

## マウス唾液腺発生におけるBrachyuryの関与

林, 浩平

<https://doi.org/10.15017/1441166>

---

出版情報：九州大学, 2013, 博士（歯学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：全文ファイル公表済

# マウス唾液腺発生における Brachyury の関与

九州大学大学院歯学府

口腔顎顔面病態学講座 口腔顎顔面外科学分野

林 浩平

指導教員

九州大学大学院歯学研究院

口腔顎顔面病態学講座 口腔顎顔面外科学分野

森 悦秀 教授

本研究の内容は下記の学術雑誌に投稿中である

## **Involvement of the T-box transcription factor Brachyury in the early embryonic stage of mouse salivary gland**

Kouhei Hayashi<sup>1</sup>, Tatsuya Ikari<sup>1</sup>, Tsuyoshi Sugiura<sup>2</sup>, Minami Shibuya<sup>1</sup>, Yukiko Ohyama<sup>1</sup>, Wataru Kumamaru<sup>1</sup>, Yoshihide Mori<sup>1</sup>, and Kanemitsu Shirasuna<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Section of Oral and Maxillofacial Surgery, Division of Maxillofacial Diagnostic and Surgical Science, Faculty of Dental Science, Kyushu University

<sup>2</sup>Section of Oral and Maxillofacial Oncology, Division of Maxillofacial Diagnostic and Surgical Science, Faculty of Dental Science, Kyushu University

Differentiation, 2013, submitted

# 略語表

cDNA : complementary DNA (相補的 DNA)

EMT : epithelial-mesenchymal transition (上皮間葉移行)

ES 細胞 : embryonic stem cells (胚性幹細胞)

FGF : fibroblast growth factors (線維芽細胞増殖因子)

iPS 細胞 : induced pluripotent stem cell (人工多能性幹細胞)

mRNA : messenger RNA (メッセンジャーRNA)

PBS : phosphate-buffered saline (リン酸緩衝食塩水)

PCR : polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)

RT : reverse transcription (逆転写)

siRNA : small interfering RNA (低分子干渉 RNA)

Sox2 : sex-determining region Y-box 2 (Y 染色体性決定領域遺伝子)

TBST : Tris-buffered saline (トリス緩衝生理食塩水) with Tween 20

TGFβ : transforming growth factor beta (トランスフォーミング増殖因子)

# 目次

要旨	1
緒言	5
実験材料と方法	8
結果	16
考察	26
総括	34
謝辞	35
引用文献	36

# 要旨

T-box 転写因子の一つである *Brachyury* が発生段階の中胚葉形成に必須の遺伝子であることは知られている。近年、この遺伝子が発生のさまざまな過程で働く新規の転写制御因子に関与することが明らかになりつつある。脊椎動物の発生過程において、Wnt や TGF $\beta$  といったシグナル経路を構成する下流遺伝子を制御していることも分かってきた。さらに、*Brachyury* は成熟した組織においては上皮間葉移行、つまり上皮と間葉の形質変化をコントロールする遺伝子であることが知られている。また、癌幹細胞とも関係が深いとされ、癌細胞の浸潤や転移に関与していることで注目されている遺伝子である。

そこで、本研究ではマウス唾液腺発生初期における *Brachyury* の発現動態を明らかにするとともに、器官培養法を用いて顎下腺原基の初期発生における *Brachyury* の役割について検討した。マウス顎下腺は、胎生 11.5 日 (E11.5) 頃より発生を開始し、その後 E13.5-16.5 にかけて分枝形成を繰り返し、最終的に終末部での細胞分化によって成熟する。胎生期マウス顎下腺における *Brachyury* 遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR で解析した。発生初期の分枝形成期に一致して、E12.5-13.5 にかけて急激な *Brachyury* 遺伝子発現の増加を認めた。胎生期マウス顎下腺における *Brachyury* 発現を Western blotting で評価した。リアルタイム RT-PCR の結果と同様に、E12.5-13.5 で

の高発現を認めた。この発現動態から、**Brachyury** がマウス唾液腺発生初期に何らかの作用を及ぼしている可能性が示唆された。

**Brachyury** の強発現が発生の基礎となる **cleft** の形成、その後の分枝形成が盛んに進行する時期であることから、**Brachyury** が **cleft** の形成や分枝形成を制御している可能性が考えられた。そこで、抑制実験として *Brachyury* siRNA によるノックダウン効果を検討した。E12.5-13.5 から分離した顎下腺原基の器官培養において、形態形成初期に必須の過程である **cleft** 形成や分枝形成が有意に抑制された。一方、発生の中期以降である E14.5-15.5 から分離した顎下腺原基の器官培養においては有意な効果は認められなかったことから、**Brachyury** が発生初期段階における **cleft** 形成や分枝形成に関与している可能性が示唆された。**Brachyury** が発生初期の **cleft** 形成や分枝形成に関与している可能性が示唆されたため、**cleft** 形成や分枝形成、および細胞接着に関連するとされる **fibronectin**、**Btbd7**、**E-cadherin** の胎生期マウス顎下腺における発現動態を Western blotting で確認した。**fibronectin**、**Btbd7** は **Brachyury** と同様に E13.5 を中心に高発現が認められた。一方、**E-cadherin** の発現は発生初期に減少していた。**Brachyury** と同様に **Btbd7**、**fibronectin** が発生初期に高発現していることを確認したため、マウス顎下腺原基の器官培養における *Btbd7*、*fibronectin* 遺伝子ノックダウンの効果を検討した。*Brachyury* ノック

ダウンと同様に cleft 形成や分枝形成が有意に抑制された。また、*Btbd7*、*fibronectin* 遺伝子をノックダウンしても *Brachyury* の発現動態に影響は認めなかったが、一方、*Brachyury* ノックダウンにおいては *Btbd7*、*fibronectin* の発現の抑制が認められた。*Brachyury* が *fibronectin* や *Btbd7* の上流でその発現を制御している可能性が示唆された。

すなわち、*Brachyury* は唾液腺の発生の初期に限局して強発現し、間葉マーカーである *fibronectin* を誘導し、*Btbd7* を介して上皮細胞接着因子である *E-cadherin* の発現を抑制することで上皮同士の接着から上皮間葉接着を誘導し、唾液性発生における上皮間葉移行を制御している可能性が示唆された。

また、唾液腺の発生には唾液腺幹細胞の存在が必要であり、幹細胞を維持することが重要となる。幹細胞に関連する因子には、iPS 細胞の樹立に必要な *Sox2*、*Oct3/4*、*c-Myc*、*Klf4* などが挙げられるが、その中でも *Sox2* は全ての多能性幹細胞で発現しており、それゆえ共通の多能性維持を担うとされる。

そこで、幹細胞に関わる因子として特に *Sox2* との関わりについて検討を行った。E12.5-16.5 より分離した顎下腺原基を用いて、胎生期マウス顎下腺における *Sox2* の発現動態を Western blotting で解析した。

*Brachyury* の発現動態と同様に *Sox2* は発生初期の E12.5-13.5 にかけて強発現していることを確認した。*Brachyury* と同様に *Sox2* が発生初期に高発



現していることを確認したため、マウス顎下腺原基の器官培養における *Sox2* 遺伝子ノックダウンの効果を検討した。*Brachyury* ノックダウンと同様に *cleft* 形成や分枝形成が有意に抑制された。また、*Sox2* 遺伝子をノックダウンしても *Brachyury* の発現動態に大きな影響は認めなかったが、一方、*Brachyury* ノックダウンにおいては *Sox2* の発現の抑制がやや認められた。*Brachyury* が *Sox2* と相互的に影響することがいわれているが *Brachyury* の方が中心的に発現を制御している可能性が示唆された。*Cleft* 形成に関してはどちらも必要な因子であることが示唆された。

E12.5-16.5 より分離した顎下腺原基を用いて、多能性の維持や様々な臓器発生に関与するとされる Wnt の発現を Western blot 法で解析した。Wnt シグナルは、*Sox2*、*Oct*、*Brachyury*、*fibronectin*などを誘導し、一方で上皮間葉移行に関わる *E-cadherin* は抑制することが報告されている。今回は *Brachyury* の発現に関与するとされる *Wnt3a* について解析した。*Brachyury* と同様に発生の初期の E12.5-13.5 に限局して発現しているのを確認した。

以上より、*Brachyury* が *fibronectin*、*Btbd7*、*E-cadherin* を制御することで、マウス唾液腺の *cleft* 形成を制御し発生の中心的な役割を果たしている可能性が示唆された。また、*Brachyury* は幹細胞の維持を担う *Sox2* や Wnt シグナルも制御している可能性が考えられた。

## 緒言

唾液腺は、唾液分泌を介した摂食機能、咀嚼機能、嚥下機能、口腔衛生状態の維持、上部消化管としての消化機能などを担う重要な組織である [1, 2]。シェーグレン症候群、頭頸部癌治療に対する放射線治療などによって引き起こされる口腔乾燥症は、齲蝕、細菌感染、咀嚼機能障害、嚥下機能障害や味覚障害など様々な臨床症状を引き起こし、口腔の機能のみならず全身の健康維持にも大きな影響を及ぼす [3-5]。従来、口腔乾燥症に対しては人工唾液投与や保湿剤の使用などの対症療法が行われてきた。近年、ムスカリン受容体に作用し唾液分泌を誘導するピロカルピン塩酸塩や塩酸セビメリンなどの副交感神経作動薬を用いて、残存した唾液腺の機能を刺激する治療が行われるようになり、一定の効果が得られているが、組織破壊が進行した唾液腺障害に対しては十分な効果が得られていない [6-8]。このため、唾液腺再生による機能回復が望まれているが、皮膚や軟骨などの再生医療と比較すると、唾液腺における再生医療の研究は十分に進んでいない。それゆえ、唾液腺機能を回復させることが出来る新たな治療法の開発が望まれている。多くの上皮性器官は、発生の決められた段階における特定の間葉組織との相互作用によって形成され、最終的に器官特異的な構造と機能を獲得する。上皮芽の増殖と分岐として定義される分枝形成は、唾液腺、肺、腎臓、膵臓、乳腺などの発達性上皮性器官における基本的かつ不

