRIzol<sup>®</sup> Reagent で total RNA を抽出した後の顎下腺から、イソプロパノール、0.3 M グアニジン塩酸/99.5%エタノール溶液を用いて抽出した。タンパク質は 1% SDS 溶液に溶解させ、Pierce<sup>™</sup> BCA Protein Assay Kit(23225, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) で濃度を測定し、200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となるよう 1% SDS buffer で希釈した。タンパク質は 4 $\times$  Laemmli buffer(1610747, Bio-Rad, CA, USA) と混和して lysis し、10% TGX FastCast アクリルアミドゲル(1610173, Bio-Rad, CA, USA) を用いて 150 V の定電圧で SDS-PAGE を行った後、転写装置 Trans-blot

Turbo (1704273J7, Bio-Rad, CA, USA)と転写バッファー(10026938, Bio-Rad, CA, USA)を使用して高分子タンパク質転写モードでPVDFメンブレン(1620174, Bio-Rad, CA, USA)へ転写した。メンブレンはEveryBlot Blocking Buffer(12010020, Bio-Rad, CA, USA)でブロッキング後、ウサギ抗マウス JMJD3 ポリクローナル抗体 (GTX124222, GeneTex, CA, USA)、ウサギ抗マウス Histone H3 ポリクローナル抗体(9715, Cell Signaling Technology, MA, USA)、ウサギ抗マウス Histone H3K27me3 ポリクローナル抗体(GTX121184, GeneTex, CA, USA)、ローディングコントロールとして抗マウス GAPDH モノクローナル抗体(016-25523, 富士フイルム和光純薬, Osaka, Japan)を用いて 4 °Cで一昼夜の 1 次抗体反応(希釈倍率 1:2000)を行った。続いてメンブレンを 0.05% Tween20 含有 tris-buffered saline(TBS-T)で洗浄し、Horseshoe peroxidase 標識 2 次抗体 (SA00001-1 および SA00001-2, Proteintech, Manchester, UK)を用いた 2 次抗体反応(希釈倍率 1:4000)を室温で 2 時間行った。メンブレンは Clarity Western ECL Substrate(1705060, Bio-Rad, CA, USA) または Clarity Max Western ECL Substrate(1705062, Bio-Rad, CA, USA)で発色後、Ez-Capture MG CCD カメラシステム(ATTO, Tokyo, Japan)で画像を取得した。

## 結 果

### 形態学的解析 (Fig. 1)

#### 生後 0 日

HE 染色により、生後 0 日の顎下腺では豊富な結合組織の中に終末部と導管が認められた(Fig. 1A)。終末部を構成する一部の細胞の核上部細胞質が AB 染色陽性を示した(Fig. 1B)。また、終末部に PAS 染色に対して細胞質が陽性反応を示す細胞と PAS 染色陰性の細胞が混在していた(Fig. 1C)。

#### 生後 7 日

HE 染色により、生後 0 日と比較して多数の終末部と導管が認められた(Fig. 1D)。比較的狭い管腔を立方形の細胞が一層に囲む細い導管と、広い管腔を円柱形の細胞が一層並んで囲む太い導管がみられた。終末部を構成する細胞に AB 染色陽性反応が観察された(Fig. 1E)。終末部には PAS 染色に対して細胞質が強い陽性反応を示す細胞、核上部細胞質が蜂の巣状で PAS 染色陽性を示す細胞および少数の PAS 染色陰性の細胞が混在していた(Fig. 1F)。

#### 生後 14 日

HE 染色により、顎下腺は多数の終末部と導管で占められ、周囲をわずかな結合組織が取り囲む像が観察された(Fig. 1G)。終末部を構成する細胞のほとんどは AB 染色に陽性反応を示した(Fig. 1H)。また、終末部には、生後 7 日に引き続き、



PAS 染色に対して強い陽性反応を示す細胞と核上部細胞質が蜂の巣状の PAS 染色陽性を示す細胞が混在した(Fig. 1I)。

#### 生後 21 日

HE 染色により、顎下腺のほとんどの部分は多数の終末部と導管で占められ、結合組織はわずかに認められるのみとなった(Fig. 1J)。終末部を構成する細胞は AB 染色に陽性を示した(Fig. 1K)。また、終末部は、少数の PAS 染色に対して強い陽性の細胞と、大部分を占める核上部細胞質が蜂の巣状で PAS 染色陽性を示す細胞で構成されていた(Fig. 1L)。

#### 生後 28 日

HE 染色により、顎下腺は腺房と導管で構成され、成熟した顎下腺と類似する構造を示した。腺房は極めて狭い腺腔を楕円形の核を有する円錐状の腺房細胞が一層囲んでいた。また、単層立方上皮で構成される介在部導管と基底部にエオジンに染まる基底線条を有する円柱状の細胞で構成される線条部導管が明瞭に認められた(Fig. 1M)。腺房を構成する細胞は AB 染色に陽性を示した(Fig. 1N)。腺房細胞のほとんどは核上部細胞質が蜂の巣状で PAS 染色陽性を示す細胞であった(Fig. 1O)。

#### 生後 10 週

HE 染色により、成熟した顎下腺では腺房、介在部導管、線条部導管に加えて、導管を構成する細胞の一部に核上部細胞質がエオジンに染まる顆粒で満たされる円柱形の細胞が認められた(Fig. 1P)。腺房を構成する細胞は AB 染色に陽性を示した(Fig. 1Q)。腺房細胞は核上部細胞質が蜂の巣状で PAS 染色陽性を示した(Fig. 1R)。

