

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15773

研究課題名(和文) 分子解析による赤唇発生機構の解明～再生に向けた展開研究～

研究課題名(英文) Elucidation of developmental mechanism on vermillion by molecular analysis
-exploratory study for regeneration of vermillion-

研究代表者

前田 健康 (MAEDA, TAKEYASU)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：40183941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：赤唇はヒト特有の組織で、その再建は審美的にも重要である。しかしながら、その特殊性のため、実験動物を用いた研究は不可能である。本研究では赤唇の組織特殊性を解明するために、成人の赤唇にいかなる分子が発現しているかを検討した。赤唇部には、long noncoding RNA (lncRNA)、small nuclear RNA (snRNA) が、粘膜部よりも多く認められ、またホメオボックスを有するPAX遺伝子の発現が認められた。粘膜部に発現せず、赤唇部にのみ強く発現していた分子として、PPDPFなどが確認された。赤唇の特殊性は粘膜部とは非常に違う分子機構により制御されている可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Vermillion is a human-specific tissue whose reconstruction is esthetically important. However, due to its unique nature, it is impossible to clarify its specificity using animal models. In order to elucidate the tissue specificity of the vermillion, this project examined which molecules are expressed in the adult vermillion. The vermillion expressed long noncoding RNA (lncRNA) and small nuclear RNA (snRNA) more than in the lip mucosa, in addition to PAX gene with the homeobox. Many genes including PPDPF were detected as molecules which never expressed in the mucosa but strongly only in the vermillion. These data suggest that the specificity of the vermillion is controlled by different molecular mechanism from the mucosa.

研究分野：口腔組織・発生学

キーワード：赤唇 RNA-seq解析

1. 研究開始当初の背景

人間がQOLの保たれた社会生活を営むにあたり、顔面の審美は最も重要な要素の一つである。口唇は、その顔面の審美の中でも、極めて大きな要素であり、特に赤唇部は口唇の審美性のほとんどを担う部分である。口唇裂、事故や火傷による赤唇における損傷・瘢痕、癌などの腫瘍への手術による赤唇の欠損は著しい審美障害を引き起こし、QOLの大きな低下につながる。そのため臨床において、それら先天的・後天的な口唇の審美障害の解決要求は極めて高い。しかしながら、赤唇の大幅な欠損を外科的に再建する事が出来ない器官であり、再生療法の開発が期待されている。

口唇の重要な部位である赤唇は、生涯にわたり、皮膚部と粘膜部との境界を大きく変化させることはない非常に恒常性の高い組織である。同様のことは、他の皮膚粘膜との移行部である肛門などでもみられ、赤唇は組織恒常性のための研究ツールとしても興味深い組織といえる。

また、赤唇は他の哺乳類にも霊長類にもなく、ヒトにしかない組織である。ヒトが、哺乳類の中で、もしくは霊長類の中で、どのような経緯により進化したかは全く明らかになっていない。赤唇のように、他の哺乳類や、霊長類に存在せず、ヒトにしか存在しない組織の解析は、ヒトの進化の解明の一役を担う可能性もある。

以上のように、審美的な重要度が高く、生物学的にも非常に特殊な組織である赤唇の生物学的研究は遅れており、胎児期における形成機構ばかりか、成人を利用した分子レベルの研究は全く行われていない。

2. 研究の目的

再生療法の開発には、胎生期の発生メカニズムの知見は極めて重要であり、実験動物の胎子を用いた実験が必須となる。しかしながら、ヒト赤唇は、哺乳類ばかりでなく他の霊長類にも存在せず、ヒトで独特に進化した器官であるため、実験動物を用いた従来のアプローチがまったく応用できない。さらに外科手術の際、赤唇は可及的に温存させるため、細胞獲得などのための試料採取もほとんど不可能である。さらに培養細胞による実験も選択できない。そのため、胎児期ばかりでなく成体における赤唇形成機構もふくめ赤唇の生物学的特性解明のための分子レベルの所見も、まったく未知のものとなっている。このような理由から赤唇は、胎児期、成体いずれにおいても形態的特徴以上の事は、まったく明らかとなっていない。

