

令和元年6月24日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02575

研究課題名(和文) 唾液腺をモデルとした3次元臓器再生技術の開発

研究課題名(英文) Development of 3-dimensional regeneration technique using salivary gland

研究代表者

阪井 丘芳 (Sakai, Takayoshi)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：90379082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,700,000円

研究成果の概要(和文)：T7-SAGE法を用いて唾液腺形成に重要な遺伝子を探索し、Lactoferrin (LF) receptor 1を見出した。放射線治療は外科的治療と同様に頭頸部癌に対して有効な治療法の1つであるが、照射領域に唾液腺が含まれると障害が生じる。マウス胎仔と成体唾液腺を用いて、LFの放射線防護作用を調べた。LFは胎仔唾液腺の細胞増殖と分枝形態形成を誘導し、CyclinD1を介した細胞周期の進行を早めた。LFを投与した唾液腺は、腺房細胞の構造と唾液分泌機能を維持していた。これらの知見により、LFは唾液腺の放射線照射に対する防護作用を有しており、放射線障害に対する有用な薬剤であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線治療は外科的治療と同様に頭頸部癌に対して有効な治療法の1つであるが、照射領域に唾液腺が含まれると障害が生じる。障害が生じると治療を進めることが困難になる。唾液腺の放射線障害抑制と臓器再生を目指して、唾液腺上皮に発現する遺伝子ライブラリーを作製し、その中からLactoferrin (LF) receptor 1を見出した。LFを投与した唾液腺は、腺房細胞の構造と唾液分泌機能を維持していた。LFは唾液腺の放射線照射に対する防護作用を有しており、放射線障害に対する有用な薬剤であることが示唆された。本研究によって3次元再生治療薬の開発へと臨床応用が期待されている。

研究成果の概要(英文)：We identified the gene expression of salivary gland epithelium from our T7-SAGE library to regenerate salivary gland. Lactoferrin receptor 1 (LFR1) is one of genes that highly expresses in bud epithelium of salivary gland. Radiotherapy is commonly used in patients with head and neck cancer, and usually results in irreversible salivary glands damage and hypofunction. It is therefore important to manage such irradiation to prevent damage to the salivary glands. We investigated the radioprotective and regenerative effect of LF using both ex vivo submandibular salivary gland organ culture and ICR male mice in vivo. We found that LF had effects on both cell proliferation and CyclinD1-mediated cell-cycle progression which were regulated via the ERK1/2 and AKT signal transduction pathways. In addition, LF affected acinar cell structure and function after irradiation. These findings suggest that LF may be a useful agent to prevent irradiation effects in salivary glands.

研究分野：外科系歯学

キーワード：唾液腺

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は大阪大学歯学部附属病院に口腔乾燥症(ドライマウス)専門外来を設立し治療に取り組んできた。ドライマウスに対する治療法は人工唾液を投与する対症療法が主体であるため、新たに腺組織を再生させる等の画期的な治療法の開発が期待されている。近年、iPS細胞が作製され、網膜再生医療の実施に対して注目が集まっているが、細胞から3次的に複雑な構造を有する臓器を形成し機能回復をはかるまでには障壁がある。多くの臓器(肺、唾液腺、腎臓、前立腺等)は、胎生期において上皮の塊が生じ立体的な分枝(枝分かれ)を繰り返し形成される。分枝は臓器形成に重要な現象であり、再生医療の鍵を握っていると考えられる。顎下腺の発生では、間葉組織に包まれた上皮細胞が増殖を繰り返し電球状になり、分枝を開始する。深く狭い cleft(切れ目)が生じることから分枝が始まり、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形成する。分枝は臓器が液体やガスの分泌・交換を機能的に行うために必須の現象であるが、どうして上皮細胞がある特定部位に cleft を形成し分枝形成するかについては解明されていない。

### 2. 研究の目的

再生医療研究が多くのメディアで取りあげられているが、3次元的な立体構造を有する臓器を再生させるには障壁があり、未だに実現は困難とされている。申請者は、唾液腺をモデルとして、障害を受けた臓器の再生医療を行うことを目的としている。cleft と bud に発現する遺伝子のデータベースを探索し、特徴的なタンパク構造を有する遺伝子に着目し、網羅的に同定する。損傷したマウス唾液腺の腺房に、遺伝子導入や薬剤投与により、分枝形成を誘導し、部分的に3次元的な上皮構造を再構築し機能回復を図る。将来的には、分化誘導した iPS 細胞や幹細胞を注入し、臓器の再生を試みる。唾液腺で得られた成果を活用して、肺・腎臓・前立腺なども含めた分枝形成を伴い発達する臓器の再生医療に応用していきたい。