#### ***Jmjd3* 陽性細胞の局在 (Fig. 2)**

生後 0 日の顎下腺では、結合組織に存在する多数の細胞の核が *Jmjd3* 陽性を示した(Fig. 2A)。さらに、導管を構成する一部の細胞と終末部の少数の細胞の核においても、*Jmjd3* 陽性細胞が認められた。生後 7 日には、導管を構成する細胞と結合組織に存在する一部の細胞の核で *Jmjd3* 陽性反応がみられた(Fig. 2B)。また、ごく少数の終末部の細胞の核にも陽性反応が認められた。生後 14 日と生後 21 日では、導管と結合組織に少数の *Jmjd3* 陽性細胞がみられた(Fig. 2C,D)。生後 28 日と 10 週(Fig. 2E,F)では、少数の導管細胞のみに *Jmjd3* 陽性細胞が認められた。

#### ***Jmjd3* 陽性細胞出現率 (Fig. 3)**

各日(週)齢における終末部と腺房、導管および結合組織の間で *Jmjd3* 陽性細胞出現率を比較した結果を Fig. 3 に示す。各日(週)齢における終末部と腺房、導管および結合組織の *Jmjd3* 陽性細胞出現率を以下に示す。生後 0 日ではそれぞれ

0.41±0.11%、11.01±1.00%、49.02±3.10%であった。生後7日ではそれぞれ0.11±0.06%、21.22±1.61%、12.71±2.20%、生後14日では0.00±0.00%、5.58±1.22%、2.22±2.22%、生後21日では0.00±0.00%、7.26±0.66%、2.16±1.04%、生後28日では0.00±0.00%、1.54±0.46%、0.00±0.00%、さらに10週では0.00±0.00%、0.41±0.28%、0.00±0.00%であった。生後0日では結合組織におけるJmjd3陽性細胞出現率が終末部および導管と比較して有意に高く、導管におけるJmjd3陽性細胞出現率は終末部よりも高かった(p<0.05)。生後7日のJmjd3陽性細胞出現率は、導管は終末部および結合組織と比較して高く(p<0.05)、結合組織は終末部よりも高かった(p<0.05)。生後14日以降は継続して、導管におけるJmjd3陽性細胞出現率が終末部および結合組織と比較して高かった(p<0.05)。また、終末部におけるJmjd3陽性細胞出現率は、生後14日以降は0.00±0.00%を示した。さらに、結合組織におけるJmjd3陽性細胞出現率は、生後28日以降は0.00±0.00%であった。

唾液腺を構成する終末部と腺房、導管および結合組織におけるJmjd3陽性細胞出現率の経時的变化を比較したところ、終末部と腺房におけるJmjd3陽性細胞出現率は、生後0日では0.41±0.11%で、生後14日以降と比較して有意に高かった(p<0.05 Fig.3では割愛した)。また、導管におけるJmjd3陽性細胞出現率は、生後7日では21.22±1.61%で、生後0日から10週までの間で最も高かった(p<0.05)。さらに、生後0日の結合組織におけるJmjd3陽性細胞出現率は49.02±3.10%で、生後0日から10週までの間で最も高かった(p<0.05、Fig.3では割愛した)。

#### 顎下腺における各種mRNAとタンパク質発現 (Figs. 4, 5)

定量RT-PCRによる各種mRNA発現量をFig.4に示す。Jmjd3は生後7日において有意に発現が上昇(p<0.05)し、以後は10週に至るまでほぼ一定の発現がみられた。Jmjd3は、生後0日では1.43±0.116、生後7日では2.12±0.224、生後14日では0.956±0.0533、生後21日では1.27±0.126、生後28日では1.58±0.155、10週では1.00±0.0650であった。唾液腺の腺房細胞腺腔側細胞膜に多く発現しているAQP5は、生後0日から生後14日まで低く発現していたが、生後21日以降10週に至るまで有意に発現が上昇した(p<0.05)。AQP5は、生後0日では0.345±0.0344、生後7日では0.541±0.0644、生後14日では0.508±0.0236、生後21日では0.983±0.0779、生後28日では1.01±0.0509、10週では1.00±0.0507であった。唾液腺が分泌する消化酵素Amy1は、生後0日、生後7日と比較し生後21日以降で有意に発現が上昇した(p<0.05)。Amy1は、生後0日では0.275±0.104、生後7日では0.354±0.144、生後14日では0.381±0.156、生後21日では0.903±0.369、生後28日では0.697±0.312、10週では1.00±0.447であった。細胞増殖のマーカであるPCNAは、生後7日と生後14日において有

意に高値を示した( $p < 0.05$ )。PCNA は、生後 0 日では  $1.50 \pm 0.0966$ 、生後 7 日では  $3.25 \pm 0.293$ 、生後 14 日では  $2.92 \pm 0.176$ 、生後 21 日では  $1.96 \pm 0.166$ 、生後 28 日では  $1.64 \pm 0.204$ 、10 週では  $1.00 \pm 0.0473$  であった。唾液腺の導管細胞や筋上皮細胞に発現する KRT14 は、生後 0 日から生後 14 日で 10 週と比較して有意に高値を示した( $p < 0.05$ )。KRT14 は、生後 0 日では  $2.45 \pm 0.204$ 、生後 7 日では  $3.42 \pm 0.367$ 、生後 14 日では  $2.47 \pm 0.258$ 、生後 21 日では  $2.14 \pm 0.202$ 、生後 28 日では  $1.76 \pm 0.166$ 、10 週では  $1.00 \pm 0.0832$  であった。Jmjd3 と同じくヒストン H3K27me3 の脱メチル化酵素である UTX は、生後 0 日から 10 週にわたって有意な発現変化を認めなかった。UTX は、生後 0 日では  $1.03 \pm 0.0848$ 、生後 7 日では  $0.895 \pm 0.0546$ 、生後 14 日では  $0.610 \pm 0.0671$ 、生後 21 日では  $0.564 \pm 0.0800$ 、生後 28 日では  $0.743 \pm 0.143$ 、10 週では  $1.00 \pm 0.161$  であった。