不可欠な発生過程である。器官形成において、増殖因子、サイトカイン、細胞外基質などを介した上皮間葉相互作用が必須であることが多くの研究で示されている [9-26]。

マウス顎下腺の器官形成は、E11 頃に口腔上皮が間葉に向かって増殖、伸長することにより始まる。最初、間葉組織内で増殖した原基は 1 つの球状の上皮茎を示す。それから最初の分岐点で上皮に深い cleft が生じることで分枝が始まる。3 次元的な枝分れ構造を作るために、形成期に 1 つ 1 つの腺房は cleft と bud を作り続け、上皮の増殖と分枝を繰り返してブドウの房状に分枝した立体構造を獲得する。

これまでに、Brachyury が発生初期の中胚葉形成に必須であることが報告されている [27-29]。脊椎動物の発生過程において、Brachyury は TGFβ や Wnt などの下流のシグナル伝達経路を調節するとされる。近年では、ヒト癌細胞における EMT (上皮間葉移行) を引き起こすことについても報告がなされている。当分野では、高転移性で癌幹細胞形質を示す培養ヒト腺様嚢胞癌細胞株を用い、Brachyury をノックダウンする事により、造腫瘍性、転移能の減弱を証明し、これにより癌幹細胞の浸潤抑制が可能であることを示した [30]。

唾液腺の発生には様々な遺伝子が関わっているが、特に cleft 形成やそれに続く分枝形成に関与すると考えられている fibronectin、Btd7、E-cadherin は

重要な因子である。Wnt は線維芽細胞増殖因子 (FGF) とともに唾液腺の成長を促し [31]、唾液腺の発生に関して影響を与えている。Wnt 系は、Sox2 の下流遺伝子に位置しており、さらに Brachyury は Sox2 を制御することが示唆されている [30]。

そこで本研究では、唾液腺の初期発生における Brachyury の発現動態を解析するとともに、唾液腺の発生に関与する Sox2、fibronectin、Wnt3a、E-cadherin および fibronectin によって誘導され E-cadherin の発現を制御する Btbd7 [32] に着目して、唾液腺初期発生における Brachyury の関与について検討を行った。

# 実験材料と方法

## 1. 試薬および抗体

ウサギ抗マウス Brachyury 抗体は、Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Dallas, TX, USA) より、ウサギ抗マウス Btbd7 抗体は、Novus (Oakville, ON, Canada) より、ウサギ抗マウス E-cadherin 抗体およびウサギ抗マウス Fibronectin 抗体は、Millipore Corporation (Billerica, MA, USA) より、ウサギ抗マウス Sox2 抗体は、Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA) より、ウサギ抗マウス Wnt3a 抗体は、Bioss Inc. (Woburn, MA, USA) より、ウサギ抗マウス  $\beta$ -actin は、Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA) より購入した。

各 siRNA 試薬はそれぞれ Sigma-Aldrich より購入した。

## 2. 組織採取

実験に使用した ICR 妊娠マウスは日本 SLC 社 (静岡) から購入した。膣栓を午前 9 時に確認した時点を経胎齢 0 日 (E0) とした。マウスの顎下腺は E11.5 から E12 において口腔粘膜上皮が間葉に陥入することにより始まる [33]。その後、cleft 形成や分枝形成を繰り返し発育していくが、唾液腺の成長の過程で 5 段階に分けられる [34]。E11.5 では上皮の陥入は起こっておらず、

pre bud stage と呼ばれる。E12.5 頃には上皮の陥入により最初の bud が形成され、initial bud stage と呼ばれる。次に、cleft 形成や分枝形成を経て E13.5 では bud を 3-5 個認める pseudoglandular (偽腺) stage となる。さらに cleft 形成や分枝形成が E14.5 まで進行し、E15.5 からは管腔構造が形成する canalicular (管状) stage となる。その後 E16.5 頃から終末部の細胞分化が起こり始め、器官特異的な構造と機能を獲得する terminal bud stage となる。

E12.5-16.5 の胎仔マウスを顎下腺原基分離の対象とした。使用する顎下腺が胎齢にそった上記分類から著しく逸脱している場合は、その顎下腺を除外した。

イソフルラン (Abbott Japan、東京) 麻酔下に頸椎脱臼にて安楽死させた後、子宮を摘出して氷上リン酸緩衝食塩水 (PBS) 中で十分に洗浄して血液を洗い流した。子宮から胎仔を摘出して羊膜を剥離し、頸部で切離した。実体顕微鏡 (Carl Zeiss, Berlin, Germany) 下に口裂部で切断、舌根部と下顎骨の間にある顎下腺原基を分離した。

### 3. 器官培養

本研究では、顎下腺の器官培養に、E12.5-16.5 の胎仔マウスから分離した唾液腺原基を使用した。分離した唾液腺原基には顎下腺原基と舌下腺原基を含んでいる。この外植片をポアサイズ 0.4  $\mu\text{m}$  の Falcon cell culture insert (Becton

Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) フィルター上に置き、フィルターを培地 200  $\mu$ l を入れた 24 穴プレート (Becton Dickinson) の各ウェルにセットした。培地は、BGJb 培地 (Gibco, BRL, MD, USA) に L(+)-アスコルビン酸 (和光純薬、大阪) 100  $\mu$ g/ml、ペニシリン G カリウム(萬有製薬、東京) 100 U/ml、ストレプトマイシン(明治製菓、東京) 100  $\mu$ g/ml を添加して用い、37°C、湿度 100%、5% 二酸化炭素気相下で培養した。なお培地は、1 日おきに半量ずつ交換した。

#### 4. Western blotting

胎仔マウスから分離した顎下腺原基や器官培養を行った原基を PBS で洗淨した後、プロテアーゼ阻害剤を含むドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 溶解緩衝溶液 (50 mM Tris-HCl, pH 6.8、2% SDS、10% グリセロール、6% メルカプトエタノール) を用いて音波破碎により溶解した。溶解液の蛋白濃度は Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて測定後、標準化した。その後、Laemmili sample buffer (Bio-Rad) ・2-メルカプトエタノール (和光) を添加し、70°C、30 分加熱し変性させ、-30°Cにて保存した。同濃度の蛋白を含む 30  $\mu$ l のサンプルを 10% SDS-ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した。電気泳動後、蛋白をニトロセルロース膜(Bio-Rad)に転写した。セルロース膜を TBST (25 mM Tris-HCl, pH 8.2, 144 mM NaCl, 0.1% Tween 20)

で洗浄した後、常温 1 時間、5% スキムミルク/TBST でブロッキングを行い、TBST による洗浄後、特異的一次抗体で常温 1 時間処理した。TBST による洗浄後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合二次抗体と常温 1 時間反応させて、TBST により洗浄した。ECL ウェスタンブロットティング検出システム (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) で発光させ、化学発光検出システム (ChemiDoc XRS-J, Bio-Rad) を用いて検出後、Quantity One software (Bio-Rad) を用いて解析を行った。

## 5. リアルタイム PCR 法による mRNA 発現の解析

E12.5-16.5 の胎仔マウスから分離した顎下腺原基を、PBS で洗浄した後回収した。顎下腺原基に TRIzol (Invitrogen, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) 1 ml を加え、音波破碎により溶解し、室温で 5 分間放置した。その後、クロロホルム (和光) 200  $\mu$ l を加えて 3 分間攪拌し、室温で 3 分間放置後、4°C、14,500 rpm で 15 分間遠心分離した。RNA を含む水層を約 500  $\mu$ l 採取して新たなエッペンドルフチューブに移し、これにイソプロピルアルコール (和光) 250  $\mu$ l を加えて混合し、室温で 10 分間放置した。その後、4°C、14,500 rpm で 30 分間遠心分離し、RNA を沈殿させた。上清を除去後、70% エタノール (和光) 1 ml を加えて沈殿物を洗浄し、ボルテックスにて混合した。



混合後、4°C、14,500 rpm で 15 分間遠心分離し、沈殿物を室温で乾燥させ、RNase-Free H<sub>2</sub>O 20 µl に溶解した。その後、65°C で 10 分間保温し、攪拌後氷冷した。RNase Inhibitor 1 µl を加え、分光光度計 (Ultrospec 3300 pro, Amersham) を用いて全 RNA の濃度を測定した。回収した約 3 µg の全 RNA を鋳型として、40 U / µl の Recombinant RNasin®Ribonuclease Inhibitor (Promega, Madison, WI, USA) を 0.5 µl、0.5 µg / µl の pd (T)<sub>12-18</sub> を 1 µl、250 mM トリス塩酸塩 (pH 8.3)、375 mM KCl および 15 mM MgCl<sub>2</sub> を含む 5 × 反応緩衝液を 4 µl、100 mM dithiothreitol を 2 µl、200 U / µl の SUSPERSCRIPT™ II RNase H- Reverse Transcriptase (Life Technologies, Rockville, MD, USA) を 0.5 µl 加えて合計 20 µl とし、42°C で 1 時間インキュベートした。その後、95°C で 5 分間加温して酵素を失活させ、直ちに氷冷して cDNA を合成した。これを RNase-Free H<sub>2</sub>O で 10 倍に希釈し、mRNA の解析に用いた。

リアルタイム PCR は、Light Cycler FastStart DNA Master SYBER Green 1 kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いて mRNA 定量を行った。また、プライマー (RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array [96-well Format] Human Drug Transporters) は QIAGEN (Chatsworth, CA, USA) より入手した。使用したプライマー配列は以下の通りである。

Brachyury (mouse) :

(F)5'-ATAACGCCAGCCCACCTA-3'

(R)5'-GGGAGCCTCGAAAGAAGAACT-3'

$\beta$ -actin :