### 3. 研究の方法

#### 1) 唾液腺の分枝部位に発現する遺伝子のスクリーニング

平成 19~20 年度: 基盤研究(B)「臓器再生をめざした唾液腺分枝形態形成機構の解析」で得られた遺伝子データベースをもとに研究を開始する。唾液腺分枝形態形成機構を解明するために、マウス胎仔の唾液腺上皮の cleft(分枝部)と bud(非分枝部)に特異的に発現する遺伝子を連続的遺伝子発現解析法: SAGE(Serial Analysis of Gene Expression)法で網羅的に同定した。本法はマイクロアレイと比べて、遺伝子の発現が比率として定量されるのではなく、tag(遺伝子の名札)の数で評価される。SAGE法は、多量の total RNAが必要であるため、少量のサンプルに対しては、申請者が T7-based RNA amplification 法を組み合わせた T7-SAGE 法を開発した。この T7-SAGE 法を用いて、唾液腺上皮の cleft と bud に発現する遺伝子のデータベースを構築したため、有効に活用する。作製した T7-SAGE ライブラリーの cleft と bud を対比して cleft に強く発現する遺伝子をリストアップする。実際に臨床応用をめざすためには、詳細な機能を明らかにする必要がある。遺伝子ライブラリーの中から分枝形態形成に重要な遺伝子を見いだすために、機能を推測する。フリーのウェブサイトである PROSITE(<http://prosite.expasy.org/>)を用いてタンパク質構造を推測し、特徴的な機能ドメインを有する遺伝子を選択する。

#### 2) cleft 上皮に特異的に発現する遺伝子の発現量確認

リストアップした cleft 上皮や bud 上皮に特異的に発現する遺伝子の確認を RT-PCR 法で行う。

#### 3) cleft 上皮に特異的に発現する遺伝子の発現分布確認

*in situ hybridization* を用いて mRNA レベルの発現分布、あるいは、既知の遺伝子であれば、既存する抗体を使用し免疫染色法を用いて、発現分布を確認する。cleft 形成に関わる領域に発現しているかを検討する。問題点として、発現量の高い遺伝子の場合には比較的解析が容易であるが、低い場合は微弱な発現を見逃さない解析手段が必要となってくる。その際は、シグナル増幅システムを用いると、RI と同様の高感度で、発現分布を調べることができる。

#### 4) 器官培養を用いた RNA 干渉(siRNA, small interfering RNA)法による阻害実験

T7-SAGE 法、RT-PCR 法、*in situ hybridization* 法あるいは免疫染色法にてその遺伝子が cleft や bud に特異的に高く発現することが確認された場合は、RNA 干渉法で機能的阻害実験を行い、分枝を実際に制御しているかを検討する。

#### 5) 唾液腺局所再生モデルの試み

遺伝子情報を用いて、唾液腺組織・細胞に対して遺伝子導入あるいは薬剤投与を行い、障害を受けた唾液腺の組織修復を試みる。

### 4. 研究成果

研究方法 1) の遺伝子探索に時間を費やしたが、Bud 上皮に、既知の遺伝子である LRP (Lactoferrin receptor 1) を見出した。そのため、2) 3) 5) の計画を円滑に遂行するために、4) の siRNA による阻害実験と並行しながら、リガンドに相当するラクトフェリンを直接用いて機能解析を行った。本成果を中心に報告する。

ラクトトランスフェリン、すなわちラクトフェリン (LF) はトランスフェリンファミリーの 1 つであり、唾液腺や乳腺からの分泌物に含まれる 80 kDa の鉄結合性糖タンパク質である。LF は多彩な生物活性を有しており、抗酸化物質として宿主の保護に貢献し、細胞増殖と分化、骨形成、胚発生、細胞接着、サイトカイン産生にも関与している。近年、LF は放射線防護効果を有することが示されていたが、この活性のメカニズムは明らかにされていなかった。本研究では、致死量の放射線量を照射したマウス唾液腺の変化と LF の効果を検討した。