近年の分子生物学の発展により、遺伝子採取の技術が格段に向上してきた。そこで、本研究では、組織切片よりRNAを採取し、成人のヒトの赤唇にいかなる分子が発現して

いるかを把握することを目的に、実験を立案した。

3. 研究の方法

(1) ヒト赤唇の形態的特徴の把握

口唇は、皮膚部、赤唇部、粘膜部から構成されている。本研究では、組織学実習に使用していた組織標本の口唇を用いた。赤唇部がどのような分子機構により、その恒常性を維持しているかを、他の組織の発現分子との比較により行った。赤唇部との比較対照として、口唇の皮膚部と粘膜部があるが、皮膚部には毛包などがあり、それらに関連する分子が多数発現していると予想される。毛包関連遺伝子の存在により、目的の分子の同定が、粘膜部を使用した場合と比べ困難を極めると判断し、本研究では粘膜部を比較対照の組織として選択した。粘膜部と赤唇部に発現しているRNAの採取に先立ち、採取すべき粘膜部、赤唇部の組織学的な検索を行い、RNA採取のための部位の特定を行った。

(2) RNA-seqによる分子レベルでの相違の検索

赤唇をはじめとする皮膚粘膜移行組織は、その境界が拡大または縮小する事がなく、非常に恒常性の高い組織である。口腔内には、皮膚粘膜移行組織と同様に、非常に恒常性の高い組織として、歯肉などの角化した粘膜と、口腔粘膜などの非角化粘膜があり、その境界も変化しない。歯肉と口腔粘膜の上皮は、大きな組織学的な相違があるものの、その相違を決定づけているのは、結合組織からのシグナルであることが知られている。歯周治療では、そのシグナルを利用して、上皮の角化を促すための結合組織移植などが行われている。口唇の皮膚、赤唇、粘膜、それぞれの上皮も組織学的に大きな違いを示すが、その制御が上皮自身にあるのか、間葉である結合

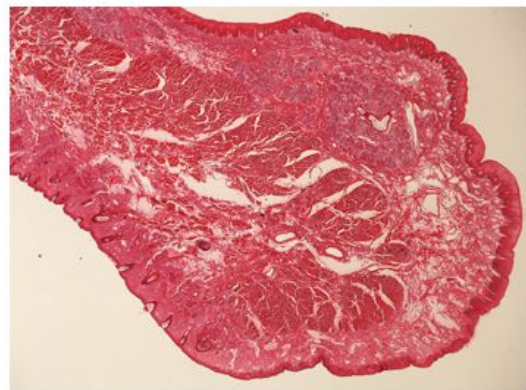


図1. 矢状断面口唇

組織側にあるのか不明である。しかし、組織学的に大きな違いを示す上皮における分子の差の比較では、その発現の違いが上皮の誘導能を示しているものなのか、形態的变化によって引き起こされたものかを区別すること

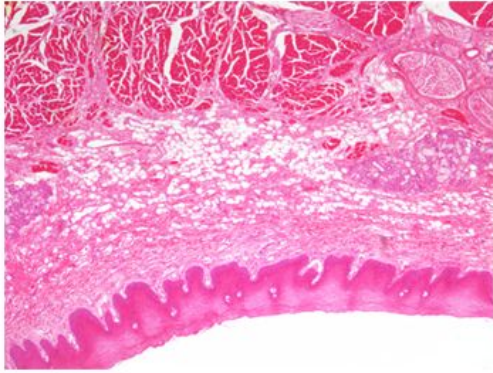


図2. 粘膜部

は容易ではない。一方、結合組織での分子の違いが、皮膚、赤唇、粘膜の選択に直結している確証もない。そこで、本研究では、上皮、結合組織の双方から RNA を抽出することで、上皮のみ、結合組織のみによる検索の欠点をカバーすることとした。

(1)の結果を踏まえ、粘膜部、赤唇部、それぞれの上皮と結合組織から RNA を抽出し、RNA-seq による解析を行った。なお、上皮の形態が違うことから、ケラチン関連タンパクの相違は予想されるため、検索する分子からケラチン関連タンパクは除外した。