SDS-PAGE とウエスタン・ブロッティング法の結果から Jmjd3、H3 total と H3K27me3 は生後 0 日から 10 週に至るまでタンパク質発現が認められた(Fig. 5)。

## 考 察

マウス Jmjd3 遺伝子は 11pB3 に位置し、Jmjd3 タンパク質は 1641 アミノ酸からなる。Jmjd3 は H3K27me3 の特異的脱メチル化反応を触媒する酵素として同定され、H3K27me3 と H3K27me2 の H3K27me1 への変換を触媒する<sup>13)</sup>。この Jmjd3 の核局在は H3K27me3 の脱メチル化に重要であり、核への移行は Importin- $\alpha/\beta$ 、細胞質移行は Exportin-1 に依存するとする報告がある<sup>19)</sup>。膵臓では内胚葉由来の幹細胞が分化する過程で H3K27 がエピジェネティック修飾を受け、内分泌部と外分泌部が形成されるが、H3K27 メチル化酵素である Ezh2 および、脱メチル化酵素の Jmjd3 の働きで H3K27 のメチル化が調節を受けることで、Pancreatic progenitor は endocrine cell に分化する<sup>11)</sup>。乳腺では H3K27 の Ezh2 によるメチル化と UTX による脱メチル化により、Stem cell の維持や Alveolar cell または Mature luminal cell といった成熟細胞への分化が調節を受けることが知られている<sup>12)</sup>。このように膵臓や乳腺では、発生初期の幹細胞レベルから細胞の分化、組織形成に至る広い範囲で H3K27 メチル化/脱メチル化によるエピジェネティック修飾が行われている。しかし、唾液腺初期発生のメカニズムは未解明の部分が多く、エピジェネティック機構についてはごく最近 DNA のシトシンメチル化が報告されている<sup>17)</sup>が、ヒストン修飾を介するメカニズムに関する報告は知られていない。そこで本研究では、マウス顎下腺の発育過程における H3K27me3 関連エピジェネティック修飾の関与を明らかにするため、Jmjd3 の発現と局在の変化について検討を行った。

マウス顎下腺の発生には、上皮-間葉相互作用が関与し、胎生 11.5 日に口腔上皮が肥厚し、間葉側へ陥入することで始まる<sup>1)</sup>。陥入した上皮組織から上皮索と

球状の末端が形成され、発生が進むにつれて上皮索は導管細胞へと分化し、その後は分岐と伸長を繰り返すことにより分泌腺特有の枝分かれ構造を形成していく。出生時は未成熟な状態で、**terminal tubule (TT)**と呼ばれる構造と未分化な導管および結合組織で構成され、出生後に成長分化を起こす<sup>2,3,20</sup>。げっ歯類の出生時のTTは**TT cell**と**acinar cell**の前駆細胞と考えられる**proacinar cell**で構成されている<sup>20</sup>。TT cellは生後1~2週には増殖するが、その後、急激に減少する<sup>21,22</sup>。また、**proacinar cell**は生後1~2週の間には消失するが、この細胞は腺房細胞に分化すると考えられている<sup>20,23,24</sup>。さらに、**acinar cell**は生後2日から成体に至るまで、TTと腺房に存在が認められている<sup>21</sup>。PAS染色は、TTと腺房に存在する3種類の細胞を判別するためにしばしば用いられてきた<sup>20,21</sup>。TT cellは核上部細胞質が強い陽性反応を示し、**proacinar cell**は反応陰性、**acinar cell**は核上部細胞質が蜂の巣状でPAS染色陽性を示すと報告されている<sup>20,21</sup>。本研究でも生後0日の顎下腺では豊富な結合組織中に終末部と導管が認められ、PAS染色強陽性のTT cellとPAS染色陰性の**proacinar cell**がTTに存在していた。生後7日では、TTの中にTT cell、**proacinar cell**に加えて核上部細胞質が蜂の巣状でPAS染色陽性を示す**acinar cell**が認められようになった。**Gresik**と**MacRac**は出生時に介在部導管、生後5日には線条部導管がみられ、出生後も成長と分化が生じると報告している<sup>4</sup>。本研究でも生後7日以降、介在部導管と線条部導管がみられるようになっている。生後14日以降になると**proacinar cell**とTT cellが急激に減少し、終末部/腺房および導管の分化が進行し、生後28日には、顎下腺を構成する腺房は成体と同様にほとんどが**acinar cell**で占められていた。また、雄性マウス顎下腺に特有の**granular convoluted tubule**は過去のげっ歯類の報告<sup>2,4,21</sup>と同様に、雌性顎下腺では発達が悪く、10週の顎下腺の導管の一部に顆粒を有する細胞が少数認められた。この組織学的検討の結果から、マウス顎下腺は出生後に急激に成長・分化し、生後28日には生体とほぼ同様の構造となることを確認している。