(F)5'-TGGGACGACATGGAGAAA-3'

(R)5'-AGCACAGCCTGGATAGCA-3'

反応条件は、熱変性は 95°C で 1 サイクル 10 分間、2 サイクル以降 10 秒間行った。アニーリング／伸長反応は 60°C で 10 秒間、72°C で 10 秒間とし、すべて 47 サイクルの増幅を行った。Brachyury のリアルタイム PCR は LightCycler Software Version 3.5 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を使用した。また、各胎齢で mRNA 発現量を比較するために、 $\beta$ -actin の mRNA 発現量と比較し、相対的発現量を算出した。

## 6. Transfection

顎下腺発生の開始時期は E11.5 であり、腺房として確認のできる E12.5 の胎仔マウスから採取した顎下腺原基を transfection の標的とした。分離した原基をポアサイズ 0.4  $\mu$ m の Falcon cell culture insert フィルター上に置き、フィ

ルターを 200  $\mu$ l の培地を入れた 24 穴プレートの各ウェルにセットした。培地は BGJb 培地に 100  $\mu$ g/ml の L (+) アスコルビン酸、100 U/ml のペニシリン G カリウム、100  $\mu$ g/ml のストレプトマイシンを添加したものに、各 siRNA (50 nM) と Lipofectamine™ LTX・PLUS 試薬 (Invitrogen) を添加したものをを用いた。37°C、100% 湿度、5% 二酸化炭素気相下にて培養を行った。試薬を 24 時間反応させた後は、培地を交換し、前述に示した器官培養法に準じて培養し、観察した。培養後に顎下腺原基を回収し、Western blotting にて目的遺伝子の蛋白発現量を解析した。各 siRNA および Lipofectamine™ LTX・PLUS 試薬の濃度は、それぞれ濃度を設定し Western blotting によるノックダウン効率や培養時の顎下腺原基の細胞発育を比較検討し、て設定した。

transfection の negative control は、siRNA Universal Negative control を導入する器官培養群、siRNA を培地に添加せず遺伝子誘導試薬のみを添加した培地を用いた器官培養群、および試薬を添加しない通常の器官培養群の 3 群とした。transfection の positive control としては、 $\beta$ -actin siRNA を導入した。各 siRNA の 種類は以下の通りである。

Mm\_T2\_3917\_s : 5'-GrArGrAUrGrGrCrCrGrCUUUrGrCrArGrATT-3'

Mm\_T2\_3917\_as : 5'-UrCUrGrCrArArArGrCrGrGrCrCrAUrCUrCTT-3'

Mm\_Btbd7\_5415\_s : 5'-rCrCUrAUrArArArCrArGUrGrArGrGUrCUTT-3'

Mm\_Btbd7\_5415\_as : 5'-rArGrArCrCUrCrArCUrGUUUrAUrArGrGTT-3'

Mm\_Sox2\_3808\_s : 5'-rCrCrArCrCUrArCrArGrCrAUrGUrCrCUrATT-3'

Mm\_Sox2\_3808\_as : 5'-UrArGrGrArCrAUrGrCUrGUrArGrGUrGrGTT-3'

Mm\_Fn1\_8091\_s : 5'-rCUUrAUrGrGUrGrGrCrArAUUrCrArArATT-3'

Mm\_Fn1\_8091\_as : 5'-UUUrGrArAUUrGrCrCrArCrCrAUrArArGTT-3'

Mission\_SIC-001\_s : Mission\_Negative control SIC-001, confidential sequence

Mission\_SIC-001\_as : Mission\_Negative control SIC-001, confidential sequence

Mm\_Actb\_1503\_s : 5'-rGUUrArCrCrArArCUrGrGrGrArCrGrArCrATT-3'

Mm\_Actb\_1503\_as : 5'-UrGUrCrGUrCrCrCrArGUUrGrGUrArArCTT-3'

# 結果

## 1. 各胎齢における *Brachyury* 発現量の比較

E12.5-16.5 の胎仔マウス顎下腺原基における *Brachyury* mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法を用いて解析した (図 1)。E12.5-13.5 の段階で *Brachyury* の高発現を認め、E14.5 以降は *Brachyury* の発現量の低下が認められた。また、E12.5-16.5 の顎下腺原基における *Brachyury* 発現量を Western blotting 法により解析した (図 2)。RT-PCR の結果と同様、E12.5-13.5 の段階で *Brachyury* の高発現を認め、E14.5 以降の発現量は低値を示した。

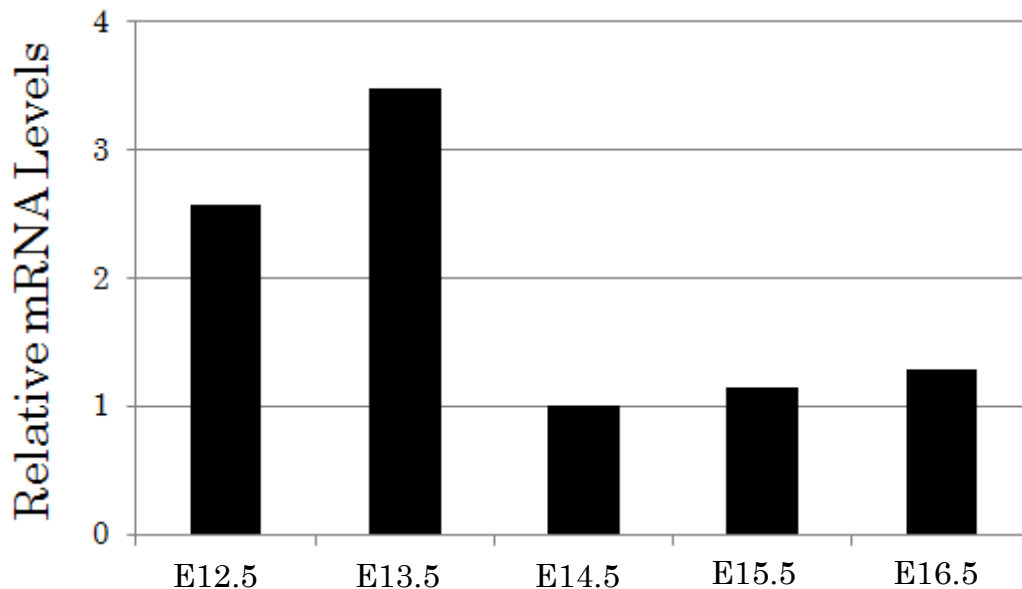


図 1.各胎齢における *Brachyury* mRNA 発現量の比較

E12.5-16.5 の胎仔マウス顎下腺原基における *Brachyury* mRNA 発現量をリアルタイム RT-PCR 法を用いて解析した。n=2、コントロールを最小値の E14.5=1 とした。

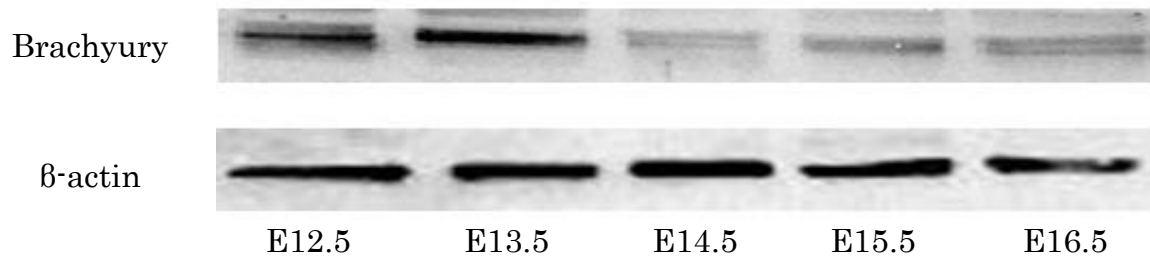


図 2.各胎齢における *Brachyury* 発現量の比較

E12.5-16.5 の胎仔マウス顎下腺原基における *Brachyury* 発現量を Western blotting を用いて解析した。

## 2. 顎下腺原基発育における *Brachyury* siRNA によるノックダウンの効果

E12.5-15.5 の胎仔マウスから顎下腺原基を分離し、*Brachyury* siRNA を 24 時間作用させてノックダウンを行い、その後 24 時間通常 of 器官培養を行った (図 3a)。通常の 48 時間器官培養を行った コントロールと比較して、発生初期の E12.5-13.5 で cleft 形成や分枝形成が抑制されていることが確認された。特に、E12.5 での効果が顕著で、成長できずに萎縮していく原基が多く認められた。また、E13.5 では培養 24 時間後までは cleft 形成や分枝形成が進行する様子が観察されたが、*Brachyury* siRNA の導入後 48 時間を経過するころには、cleft 形成や分枝形成が有意に抑制された。一方、E14.5-15.5 では siRNA 導入後の cleft 形成や分枝形成は通常 of 器官培養と比較して有意差を認めなかった。培養した原基の中から 5 個選び小葉数を数え、平均を比較した(図 3b)。選択は原基分離時と培養時で観察して周囲から逸脱しているものは除外した。

*Brachyury* ノックダウンで E12.5-13.5 での小葉数がコントロールと比較して明らかに減少していた。

Transfection の比較実験としては、E12.5-15.5 の胎仔マウスから分離した顎下腺原基を通常の器官培養群、siRNA を添加せず遺伝子導入試薬のみを添加した群、Negative control siRNA と遺伝子導入試薬を添加した群を用い、分離後 0、24、48 時間経過後の顎下腺原基を観察した。それぞれで、導入による発生の違いは認めなかった。

siRNA 導入による標的遺伝子の発現を Western blotting で解析した。E12.5 の胎仔マウスから分離した顎下腺原基に *Brachyury* siRNA を導入し、24、36 時間作用させた。ノックダウンにより *Brachyury* 発現が制御され、試薬作用時間による相違がないことを確認した (図 4)。また、siRNA や試薬の有無によるコントロール実験では、特異的な *Brachyury* siRNA を導入した群のみにおいて *Brachyury* の発現が抑制された (図 5)。