#### 1) LF は胎児唾液腺の分枝形態形成を誘導する

唾液腺、肺、腎臓は分枝形態形成を繰り返すことによって 3 次元的な臓器を形成する。我々はこの形態形成機構を再生医療に応用しようと考えている。唾液腺が分枝形態形成を行う時期に LF 受容体 (LRP1) の発現が著明であることから、LF が胎児唾液腺の発達に影響を与えると仮定した。LF は唾液、涙液などに含まれ、特に乳汁中に高濃度で含まれる (マウス: 0.2~2.0 mg/ml、ヒト: 1.0~2.0 mg/ml)。そこで、本研究のマウス胎児器官培養で使用している LF の濃度を 1.0 mg/ml と設定し、成体の腹腔内注射には 4.0 mg/animal の LF を使用した。器官培養培地への LF の添加後 0 時間、24 時間、48 時間で分枝形態形成を腺房の数で評価した。LF の添加は腺房の数を有意に増加させた。さらに、低濃度の 0.1 mg/ml LF でも同様の効果が得られた。

#### 2) LF は胎児唾液腺の細胞増殖を誘導する

LF が胎児唾液腺の分枝形態形成を誘導することが明らかになったが、その詳細なメカニズムは不明であった。細胞増殖との関連性を評価するために、胎生 12.5 日目 (E12.5) 唾液腺を 24 時間培養し、その培養液中に 5-エチニル-2'-デオキシウリジン (EdU) を添加し、48 時間後に評価した。LF は唾液腺の細胞増殖を高めることにより、分枝形態形成を誘導していることが示唆された。

#### 3) LF はサイクリン D1 の発現を上昇させる

過去の研究において、サイクリン D1 が細胞増殖の G1 期に重要な役割を果たしていることが知られている。G1 期は細胞外刺激に反応することができる唯一の段階であり、細胞周期の調節によって細胞の運命を決定する。我々は LF がサイクリン D1 の活性化に影響を与えているかどうかを解析した。胎児唾液腺を 24 時間培養し、培養液中に LF を添加して 48 時間後に評価したところ、サイクリン D1 が増加していた。本データは、LF がサイクリン D1 を介して、細胞増殖に影響を与えていることを示している。

#### 4) LF は ERK1/2 および AKT のリン酸化を増加させる

LRP1 は、LF15、16、17 に対する細胞受容体である。唾液腺の発生段階に LRP1 が発現しており、E13 における LRP1 は E15、E17、P1、P42 などの発生後期よりも有意に高かった。分枝形態形成は ERK1/2 および AKT シグナル伝達経路を介しており、ERK1/2 と AKT の活性化が細胞周期の進行に関与している。E12.5 唾液腺を 72 時間培養した後、培地に LF を添加したところ、ERK1/2、AKT のリン酸化を認めた。LF による ERK1/2、AKT のリン酸化は 10 分後に活性化し、60 分後に減少した。さらに、LF の濃度依存的に ERK1/2 と AKT のリン酸化の上昇を認めた。これらのデータは、LF が ERK1/2、AKT のシグナル伝達経路を介して、唾液腺の細胞周期に影響を与え、Cyclin D1 の活性化に関与していることが示唆された。

#### 5) LF は ERK1/2 と AKT シグナル伝達系を介して分枝形態形成を誘導する

LF による分枝形態形成の ERK1/2、AKT シグナル伝達経路への関与を検証するために、阻害実験を行った。20  $\mu$ M U0126 (ERK1/2 を阻害する)、20  $\mu$ M LY294002 (AKT シグナルを阻害する PI3K 阻害剤) をそれぞれの培地に添加し、DMSO 処理した唾液腺をコントロールとして、分枝形態形成を比較した。U0126 の添加により唾液腺の分枝形態形成が制御され、細長い導管形態を示した。この形態は、DMSO で処理したコントロール顎下腺と著しく異なっていた。LY294002 で処置した顎下腺の腺房数は、U0126 処置した顎下腺よりわずかに多かった。コントロール顎下腺と比較してサイズ自体は縮小していた。U0126 と LY294002 を組み合わせて投与すると、より強い抑制効果を有し、各阻害剤単独より分枝形態形成を抑制していた。さらに ERK1/2、AKT のリン酸化を阻害剤の有無で確認したところ、阻害剤の存在下で 10 分後に阻害された。これらのデータは、LF が ERK1/2、AKT シグナル伝達経路を介して、分枝形態形成に影響を及ぼしていることを示している。