唾液の分泌機能に関与する**AQP5**は、胎生期から生後のげっ歯類顎下腺に存在することが報告されている<sup>5-7</sup>。本研究からも、生後21日以降、顎下腺は成熟に向かい、それに伴い**AQP5 mRNA**の発現が増加したことが示された。**Gresik**と**MacRac**は、マウス顎下腺のアミラーゼ活性は出生時から認められ、成長に伴い増加したことを報告している<sup>4</sup>。今回の研究でもアミラーゼの**mRNA**発現量は生後21日以降で著増し、顎下腺は成熟へと向かっていったことが確かめられた。

免疫組織学的に**Jmjd3**の局在を検討した結果、**Jmjd3**を核内に有する細胞の出現率は、生後0日では結合組織が最も高かった。**Jmjd3**は**TGF- $\beta$** を介して上皮間葉転換を促進したり、細胞増殖の調整に関与することが報告されている<sup>16,25</sup>。唾液腺の発達には上皮-間葉相互作用が重要な役割を果たすことから<sup>1</sup>、出生時

のマウス顎下腺結合組織における *Jmjd3* の発現は、顎下腺の生後早期の発達に関与することが示唆された。また、*Jmjd3* 陽性細胞出現率は生後 7 日では導管で最も高く、その後の発達に伴い、存在部位に関わらず著しく減少することが明らかになった。*Jmjd3* の mRNA 発現量も免疫組織学的検討結果と同様に、生後 7 日までは増加したものの、生後 14 日以降は 10 週に至るまでほぼ一定の発現量を示した。ウエスタン・ブロッティングの結果より、唾液腺組織全体として *Jmjd3* タンパク質の発現も認められたことから、*Jmjd3* mRNA から *Jmjd3* タンパク質合成が行われたことが確かめられた。

小葉内の導管が分化する生後 7 日では、導管細胞マーカーである *KRT14* と細胞増殖マーカーである *PCNA* の mRNA 発現量が生後 0 日と比較して増加しその後漸減している。過去の研究により、ラット顎下腺の細胞増殖能は生後 7 日頃以降に減少すると報告されている<sup>20, 26)</sup>。本研究で用いた生後早期のマウス顎下腺でも、生後 7 日頃に導管細胞の増殖と分化がピークを迎え、*Jmjd3* の局在と遺伝子発現に変化が生じたことから、導管細胞の増殖と分化に *Jmjd3* が関与する可能性が示唆された。しかし、*UTX* の mRNA 発現量は、生後 0 日から 10 週にわたって有意な変動を示さなかった。同様の現象は生後ラットの歯の発生過程でも知られており、*Jmjd3* は鐘状期初期から鐘状期後期にかけて発現が上昇するが、*UTX* の発現に大きな変動はみられないとされている<sup>27)</sup>。したがって、生後早期の顎下腺における導管の分化には、主に *Jmjd3* が関与することが考えられた。

本研究の結果より、出生後早期のマウス顎下腺組織形態の成長・分化と *Jmjd3* 発現と局在の著しい変化が同時に起こることが明らかとなり、顎下腺組織形成時にヒストン H3K27me3 脱メチル化によるエピジェネティック修飾が行われている可能性が示唆された。

## 謝 辞

本研究遂行にあたり、多大なご協力を頂いた日本歯科大学生命歯学部共同利用研究センター 那須優則教授、堀江哲郎講師、三橋扶佐子助教ならびに片柳亮太技術職員に厚く御礼申し上げます。