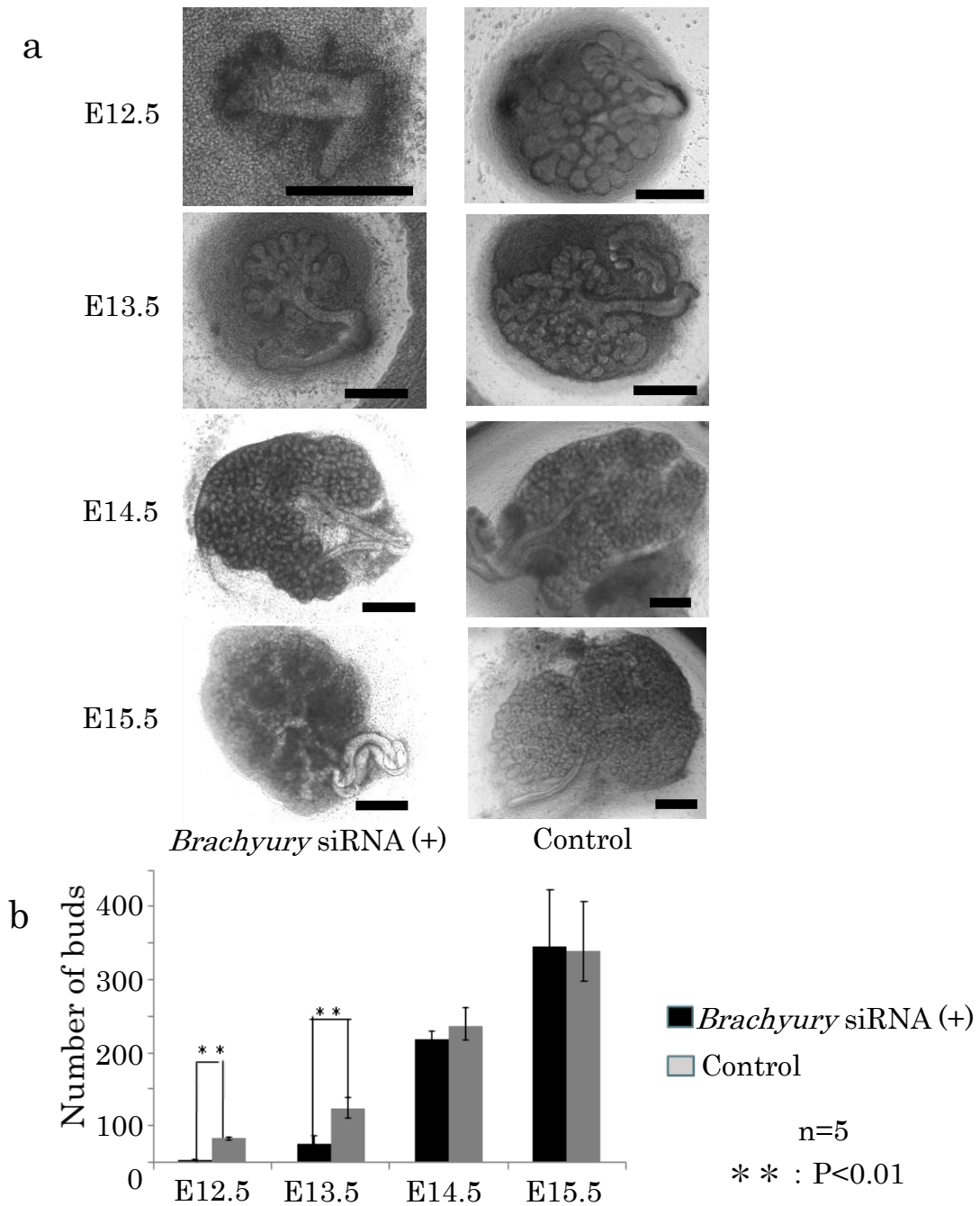


図 3. *Brachyury* ノックダウン時の器官培養の比較

E12.5-15.5 の胎仔マウスから分離した顎下腺原基に *Brachyury* siRNA を導入した。24 時間 siRNA を作用させ、さらに 24 時間通常の器官培養を実施し、分離後 48 時間経過後の顎下腺原基を観察した。Control は E12.5-15.5 の胎仔マウスから分離した顎下腺原基を 48 時間通常器官培養したものを用いた。

Scale bar : 300  $\mu$ m (a)。各胎齢における小葉数を計測した (b)。



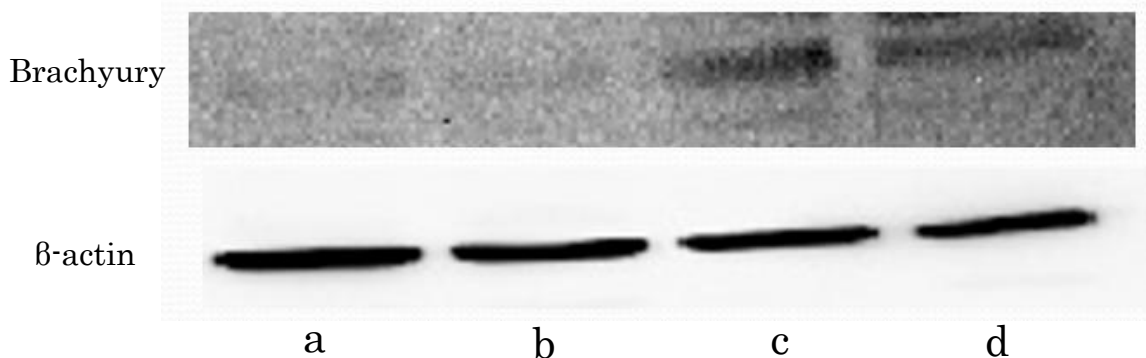


図 4. *Brachyury* ノックダウン効果の確認

E12.5 の胎仔マウスから分離した顎下腺原基を用いて Western blotting にて解析を行った。分離した顎下腺原基を *Brachyury* siRNA と Lipofectamine™ LTX・PLUS 試薬を添加した培地で器官培養を行った。24 時間後に原基を回収した (a)。 (a) と同条件で培養し、36 時間後に原基を回収した (b)。分離した顎下腺原基を siRNA Negative control を加えた培地で器官培養を行った。24 時間後に原基を回収した (c)。分離した顎下腺原基で通常の器官培養を行った。24 時間後に原基を回収した (d)。

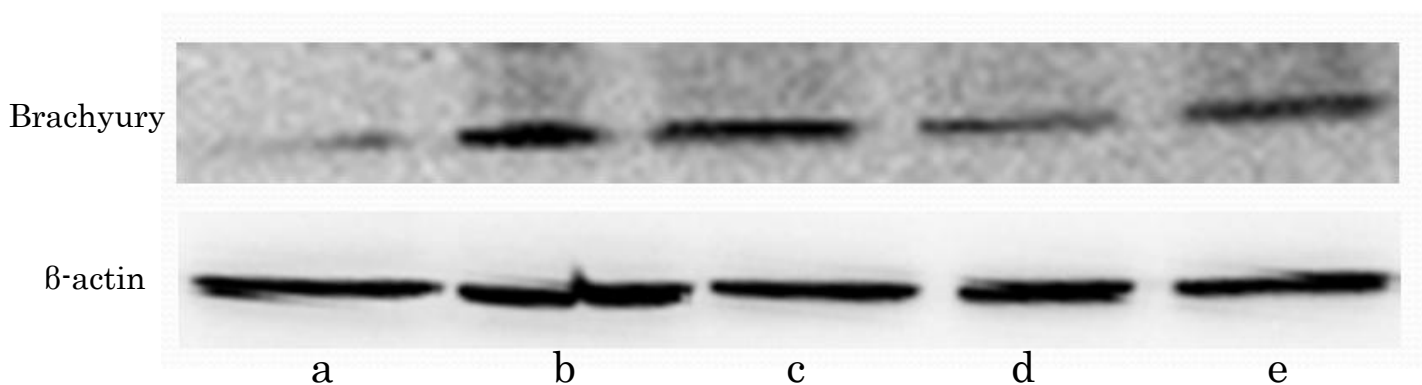


図 5 各条件における *Brachyury* 発現量の比較

胎仔マウスから分離した顎下腺原基を用いて Western blotting で解析を行った。*Brachyury* をノックダウンし、24 時間培養後に原基を回収した(a)。E13.5 の胎仔マウスから分離した顎下腺原基を回収した (b)。分離した顎下腺原基に siRNA Negative control を作用させ 24 時間培養後に回収した (c)。分離した顎下腺原基に遺伝子導入試薬のみ添加して器官培養を行った。24 時間後に原基を回収した (d)。分離した顎下腺原基で通常の器官培養を行った。24 時間後に原基を回収した(e)。a, c-e は E12.5 マウスを使用した。

### 3. 胎生期唾液腺組織における初期発生関連因子発現量の解析

Fibronectin は cleft 周囲に特異的に集積する細胞外基質で、細胞接着因子である E-cadherin を制御することで cleft 形成を促進することが知られている [51]。その fibronectin により誘導される Btbd7 は、Snail2 の発現を誘導し E-cadherin の発現を抑制していることが報告されている [32]。また、Sox2 は Wnt シグナルを介して発生期における細胞増殖や幹細胞性の維持に関与し、Brachyury との関連性も示唆されている [30]。そこで、これらの因子が細胞接着、細胞増殖、cleft 形成、分枝形成に関わっていることが知られているため、胎生期顎下腺原基におけるその発現を Western blotting で解析した (図 6)。結果、Brachyury と同様に E13.5 を中心とした発生初期に fibronectin、Btbd7、Sox2 および Wnt3a の強い発現を認めた。一方、fibronectin や Btbd7 によって制御される E-cadherin は E12.5-13.5 でその発現が抑制されていた。