#### 6) LF は成体唾液腺の放射線障害を抑制する

成体唾液腺に 9 Gy の放射線を照射した後、1 週間を経過し、病理組織を解析した。唾液腺は

障害を受け、上皮組織・間葉組織ともに細胞間隙が拡大し、腺房組織自体が著しい萎縮を示していた。照射直後に 4.0 mg/animal のラクトフェリンを腹腔内注射し、1 週間経過後に病理組織を解析したところ、細胞間隙が充実したままに保存されており、腺房自体の萎縮が生じなかった。放射線障害に対する明らかな防護作用を認めた。詳細なメカニズム解析はこれから必要とされるが、胎仔唾液腺の器官培養実験と同様にサイクリン D1 が増加していた。少なくとも障害から生き残った組織の細胞増殖活性の増加が、組織障害の進行を制御していることが示唆された。

(参考文献)

Identification of the protective mechanisms of Lactoferrin in the irradiated salivary gland. *Sci Rep* 7(1):9753, 2017, DOI: 10.1038/s41598-017-10351-9

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 16 件)

Okuno K, Ono Minagi H, Ikai K, Matsumura Ai E, Takai E, Fukatsu H, Uchida Y, Sakai T. The efficacy of nasal airway stent (Nastent) on obstructive sleep apnoea and prediction of treatment outcomes. *J Oral Rehabil* 46(1): 51-57, 2019 (査読有)  
DOI: 10.1111/joor.12725

Tanaka J, Ogawa M, Hojo H, Kawashima Y, Mabuchi Y, Hata K, Nakamura S, Yasuhara R, Takamatsu K, Irie T, Fukada T, Sakai T, Inoue T, Nishimura R, Ohara O, Saito I, Ohba S, Tsuji T, Mishima K. Generation of orthotopically functional salivary gland from embryonic stem cells. *Nat Commun* 9(1): 4216, 2018 (査読有)  
DOI: 10.1038/s41467-018-06469-7

Matsushita T, Sakai M, Yoshida H, Morita S, Hieda Y, Sakai T. Grhl2 regulation of SPINT1 expression controls salivary gland development. *Biochem Biophys Res Commun* 504(1): 263-269, 2018 (査読有)  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.08.166.

Sarper SE, Kurosaka H, Inubushi T, Ono Minagi H, Kuremoto KI, Sakai T, Taniuchi I, Yamashiro T. Runx1-Stat3-Tgfb3 signaling network regulating the anterior palatal development. *Sci Rep* 8(1):11208, 2018 (査読有)  
DOI: 10.1038/s41598-018-29681-3

Sarper SE, Inubushi T, Kurosaka H, Ono Minagi H, Kuremoto KI, Sakai T, Taniuchi I, Yamashiro T. Runx1-Stat3 signaling regulates the epithelial stem cells in continuously growing incisors. *Sci Rep* 8(1):10906, 2018 (査読有)  
DOI: 10.1038/s41598-018-29317-6

Minagi HO, Ikai K, Araie T, Sakai M, Sakai T. Benefits of long-term pilocarpine due to increased muscarinic acetylcholine receptor 3 in salivary glands. *Biochem Biophys Res Commun* 503(2):1098-1102, 2018 (査読有)  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.06.125

Araie T, Okuno K, Ono Minagi H, Sakai T. Dental and skeletal changes associated with long-term oral appliance use for obstructive sleep apnea: A systematic review and meta-analysis. *Sleep Med Rev* 41:161-172, 2018 (査読有)  
DOI: 10.1016/j.smrv.2018.02.006

Tokuhara Y, Morinishi T, Matsunaga T, Sakai M, Sakai T, Ohsaki H, Kadota K, Kushida Y, Haba R, Hirakawa E. Nuclear expression of claudin-3 in human colorectal adenocarcinoma cell lines and tissues. *Oncol Lett* 15(1):99-108, 2018 (査読有)  
DOI: 10.3892/ol.2017.7281

Minagi HO, Okuno K, Nohara K, Sakai T. Predictors of Side Effects With Long-Term Oral Appliance Therapy for Obstructive Sleep Apnea. *J Clin Sleep Med* 14(1):119-125, 2018 (査読有)  
DOI: 10.5664/jcsm.6896.