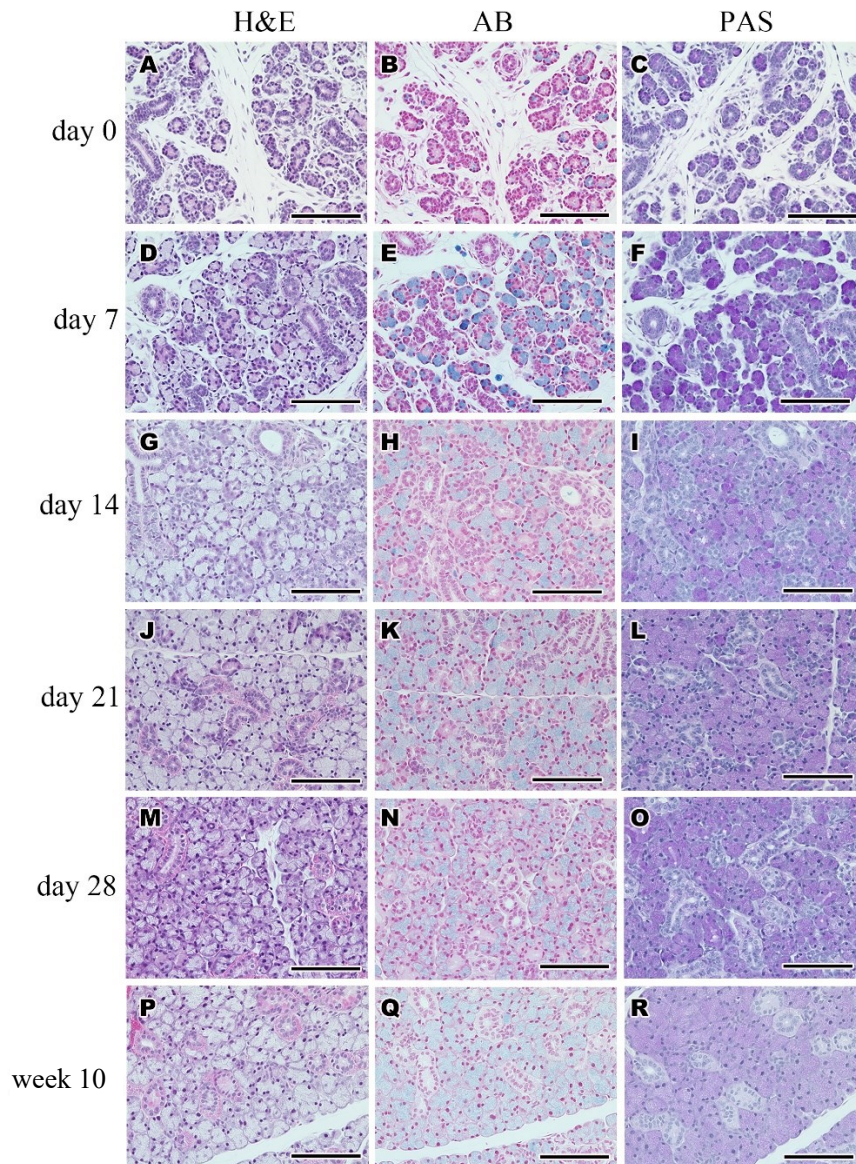
## 参考文献

1. Tucker AS. Salivary gland development. *Semin Cell Dev Biol* 18: 237-244, 2007
2. Gresik EW. Postnatal developmental changes in submandibular glands of rats and mice. *J Histochem Cytochem* 28: 860-870, 1980
3. Jacoby F and Leeson CR. The postnatal development of the rat submaxillary gland. *J Anat* 93: 201-216, 1959
4. Gresik EW and MacRae EK. The postnatal development of the sexually dimorphic duct system and of amylase activity in the submandibular glands of mice. *Cell Tissue Res* 157: 411-422, 1975
5. Akamatsu T, Parvin MN, Murdiastuti K, Kosugi-Tanaka C, Yao C, Miki O, Kanamori N and Hosoi K. Expression and localization of aquaporins, members of the water channel family, during development of the rat submandibular gland. *Eur J Physiol* 446: 641-651, 2003
6. Larsen HS, Ruus AK and Galtung HK. Aquaporin expression patterns in the developing mouse salivary gland. *Eur J Oral Sci* 117: 655-662, 2009
7. Larsen HS, Aure MH, Peters SB, Larsen M, Messelt EB and Kanli Galtung H. Localization of AQP5 during development of the mouse submandibular salivary gland. *J Mol Histol* 42: 71-81, 2011
8. Kwak M, Alston N, Ghazizadeh S. 2016. Identification of stem cells in the secretory complex of salivary glands. *J Dent Res.* 95(7):776–783.
9. Kwak M, Ghazizadeh S. 2015. Analysis of histone H2BGFP retention in mouse submandibular gland reveals actively dividing stem cell populations. *Stem Cells Dev.* 24(5):565–574.
10. May AJ, Cruz-Pacheco N, Emmerson E, Gaylord EA, Seidel K, Nathan S, Muench MO, Klein OD, Knox SM. 2018. Diverse progenitor cells preserve salivary gland ductal architecture after radiation-induced damage. *Development.* 145(21):12.
11. Yu XX, Qiu WL, Yang L, Li LC, Zhang YW and Xu CR. Dynamics of chromatin marks and the role of JMJD3 during pancreatic endocrine cell fate commitment. *Development* 145: dev163162, 2018
12. Yoo KH, Oh S, Kang K, Wang C, Robinson GW, Ge K and Hennighausen L. Histone demethylase KDM6A controls the mammary luminal lineage through enzyme-independent mechanisms. *Mol Cell Biol* 36: 2108-2120, 2016
13. Xiang Y, Zhu Z, Han G, Lin H, Xu L and Chen CD. JMJD3 is a histone H3K27 demethylase. *Cell Res* 17: 850-857, 2007

14. Karin JF, Andrea S, Jammula SG, Cuomo A, Barozzi I, Stützer A, Fischle W, Bonaldi T and Pasini D. Polycomb-dependent H3K27me1 and H3K27me2 regulate active transcription and enhancer fidelity. *Mol Cell* 53: 49-62, 2014
15. Burchfield JS, Li Q, Wang HY and Wang RF. JMJD3 as an epigenetic regulator in development and disease. *Int J Biochem Cell Biol* 67: 148-157, 2015
16. Ramadoss S, Chen X and Wang CY. Histone demethylase KDM6B promotes epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem* 287: 44508-445017, 2012
17. Hayashi T, Eto K and Kadoya Y. Downregulation of ten-eleven translocation-2 triggers epithelial differentiation during organogenesis. *Differentiation* 125: 45-53, 2022
18. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S and Rueden C. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9: 676-682, 2012
19. Kamikawa YF and Donohoe ME. The localization of histone H3K27me3 demethylase Jmjd3 is dynamically regulated. *Epigenetics* 9: 834-841, 2014
20. Nakata H, Terakawa J, Horike SI, Daikoku T and Iseki S. The lack of terminal tubule cells in the submandibular gland of mice deficient in submandibular gland protein C. *Cell Tissue Res* 381: 229-237, 2020
21. Chang WW. Cell population changes during acinus formation in the postnatal rat submandibular gland. *Anat Rec* 178: 187-201, 1974
22. Hecht R, Connelly M, Marchetti L, Ball WD and Hand AR. Cell death during development of intercalated ducts in the rat submandibular gland. *Anat Rec* 258: 349-358, 2000
23. Yamashina S and Barka T. Development of endogenous peroxidase in fetal rat submandibular gland. *J Histochem Cytochem* 21: 42-50, 1973
24. Moreira JE, Tabak LA, Bedi GS, Culp DJ and Hand AR. Light and electron microscopic immunolocalization of rat submandibular gland mucin glycoprotein and glutamine/glutamic acid-rich proteins. *J Histochem Cytochem* 37: 515-528, 1989
25. Lee SH, Kim O, Kim HJ, Hwangbo C and Lee JH. Epigenetic regulation of TGF- $\beta$ -induced EMT by JMJD3/KDM6B histone H3K27 demethylase. *Oncogenesis* 10: 17, 2021
26. Alvares EP and Sesso A. Cell proliferation, differentiation and transformation in the rat submandibular gland during early postnatal growth. A quantitative and morphological study. *Arch Histol Jpn* 38: 177-208, 1975