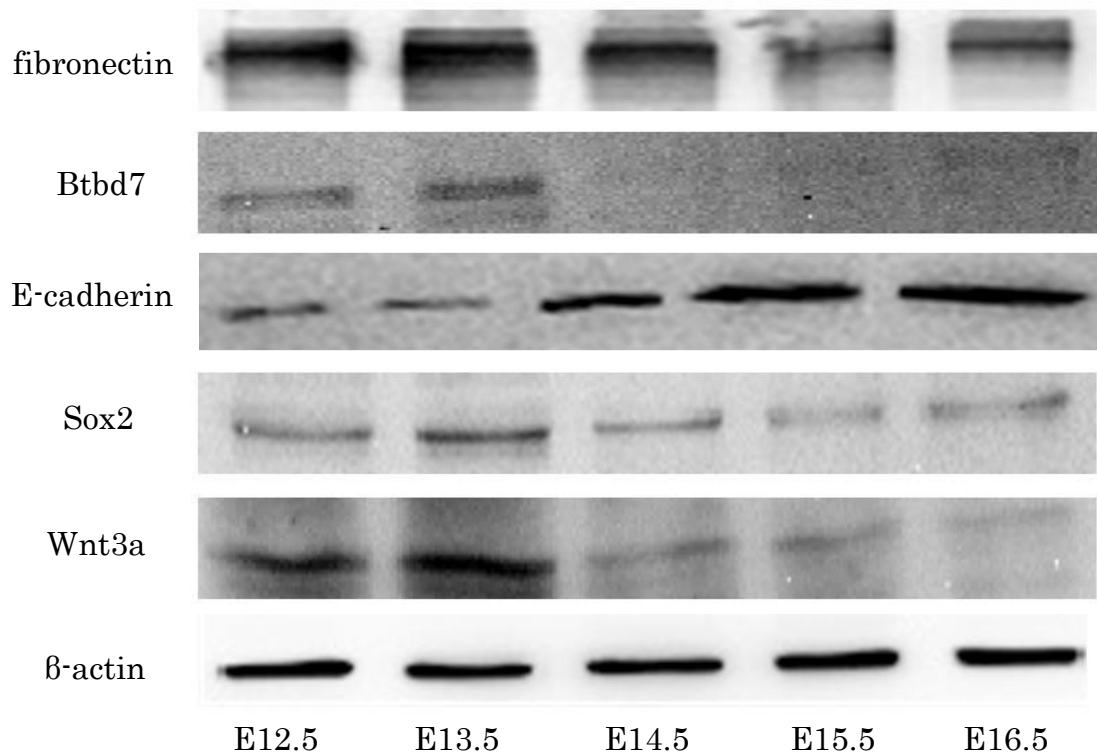
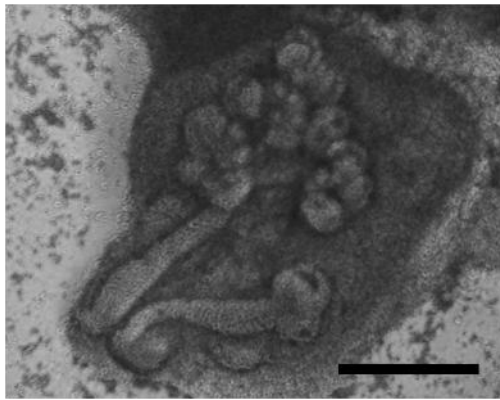


図 6 各胎齢における唾液腺発生関連因子発現量の比較

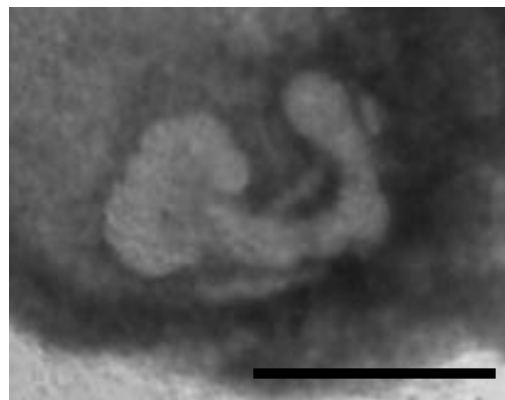
E12.5-16.5 の胎仔マウス顎下腺原基における発生関連因子発現量を、Western blotting を用いて解析した。

#### 4. *Btbd7*, *Sox2*, *fibronectin* siRNA によるノックダウンの効果

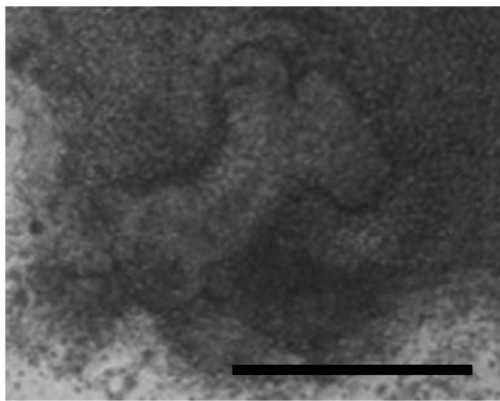
*Brachyury* と同様に *Btbd7*、*Sox2*、*fibronectin* も発生初期に強発現していることが確認できたため、E12.5-16.5 の胎仔マウスから顎下腺原基を分離し、*Btbd7*、*Sox2*、*fibronectin* siRNA ノックダウンによる効果を観察した (図 7)。  
*Brachyury* ノックダウンと同様に、いずれも導入後の顎下腺原基の cleft 形成や分枝形成が有意に抑制された。



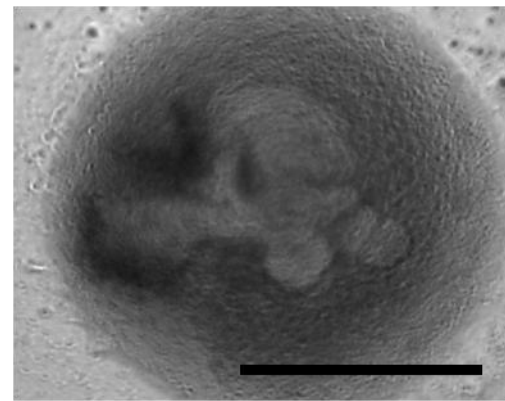
Control



*Btbd7* siRNA(+)



*Sox2* siRNA(+)



*fibronectin* siRNA(+)

### 図 7. 各唾液腺発生関連因子ノックダウン時の器官培養の比較

E12.5 の胎仔マウスから分離した顎下腺原基に、*Btbd7*、*Sox2*、*fibronectin* siRNA を導入した。24 時間 siRNA を作用させ、さらに 24 時間通常の器官培養を実施し、分離して 48 時間経過後の顎下腺原基を観察した。コントロールには E12.5 の胎仔マウスから分離した顎下腺原基を 48 時間通常の器官培養したものを示した。Scale bar : 300  $\mu$ m

## 5. siRNA ノックダウンによる関連因子発現解析

*Brachyury*、*Btbd7*、*Sox2*、*fibronectin* いずれのノックダウンにおいても cleft 形成や分枝形成が抑制されたため、唾液腺の初期発生における制御機構を明らかにする目的で siRNA ノックダウンによる関連因子発現を Western blotting で解析した。その結果、*Brachyury* のノックダウンにより *Btbd7*、*Sox2* および *fibronectin* の発現が抑制された (図 8)。一方、*Btbd7*、*Sox2* および *fibronectin* のノックダウンでは *Brachyury* の発現に影響を与えなかった (図 9)。

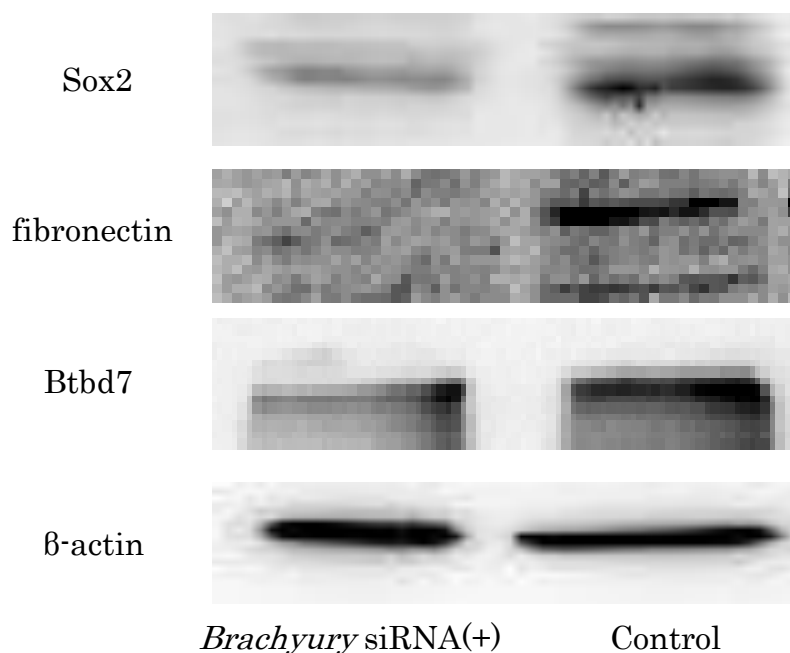


図 8. *Brachyury* ノックダウンによる唾液腺発生関連遺伝子発現量の比較  
E12.5 の胎仔マウスから分離した顎下腺原基に *Brachyury* siRNA を導入した。24 時間 siRNA 作用後、Western blotting で解析を行った。