Uchida H, Nakamura TJ, Takasu NN, Obana-Koshino A, Ono H, Todo T, Sakai T, Nakamura

W. The central clock controls the daily rhythm of Aqp5 expression in salivary glands. *J Physiol Sci* 68(4): 377-385, 2018 ( 査読有 )  
DOI: 10.1007/s12576-017-0540-1

Sakai M, Matsushita T, Hoshino R, Ono H, Ikai K, Sakai T. Identification of the protective mechanisms of Lactoferrin in the irradiated salivary gland. *Sci Rep* 7(1):9753, 2017 ( 査読有 )  
DOI: 10.1038/s41598-017-10351-9

Matsuno K, Nohara K, Fukatsu H, Tanaka N, Fujii N, Sasao Y, Sakai T. Videoendoscopic evaluation of food bolus preparation: A comparison between normal adult dentates and older adult dentates. *Geriatr Gerontol Int* 17(2):226-231, 2017 ( 査読有 )  
DOI: 10.1111/ggi.12697

Okuno K, Nohara K, Takai E, Sakai T, Fleetham JA, Ayas NT, Lowe AA, Almeida FR. Sleep Stage Coordination of Respiration and Swallowing: A Preliminary Study. *Dysphagia* 31(4):579-86, 2016 ( 査読有 )  
DOI: 10.1007/s00455-016-9719-5

Okuno K, Sasao Y, Nohara K, Sakai T, Pliska BT, Lowe AA, Ryan CF, Almeida FR. Endoscopy evaluation to predict oral appliance outcomes in obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J*, 47(5):1410-9, 2016 ( 査読有 )  
DOI: 10.1183/13993003.01088-2015

Ono H, Obana A, Usami Y, Sakai M, Nohara K, Egusa H, Sakai T. Regenerating Salivary Glands in the Microenvironment of Induced Pluripotent Stem Cells. *Biomed Res Int* 2015:293570, 2015 ( 査読有 )  
DOI: 10.1155/2015/293570

Taketa H, Sathi GA, Farahat M, Rahman KA, Sakai T, Hirano Y, Kuboki T, Torii Y, Matsumoto T. Peptide-modified Substrate for Modulating Gland Tissue Growth and Morphology In Vitro. *Sci Rep* 5:11468, 2015 ( 査読有 )  
DOI: 10.1038/srep11468

[ 学会発表 ] ( 計 6 件 )

Ikai K, Minagi H, Sakai M, Araie T, Sakai T: Analysis of transcriptional factor p63 expression in salivary glands regeneration, Gordon Research Conference -Salivary glands & Exocrine Biology 2019-, Texas, USA, February 3, 2019

Sakai T, Sakai M, Matsushita R, Hoshino R, Ikai K, Minagi-Ono H: Lactoferrin Promotes Salivary Gland Development and Radioprotection, 96th General Session & Exhibition of the IADR, London, July 25-28, 2018

Ono H, Ikai K, Matsushita T, Sakai M, Sakai T: Pilocarpine benefit in stem cell therapy; regeneration for human and mouse salivary glands, Gordon Research Conference, February 19-24, 2017, Galveston, Texas, USA

Ikai K, Sakai M, Matsushita T, Ono H, Sakai T: Lactoferrin promotes salivary gland development and radioprotection, Gordon Research Conference -Salivary glands & Exocrine Biology-, February 19-24, 2017, Texas, USA

Sakai T: Exploration of Mechanisms of Salivary Gland and Palatal Development using Databases, Symposium on tooth Development and Regeneration, February 12, 2016, Hong Kong

Ono H, Obana A, Usami Y, Sakai M, Miura J, Egusa H, Sakai T: Models of salivary gland differentiation using induced pluripotent stem (iPS) cells, 47th Meeting of Continental European Division of the International Association for Dental Research, September 15, 2015, Antalya, Turkey

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：野原 幹司  
ローマ字氏名：Kanji Nohara  
所属研究機関名：大阪大学  
部局名：歯学研究科  
職名：准教授  
研究者番号(8桁)：20346167

研究分担者氏名：福本 敏  
ローマ字氏名：Satoshi Fukumoto  
所属研究機関名：九州大学  
部局名：歯学研究院  
職名：教授  
研究者番号(8桁)：30264253

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。