27. Zhou Y, Zheng L, Li F, Wan M, Fan Y, Zhou X, Du W, Pi C, Cui D, Zhang B and Sun J. Bivalent histone codes on WNT5A during odontogenic differentiation. *J Dent Res* 97: 99-107, 2018





**Fig. 1** マウス顎下腺の光学顕微鏡像

**A-C: day 0, D-F: day 7, G-I: day 14, J-L: day 21, M-O: day 28, P-R: week 10**

**HE 染色 : A・D・G・J・M・P**

**AB 染色 : B・E・H・K・N・Q**

**PAS 染色 : C・F・I・L・O・R**

未成熟な顎下腺は **terminal tubule cells**、**proacinar cells** および **acinar cells** で構成される終末部、導管および結合組織によって構成されている (A-L)。顎下腺における腺房細胞と導管細胞の増殖と分化が進行し、生後 28 日には成体マウス顎下腺と同様の構造にまで成熟した (M-O)。成熟した顎下腺は腺房、導管および少量の結合組織で構成されている (P-R)。Scale bar: 100  $\mu$ m. n=3



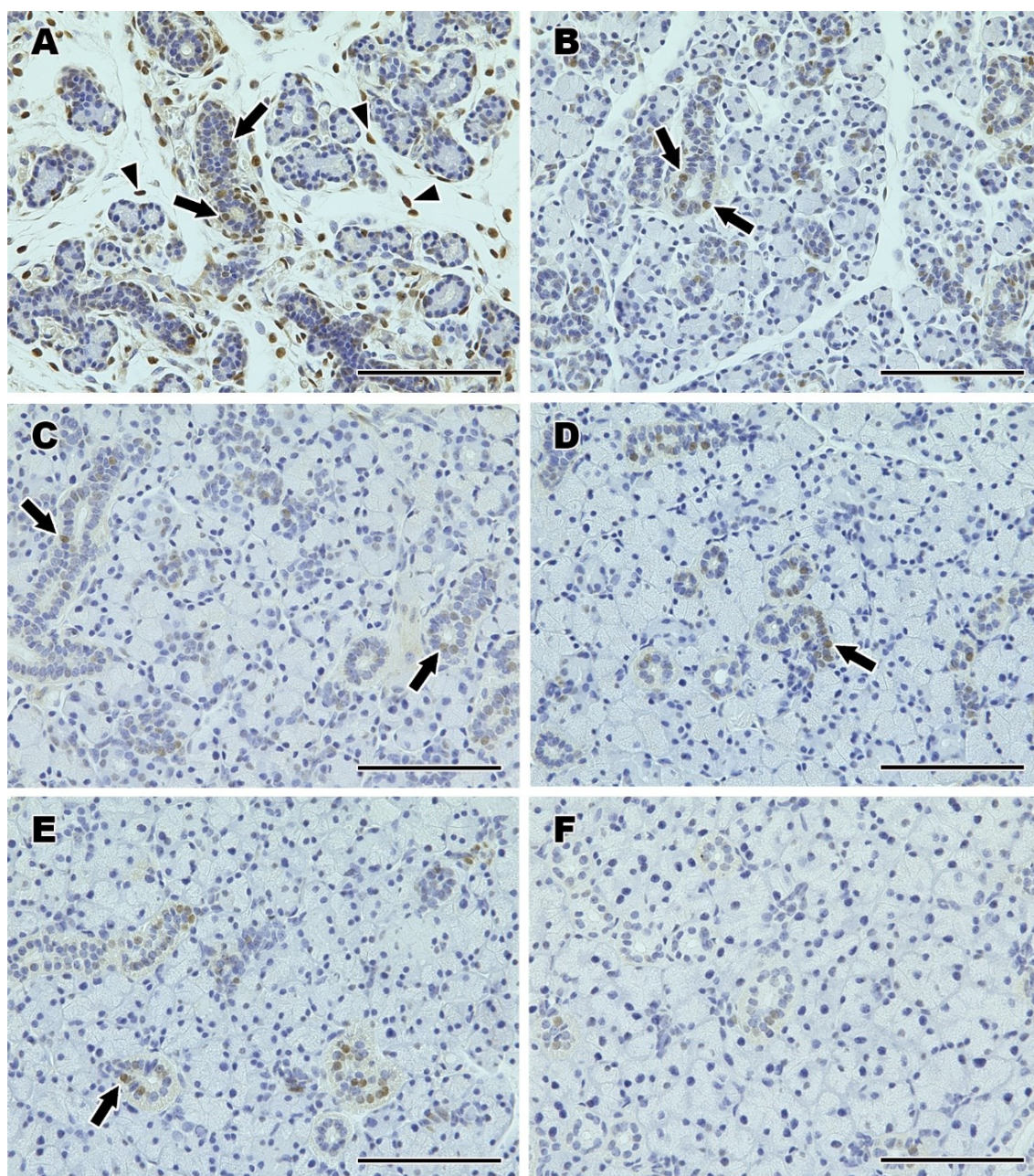


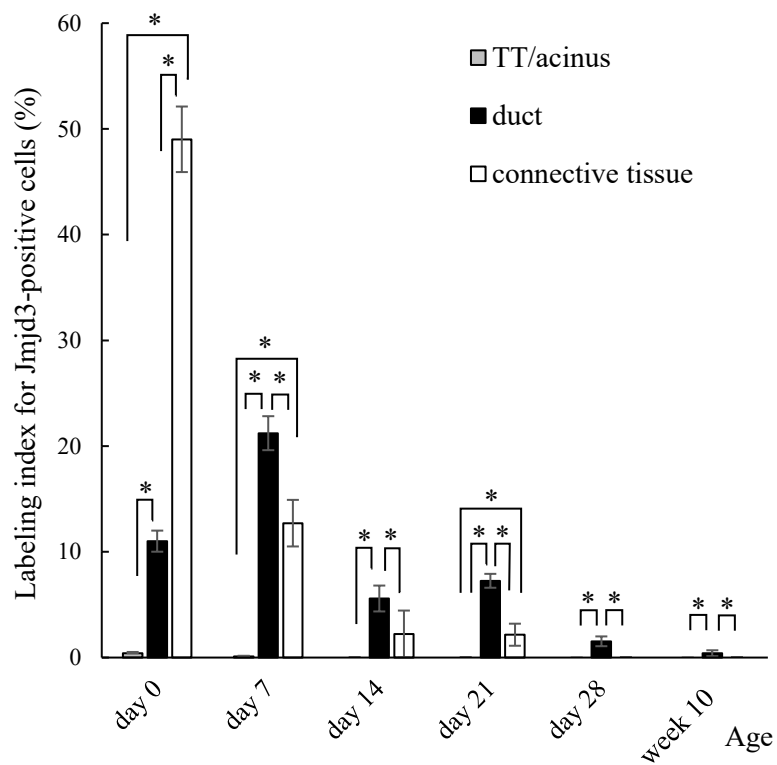
Fig. 2 抗 Jmjd3 抗体を用いたマウス顎下腺の光学顕微鏡像

A: day 0 , B: day 7 , C: day 14 , D: day 21 , E: day 28 , F: week 10

生後 0 日では結合組織に多数の Jmjd3 陽性細胞がみられ、終末部と導管にも Jmjd3 陽性細胞が認められる。生後 7 日では終末部、導管、結合組織に Jmjd3 陽性細胞がみられる。生後 14 日と 21 日では導管と結合組織に Jmjd3 陽性細胞がみられるが、終末部には Jmjd3 陽性細胞を認めない。生後 28 日と 10 週では導管に Jmjd3 陽性細胞を認めるが、腺房と結合組織に Jmjd3 陽性細胞はみられない。

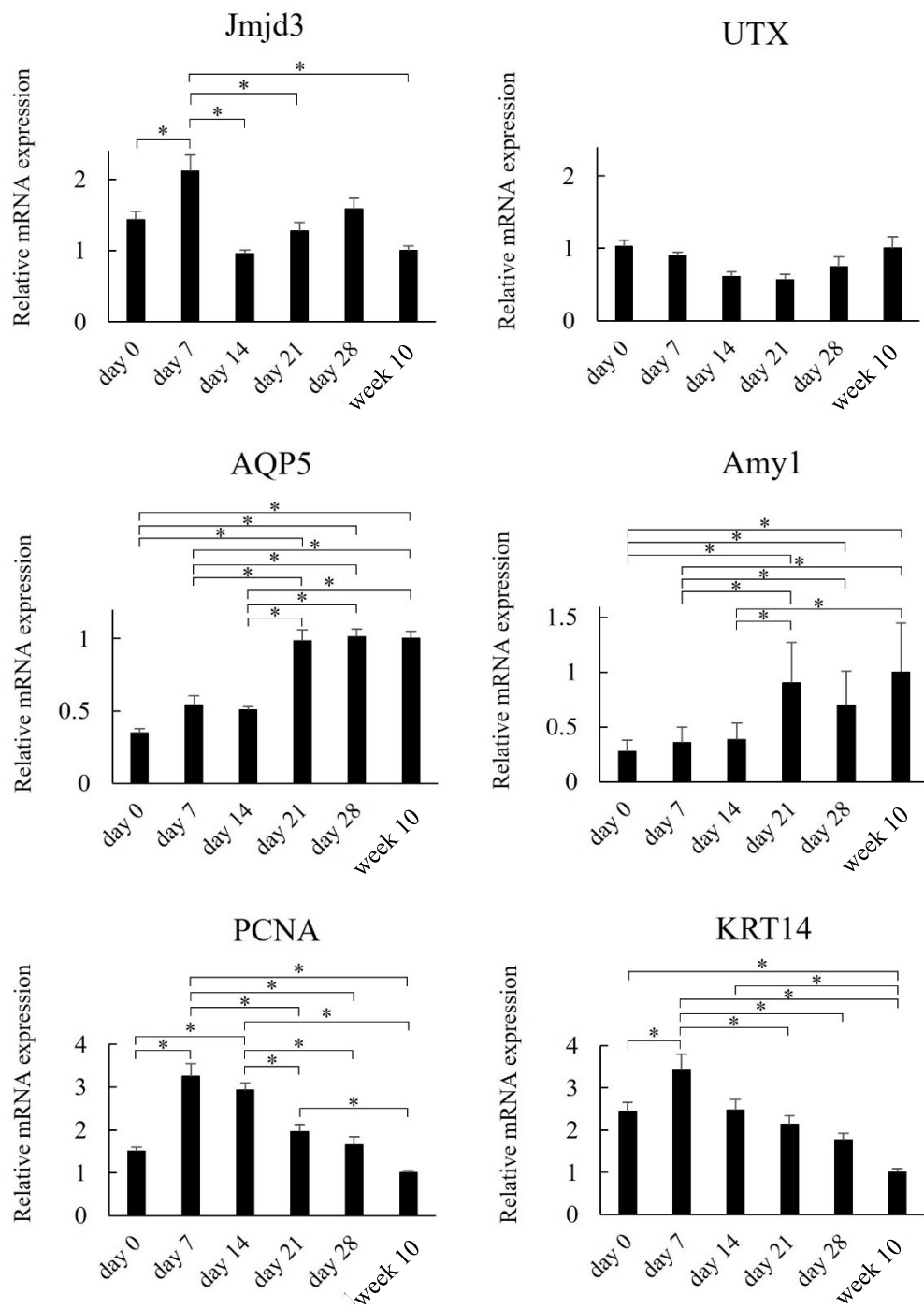
矢印: 導管にみられる Jmjd3 陽性細胞 矢頭: 結合組織にみられる jmj3 陽性細胞