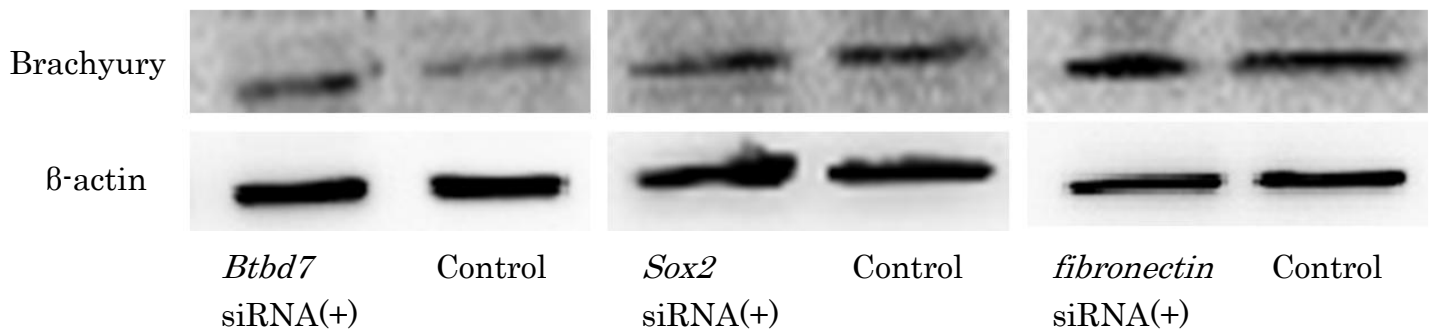


図 9.各遺伝子ノックダウンによる **Brachyury** 発現量の比較

E12.5 の胎仔マウスから分離した顎下腺原基に *Btbd7*、*Sox2*、*fibronectin* siRNA を導入した。24 時間 siRNA 作用後、Western blotting で解析を行った。

## 考察

唾液腺の分化調節機構に関する研究は、ヒト唾液腺腫瘍細胞株やヒト正常唾液腺から分離した培養細胞を使って行われてきた[35-38]。加えて、上皮性発達性器官である唾液腺、肺、腎臓や乳腺などの初期発生に関する研究は盛んに行われている。Grobstein [39]によって開発された器官培養法は、様々な臓器の初期発生や形態形成を検討する方法として多くの研究に利用されている。唾液腺の発生は口腔上皮の肥厚が粘膜直下の間葉組織に索状に侵入することにより始まる。その後、分枝形成、導管形成、終末部の細胞分化によって器官特異的な構造と機能を獲得する。この発生初期に見られる分岐は形態形成における必須の発生過程であり、将来的にぶどうの房のように多数の導管と腺房の繰り返し構造を作る。マウス顎下腺は E12.5 頃から上皮が分岐を開始する。この過程は単房の上皮に深い cleft を形成することによって始まり、3 次元的な枝分れ構造を形成するために腺房は cleft と bud を作り続ける。この cleft 形成や分枝形成は、増殖因子、細胞外基質、細胞接着因子など上皮間葉相互作用によって調節されていることが多くの研究で示されている [40-43]。

近年、組織構築における上皮間葉移行の重要性が明らかにされ、その制御遺伝子である Brachyury の関与が報告されている [30, 44-46]。Brachyury は T-box 転写因子の一つであり、X 線照射によるマウス突然変異として 1927 年

に発見された遺伝子座である。この突然変異体のホモ個体は中胚葉が十分に形成されず E11 程で死に至るが、ヘテロ個体は尾が短くなって生まれてくる。T 遺伝子座は複雑で、発見以来その機能の解明に多くの努力がなされ、*Brachyury* 遺伝子が 1990 年にクローニングされた。以来、この遺伝子のホモログが様々な動物から単離され、またその関連遺伝子としての T-box 遺伝子が多数発見され、これらの遺伝子が発生の様々な過程で働く新規の転写制御因子をコードする遺伝子ファミリーを形成することが明らかになりつつある。*Brachyury* は発生段階の中胚葉形成と分化に必須な遺伝子であることが報告されており、脊椎動物の発生過程において、Wnt や TGF $\beta$  などシグナル経路を構成する下流遺伝子を制御している。

近年の再生医療の位置づけは重要性を増しており、皮膚や軟骨など種々の臓器の再生が試みられているが、唾液腺の再生は十分な検討がなされていない。再生医療は、第一世代と呼ばれる造血幹細胞移植などの細胞移入に始まり、第二世代と呼ばれる皮膚シート、角膜シート、心筋シート、口腔粘膜上皮シートなどの 2 次元組織再生を経て、第三世代と呼ばれる 3 次元の臓器、器官再生の時代を迎えている。将来的に、幹細胞は再生医療や創薬において重要な役割を果たすことが期待されている [47, 48]。一方、癌幹細胞は正常組織における幹細胞が有する性格を有していることが報告されており [49]、当分野でも唾液腺悪



性腫瘍細胞株を用い、*Brachyury* をノックダウンすることで自己複製能や癌幹細胞マーカーが消失することを証明し、癌幹細胞の制御に *Brachyury* が中心的制御因子として関わっていることを示唆している [30]。ES 細胞（胚性幹細胞）は体中すべての細胞に分化する可能性を保っているが、受精卵を利用しなければ得られないことから倫理的な取り扱いが障害となる。iPS 細胞（人工多能性幹細胞）は体細胞に特定の遺伝子を導入することで ES 細胞と同様に様々な細胞に分化することが可能である。iPS 細胞は受精卵を利用せずに得られる万能細胞であるため、ES 細胞の持つ倫理的問題を解決出来ると期待されている。一方、iPS 細胞が ES 細胞と同等の万能細胞であり、理論的に iPS 細胞由来のヒト胚の作製が可能だとすると新たな倫理的検討が必要である。

再生医療において、幹細胞の同定は必須の条件である。唾液腺は組織学的には排泄導管、線条部導管、介在部導管、さらに終末部に漿液性または粘液性の腺房細胞により構成されており、介在部導管や腺房細胞の基底側には筋上皮細胞が存在している。唾液腺組織幹細胞については、介在部導管に存在するのではないかと考えられているが、現在のところは確定的な証明はなされていない。また、成熟唾液腺においては細胞誘導性を持った幹細胞は認められない。当分野では、唾液腺の再生医療を実現するためにマウス胎仔顎下腺より唾液腺幹細胞の分離を行い、*in vivo* または *in vitro* で唾液腺の組織再構築が可能である

ことを証明した。再構築組織の免疫組織化学染色では、最終分化マーカーであるアクアポリン 5 の局在を認めたことにより、再構築組織は正常組織の terminal bud stage 相当まで分化していることが示唆された。近年、唾液腺全摘出マウスに再生唾液腺原基を導管接続し、再生唾液を口腔内へ分泌させ、唾液腺摘出に伴う口腔内の洗浄や嚥下障害を機能的に回復させることが可能であると報告された [50]。しかし、唾液腺再生および移植の臨床応用を行う際、唾液腺細胞の供給源は成人障害唾液腺となるため、最終分化を完了した組織から唾液腺幹細胞を誘導し、唾液腺再構築へ発展させる必要がある。

そこで、本研究では前述の *Brachyury* に着目し、マウス胎仔唾液腺の発生における *Brachyury* の関与について検討を行った。まず、マウス胎仔唾液腺における *Brachyury* の発現動態をリアルタイム PCR 法と Western blotting で解析した。結果、発生初期の E12.5-13.5 にかけて急激な *Brachyury* の発現増加を認めた。この現象は *Brachyury* が形態形成初期に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆されたため、器官培養法を用いて *Brachyury* 遺伝子のノックダウンによる形態形成への影響を検討した。発生初期の E12.5 から分離した顎下腺原基に対し *Brachyury* 遺伝子をノックダウンすると有意に cleft 形成および分枝形成が抑制された。また、E13.5 でノックダウン開始した場合、cleft 形成や分枝形成はわずかに認められたが、24 時間を経過した時点では新たな

cleft 形成は阻害され、分枝形成も抑制されていた。一方、発生の進んだ E14.5-15.5 でノックダウンした場合は、ほとんどその影響が認められなかったことから、Brachyury は形態形成の開始となる cleft 形成を制御している可能性が示唆された。Cleft 形成や分枝形成は、様々な因子によって制御される複雑な発生過程である。Fibronectin は clefts 周囲に特異的に発現し、分岐点において上皮細胞同士の接着に必要な分子 E-cadherin を抑制し、インテグリンを介した細胞と細胞外マトリックスとの新しい接着を誘導することにより、分岐を促進することが知られている [51]。また、fibronectin によって cleft 周囲の上皮に誘導された Btbd7 が Snail2 (Slug) の誘導を調節し、E-cadherin の発現を抑制することで cleft 形成に続く分枝形成を促進することが報告されている [32]。また、Sox2 は Wnt, Notch, Hedgehog シグナルを制御することで発生期における幹細胞性や多能性の維持、発生の維持に必要とされる転写因子である [52]。さらに、Brachyury は Sox2 の発現を調節することによって癌幹細胞を制御する因子であることが報告されている [30]。そこで、マウス胎生期顎下腺の発生において Brachyury が fibronectin、E-cadherin、Btbd7、Sox2、Wnt3a とどのように関連しているかを確認するため、まず E12.5-16.5 顎下腺原基における発現を Western blotting で解析した。結果、fibronectin、Btbd7、Sox2、Wnt3a は Brachyury の発現動態と同様に E12.5-13.5 の発生初期に高

い発現を認めた。対照的に *Btbd7* によって制御される E-cadherin は分枝形成期に抑制されていた。*Brachyury* と同様に *Btbd7*、*Sox2*、*fibronectin* も発生初期に強発現していることが確認できたため、*Btbd7*、*Sox2*、*fibronectin* siRNA ノックダウンによる効果を観察した。結果、*Brachyury* ノックダウンと同様に、*Btbd7*、*Sox2*、*fibronectin* siRNA いずれの導入後の顎下腺原基も cleft 形成や分枝形成が有意に抑制された。そこで、唾液腺の初期発生における制御機構を明らかにする目的で siRNA ノックダウンによる関連因子発現を Western blotting で解析した。結果、*Brachyury* のノックダウンにより *Btbd7*、*Sox2* および *fibronectin* の発現が抑制されたのに対して、*Btbd7*、*Sox2* および *fibronectin* のノックダウンでは *Brachyury* の発現に影響を与えなかったことから、*Brachyury* は *fibronectin*、*Btbd7* や *Sox2* の上流でマウス顎下腺の初期発生を制御している可能性が示唆された。

マウス ES 細胞を用いた研究では、初期発生における経路として Wnt シグナル、FGF シグナル、Activin/Nodal シグナルが重要であることが報告されている。Wnt シグナルは canonical pathway と呼ばれる  $\beta$ -catenin を介したシグナル伝達の他に、Wnt/PCP や Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$  pathway が知られており、これらの三つの経路を介して形態形成誘導、細胞極性決定、増殖分化調節を担っているとされる。Wnt シグナルにより多能性関連遺伝子とされる Oct3/4、*Sox2*、

Nanog、Klf4 などの発現を誘導し、標的遺伝子として Brachyury や FGF が考えられている。一方、多能性維持には Wnt シグナルのみならず FGF シグナルも必須であることが報告されている。FGF シグナルは JAK/STAT3、PI3K/AKT、ERK/MAPK 系を介して、発生初期における上皮間葉移行、細胞遊走、器官形成に大きく関与しており、標的遺伝子として Brachyury や Sox2 を誘導することが報告されている。また、Brachyury は FGF や Wnt を標的遺伝子として形態形成に関与し、細胞接着に関与する fibronectin を中心とした中胚葉形成に寄与していることが報告されたことにより、発生初期において Wnt、FGF、Brachyury が相乗的に作用し自己活性化調節ループを形成し、これらの安定した発現により発生を維持していることが推察されている。

結論として、これまでの知見や本研究の結果から、Brachyury は fibronectin を誘導し、その fibronectin が Btbd7 の発現を促進する。Btbd7 は Snail2 を介して E-cadherin の発現を抑制することで、cleft 形成や分枝形成を制御する。一方、Wnt シグナルを介した Sox2 の発現を制御し、発育に必要な細胞増殖や発生の維持に寄与することで、Brachyury が唾液腺の発生初期において中心的な役割を果たしている可能性が考えられる (図 10)。

Brachyury がマウス顎下腺の初期発生に関与している可能性を示した報告は本研究が初めてである。Brachyury は幹細胞を制御する中心的な役割を果たし

ている可能性が数多く報告されており、今後、この Brachyury をターゲットにした唾液腺幹細胞誘導による再生医療への可能性が期待できる。

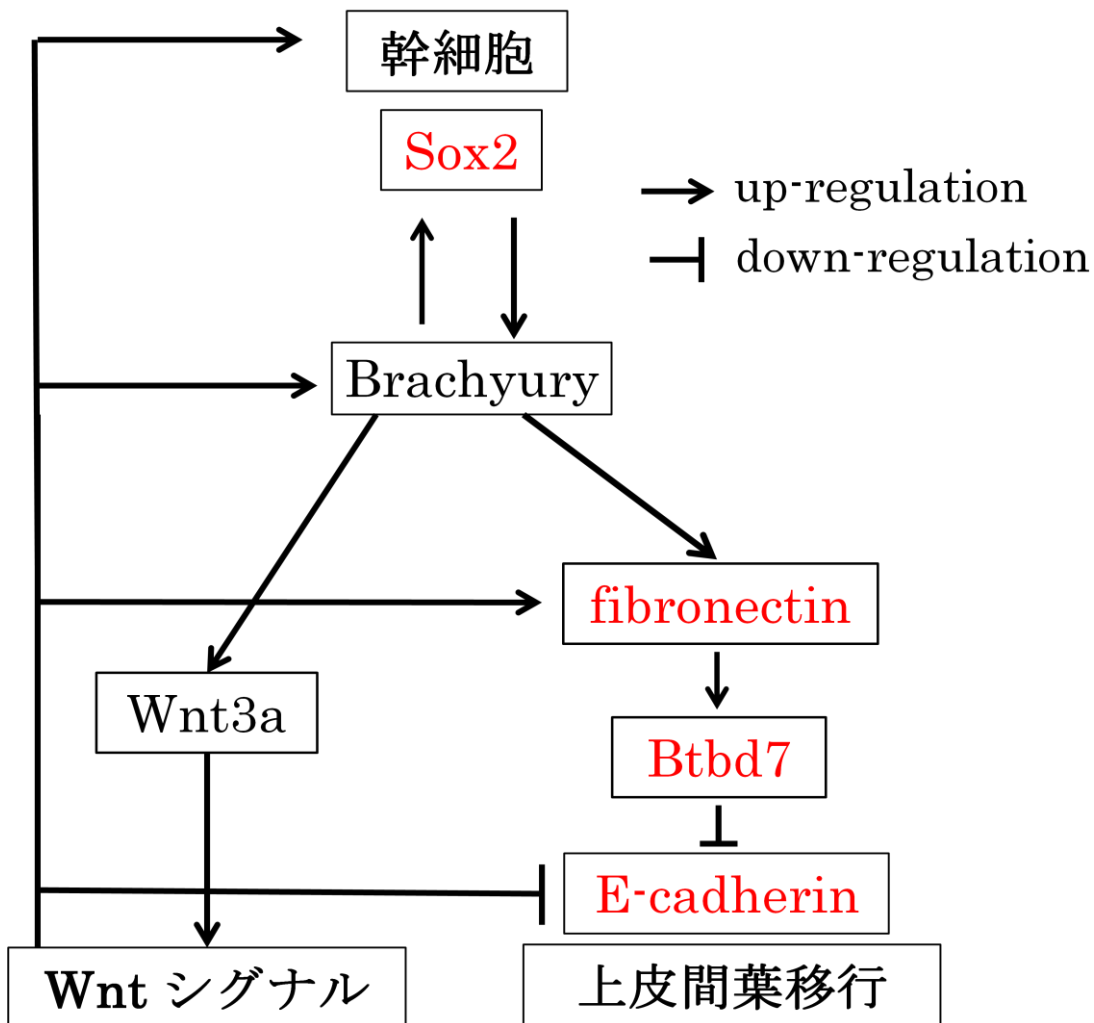


図 10. Brachyury を中心とした、発生時の各因子との関連を図式化明らかにされている Brachyury の役割に加え、赤字の Brachyury と fibronectin および Btbd7 の関係が今回の研究で示唆された。Sox2 と Brachyury の関係は本研究では明言できないが、何らかの関係がある可能性が考えられる。

## 総括

本研究は、唾液腺の再生治療に向けた基礎的研究として、マウス胎生期唾液腺発生における *Brachyury* 遺伝子の関与を検討した。

マウス顎下腺初期発生の開始 (cleft 形成) である E13.5 中心に、*Brachyury*、*fibronectin*、*Btbd7*、*Sox2*、*Wnt3a* の高発現を認めた。*Brachyury*、*Btbd7*、*Sox2*、*fibronectin* ノックダウンにより顎下腺の cleft 形成や分枝形成は有意に抑制された。*Brachyury* ノックダウンによって *fibronectin*、*Btbd7*、*Sox2* の発現低下を認めたが、*fibronectin*、*Btbd7*、*Sox2* ノックダウンでは *Brachyury* の発現に影響を与えなかった。

以上より、*Brachyury* は唾液腺の初期発生の開始となる cleft 形成を調節する中心的な役割を果たしている可能性が示唆された。*Brachyury* による唾液腺幹細胞への誘導および維持の可能性が考えられるため、引き続き発生関連遺伝子と *Brachyury* の関係を検討していく。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の課題を与え、ご懇篤なるご指導やご校閲を頂きました 森 悦秀 教授に深甚なる謝意を表します。本研究を遂行するにあたり、実験手技等のご指導、ご助言頂きました口腔顎顔面病態学講座 顎顔面腫瘍制御学分野 杉浦 剛 准教授に深謝致します。また、様々なご助言や励ましのお言葉を頂きました口腔顎顔面病態学講座 口腔顎顔面外科学分野の教官各位、研究室の皆様、研究生活を支えてくださった全ての皆様方に、心から深謝致します。



## 引用文献

1. Vissink A, Burlage FR, Spijkervet FK, Jansma J, Coppes RP. Prevention and treatment of the consequences of head and neck radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(3):213-25.
2. Vissink A, Jansma J, Spijkervet FK, Burlage FR, Coppes RP. Oral sequelae of head and neck radiotherapy. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(3):199-212.
3. Hayashi Y, Arakaki R, Ishimaru N. Salivary gland and autoimmunity. *J Med Invest.* 2009;56 Suppl:185-91.
4. Atkinson JC, Grisius M, Massey W. Salivary hypofunction and xerostomia: diagnosis and treatment. *Dent Clin North Am.* 2005 Apr;49(2):309-26.
5. Ship JA, Pillemer SR, Baum BJ. Xerostomia and the geriatric patient. *J Am Geriatr Soc.* 2002 Mar;50(3):535-43.
6. Edgar WM, Dawes CPD, O'Mullane DM. *Saliva and oral health.* 3rd ed. ed. London: British Dental Association; 2004.
7. Fox PC. Salivary enhancement therapies. *Caries Res.* 2004 2004 May-Jun;38(3):241-6.
8. Nakamura T, Matsui M, Uchida K, Futatsugi A, Kusakawa S, Matsumoto N, et al. M(3) muscarinic acetylcholine receptor plays a critical role in parasympathetic control of salivation in mice. *J Physiol.* 2004 Jul;558(Pt 2):561-75.
9. Saxén L, Sariola H. Early organogenesis of the kidney. *Pediatr Nephrol.* 1987 Jul;1(3):385-92.
10. Kratochwil K. Organ specificity in mesenchymal induction demonstrated in the embryonic development of the mammary gland of the mouse. *Dev Biol.* 1969 Jul;20(1):46-71.
11. Hieda Y, Nakanishi Y. Epithelial morphogenesis in mouse embryonic submandibular gland: its relationships to the tissue organization of epithelium and mesenchyme. *Dev Growth Differ.* 1997 Feb;39(1):1-8.
12. Hogan BL. Morphogenesis. *Cell.* 1999 Jan;96(2):225-33.
13. Warburton D, Schwarz M, Tefft D, Flores-Delgado G, Anderson KD, Cardoso WV. The molecular basis of lung morphogenesis. *Mech Dev.* 2000 Mar;92(1):55-81.
14. Shannon JM, Nielsen LD, Gebb SA, Randell SH. Mesenchyme specifies epithelial differentiation in reciprocal recombinants of embryonic lung and trachea. *Dev Dyn.* 1998 Aug;212(4):482-94.
15. Ikari T, Hiraki A, Seki K, Sugiura T, Matsumoto K, Shirasuna K. Involvement of hepatocyte growth factor in branching morphogenesis of murine salivary gland. *Dev Dyn.* 2003 Oct;228(2):173-84.
16. Grobstein C, Cohen J. Collagenase: effect on the morphogenesis of embryonic salivary