Scale bar: 100  $\mu$ m. n=3

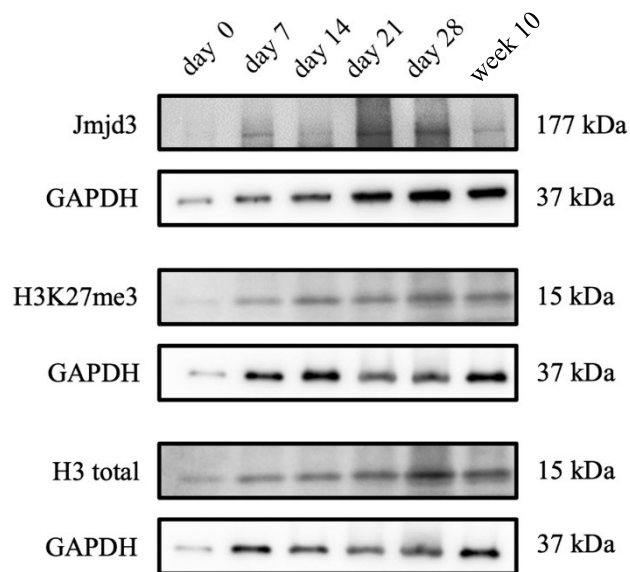


**Fig. 3 Jmjd3 陽性細胞出現率の経時的変化**

生後 0 日では結合組織、生後 7 日では導管における Jmjd3 陽性細胞出現率が高い。\* :  $p < 0.05$  n=3



**Fig. 4** 顎下腺における各種 mRNA の経時的変化  
 10 週における mRNA 発現量を 1 としたときの相対値を示す。\*: $p < 0.05$   
 day 0: n=7, day 7: n=6, day 14: n=6, day 21: n=6, day 28: n=5, week 10: n=5

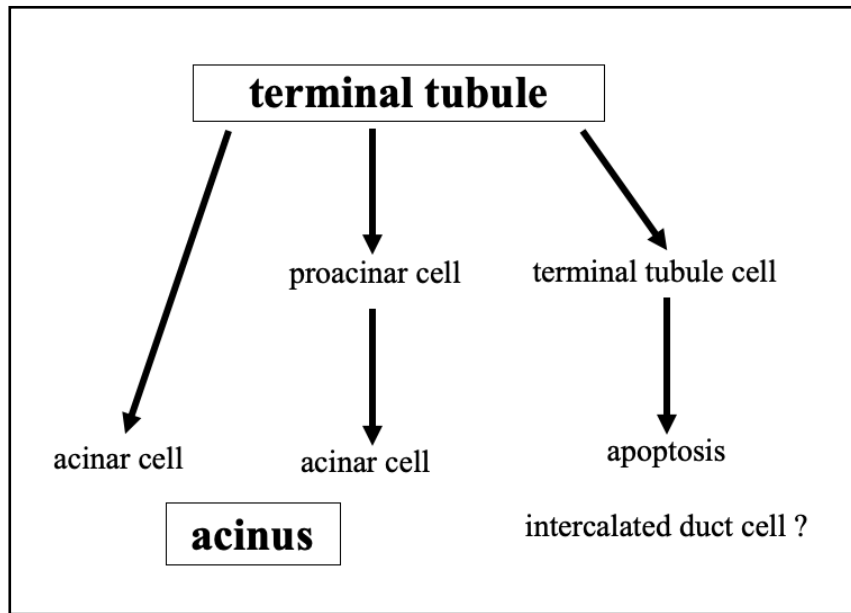


**Fig. 5 Jmjd3、H3 total と H3K27me3 のタンパク質発現**

生後 0 日から 10 週に至るまで Jmjd3、H3 total と H3K27me3 はタンパク質の発現が認められる。

## Supplemental Materials

終末部構成細胞の分化過程



導管の分化過程