- epithelium in vitro. *Science*. 1965 Oct;150(3696):626-8.
17. Banerjee SD, Cohn RH, Bernfield MR. Basal lamina of embryonic salivary epithelia. Production by the epithelium and role in maintaining lobular morphology. *J Cell Biol*. 1977 May;73(2):445-63.
18. Spooner BS, Faubion JM. Collagen involvement in branching morphogenesis of embryonic lung and salivary gland. *Dev Biol*. 1980 Jun;77(1):84-102.
19. Thompson HA, Spooner BS. Proteoglycan and glycosaminoglycan synthesis in embryonic mouse salivary glands: effects of beta-D-xyloside, an inhibitor of branching morphogenesis. *J Cell Biol*. 1983 May;96(5):1443-50.
20. Nakanishi Y, Sugiura F, Kishi J, Hayakawa T. Collagenase inhibitor stimulates cleft formation during early morphogenesis of mouse salivary gland. *Dev Biol*. 1986 Jan;113(1):201-6.
21. Nakanishi Y, Sugiura F, Kishi J, Hayakawa T. Scanning electron microscopic observation of mouse embryonic submandibular glands during initial branching: preferential localization of fibrillar structures at the mesenchymal ridges participating in cleft formation. *J Embryol Exp Morphol*. 1986 Jul;96:65-77.
22. Fukuda Y, Masuda Y, Kishi J, Hashimoto Y, Hayakawa T, Nogawa H, et al. The role of interstitial collagens in cleft formation of mouse embryonic submandibular gland during initial branching. *Development*. 1988 Jun;103(2):259-67.
23. Hardman P, Spooner BS. Collagen in organ development. *Trans Kans Acad Sci*. 1992;95(1-2):29-33.
24. Kadoya Y, Kadoya K, Durbeej M, Holmval K, Sorokin L, Ekblom P. Antibodies against domain E3 of laminin-1 and integrin alpha 6 subunit perturb branching epithelial morphogenesis of submandibular gland, but by different modes. *J Cell Biol*. 1995 Apr;129(2):521-34.
25. Kadoya Y, Nomizu M, Sorokin LM, Yamashina S, Yamada Y. Laminin alpha1 chain G domain peptide, RKRLQVQLSIRT, inhibits epithelial branching morphogenesis of cultured embryonic mouse submandibular gland. *Dev Dyn*. 1998 Jul;212(3):394-402.
26. Hosokawa Y, Takahashi Y, Kadoya Y, Yamashina S, Nomizu M, Yamada Y, et al. Significant role of laminin-1 in branching morphogenesis of mouse salivary epithelium cultured in basement membrane matrix. *Dev Growth Differ*. 1999 Apr;41(2):207-16.
27. Mitani Y, Takahashi H, Satoh N. An ascidian T-box gene *As-T2* is related to the *Tbx6* subfamily and is associated with embryonic muscle cell differentiation. *Dev Dyn*. 1999 May;215(1):62-8.
28. Kispert A, Herrmann BG, Leptin M, Reuter R. Homologs of the mouse *Brachyury* gene are involved in the specification of posterior terminal structures in *Drosophila*, *Tribolium*,

- and *Locusta*. *Genes Dev.* 1994 Sep;8(18):2137-50.
29. Vidricaire G, Jardine K, McBurney MW. Expression of the Brachyury gene during mesoderm development in differentiating embryonal carcinoma cell cultures. *Development.* 1994 Jan;120(1):115-22.
30. Shimoda M, Sugiura T, Imajyo I, Ishii K, Chigita S, Seki K, et al. The T-box transcription factor Brachyury regulates epithelial-mesenchymal transition in association with cancer stem-like cells in adenoid cystic carcinoma cells. *BMC Cancer.* 2012;12:377.
31. Patel N, Sharpe PT, Miletich I. Coordination of epithelial branching and salivary gland lumen formation by Wnt and FGF signals. *Dev Biol.* 2011 Oct;358(1):156-67.
32. Onodera T, Sakai T, Hsu JC, Matsumoto K, Chiorini JA, Yamada KM. *Btbd7* regulates epithelial cell dynamics and branching morphogenesis. *Science.* 2010 Jul;329(5991):562-5.
33. Jaskoll T, Melnick M. Submandibular gland morphogenesis: stage-specific expression of TGF- $\alpha$ /EGF, IGF, TGF- $\beta$ , TNF, and IL-6 signal transduction in normal embryonic mice and the phenotypic effects of TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, and EGF-r null mutations. *Anat Rec.* 1999 Nov;256(3):252-68.
34. Tucker AS. Salivary gland development. *Semin Cell Dev Biol.* 2007 Apr;18(2):237-44.
35. Shirasuna K, Morioka S, Watatani K, Hayashido Y, Furusawa H, Sugiyama M, et al. Growth inhibition and differentiation of human salivary adenocarcinoma cells by medium conditioned with normal human fibroblasts. *Cancer Res.* 1988 May;48(10):2819-24.
36. Okura M, Shirasuna K, Hiranuma T, Yoshioka H, Nakahara H, Aikawa T, et al. Characterization of growth and differentiation of normal human submandibular gland epithelial cells in a serum-free medium. *Differentiation.* 1993 Sep;54(2):143-53.
37. Hiraki A, Shirasuna K, Ikari T, Shinohara M, Garrod DR. Calcium induces differentiation of primary human salivary acinar cells. *J Cell Physiol.* 2002 Oct;193(1):55-63.
38. Shirasuna K, Watatani K, Sugiyama M, Morioka S, Miyazaki T. Isolation and characterization of different clones including myoepithelial-like variants from a clonal neoplastic epithelial duct cell line of human salivary gland origin. *Cancer Res.* 1986 Mar;46(3):1418-26.
39. Grobstein C. Epithelio-mesenchymal specificity in the morphogenesis of mouse sub-mandibular rudiments in vitro  
*Journal of Experimental Zoology* Volume 124, Issue 2. *Journal of Experimental Zoology*; 1953. p. 383-413.
40. Morita K, Nogawa H. EGF-dependent lobule formation and FGF7-dependent stalk elongation in branching morphogenesis of mouse salivary epithelium in vitro. *Dev Dyn.* 1999 Jun;215(2):148-54.
41. Kashimata M, Sayeed S, Ka A, Onetti-Muda A, Sakagami H, Faraggiana T, et al. The

- ERK-1/2 signaling pathway is involved in the stimulation of branching morphogenesis of fetal mouse submandibular glands by EGF. *Dev Biol.* 2000 Apr;220(2):183-96.
- 42.Hoffman MP, Kidder BL, Steinberg ZL, Lakhani S, Ho S, Kleinman HK, et al. Gene expression profiles of mouse submandibular gland development: FGFR1 regulates branching morphogenesis in vitro through BMP- and FGF-dependent mechanisms. *Development.* 2002 Dec;129(24):5767-78.
- 43.Niswander L, Martin GR. FGF-4 and BMP-2 have opposite effects on limb growth. *Nature.* 1993 Jan;361(6407):68-71.
- 44.Imajyo I, Sugiura T, Kobayashi Y, Shimoda M, Ishii K, Akimoto N, et al. T-box transcription factor Brachyury expression is correlated with epithelial-mesenchymal transition and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2012 Dec;41(6):1985-95.
- 45.Ber S, Lee C, Voiculescu O, Surani MA. Dedifferentiation of foetal CNS stem cells to mesendoderm-like cells through an EMT process. *PLoS One.* 2012;7(1):e30759.
- 46.Fernando RI, Litzinger M, Trono P, Hamilton DH, Schlom J, Palena C. The T-box transcription factor Brachyury promotes epithelial-mesenchymal transition in human tumor cells. *J Clin Invest.* 2010 Feb;120(2):533-44.
- 47.Fernandez TeS, de Souza Fernandez C, Mencialha AL. Human induced pluripotent stem cells from basic research to potential clinical applications in cancer. *Biomed Res Int.* 2013;2013:430290.
- 48.Mordwinkin NM, Burridge PW, Wu JC. A review of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for high-throughput drug discovery, cardiotoxicity screening, and publication standards. *J Cardiovasc Transl Res.* 2013 Feb;6(1):22-30.
- 49.Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol.* 2003 Dec;15(6):740-6.
- 50.Ogawa M, Oshima M, Imamura A, Sekine Y, Ishida K, Yamashita K, et al. Functional salivary gland regeneration by transplantation of a bioengineered organ germ. *Nat Commun.* 2013;4:2498.
- 51.Sakai T, Larsen M, Yamada KM. Fibronectin requirement in branching morphogenesis. *Nature.* 2003 Jun;423(6942):876-81.
- 52.Hotta K, Takahashi H, Satoh N, Gojobori T. Brachyury-downstream gene sets in a chordate, *Ciona intestinalis*: integrating notochord specification, morphogenesis and chordate evolution. *Evol Dev.* 2008 2008 Jan-Feb;10(1):37-51.