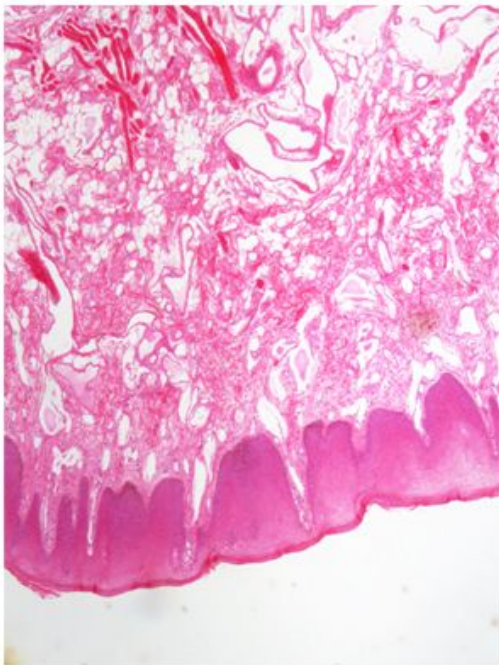


図3. 赤唇部

4. 研究成果

(1) ヒト赤唇の詳細な形態的特徴の把握
皮膚部、赤唇部、粘膜部が、識別できる矢

状断の口唇組織切片を使用した(図1)。形態的識別ができるように、ヘマトキシリン&エオジン染色された組織切片を使用した。角化の程度、上皮層の厚み、上皮脚の形状、毛包の有無、結合組織層の形状、筋の走行、腺の有無を参考にして、皮膚部、粘膜部、赤唇部を識別した。粘膜部(図2)、赤唇部(図3)それぞれの部位より、NucleoSpin total RNA FFPE(TAKARA)を用いて RNA を抽出した。

(2) 分子レベルでの相違検索

(1)で採取した RNA を、RNA-seq 解析を行った。赤唇に特異的に発現する分子、粘膜部に特異的に発現する分子、両方の組織に発現する分子が、多く確認された。粘膜部には、粘膜に異常の認められる疾患の原因の一つとされている TNF シグナル関連の発現が認められ、組織切片からの RNA 採取とその後の RNA-seq のデータが信用できるものと認識できた。赤唇部には、long noncoding RNA (lncRNA) や small nuclear RNA (snRNA) が、粘膜部よりも多く認められた。粘膜部でも lncRNA や snRNA は認められるものの、その多くは赤唇部で認められる lncRNA や snRNA とは、別の種類のものがほとんどであった。発生期には、部位の特定などの位置情報の確立に重要と考えられるホメオボックスが知られている。赤唇部には、このホメオボックスを有した PAX 遺伝子の発現が認められた。一方、粘膜部には、同じホメオボックスを有する遺伝子でも、FOXO や FOXI のファミリーに属する遺伝子の発現が観察された。これらの異なるホメオボックス遺伝子の発現で、赤唇が維持されている可能性が考えられた。口唇の粘膜部には、KLHL ファミリーに属する分子の発現が認められた。一般に KLHL ファミリーに属する蛋白は CULLIN3 と複合体を形成し、E3-ligase を形成することが知られている。E3-ligase はユビキチン化に重要な役割を担っており、粘膜部で認められる何らかのタンパク分解が、赤唇部では少ない可能性が考えられる。粘膜部に発現せず、赤唇部のみ強く発現していた分子として、PPDPF、WDR11、GBX1、SNX19、MTA2、SHOC2、DDT、RPL12、AATF、FAM95C、VAMP8、UBAC2、ZNF185、APOPT1、SAMD12、GJB2、HMGCR、SLC9A3R1、MYC、ZFYE19、C1QL2、PEX5、PPIB、NEK4、NPTX2、CLCA4、TXNDC5、SAV1、CCR7 などが確認された。一方、赤唇部には発現せず、粘膜部にのみ強く発現する分子として、MUC7、RANBP9、MT-ND2、MAFB、SIGLEC10、S100A11、TSC22D3、TIMM10、MRPS26、TLCD2、SFN、EMCN、NR4A2、CFAP52、PNRC1、HSPB1、ARHGAP28、STK10、SPRR3、SFTPB、DENND5A、ZNF625 などが認められた。赤唇部と粘膜部の双方に強く発現する分子として、MTRNR2L12、MT-ND5、IL13RA1、PTGS2、GM2A、BTG2、N4BP1、PPM1F、CCNL2、UBN1 などが認められた。しかし、赤唇部、粘膜部のみに強く発現する分子の方が、赤唇部、粘膜部の両方に強く両方に発現している分子に比べ、数

発現量ともに、多い傾向を示した。これは、生涯、その境界をほとんど変えないことや、形態的な変化もほとんど生じないという赤唇の特殊性は粘膜部とは非常に違う分子機構により制御されている可能性を示唆したものである。

これらの分子の機能解析を通して、赤唇の恒常性の謎が解明できるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

前田 健康 (MAEDA, Takeyasu)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号: 40183941

(2)研究分担者

大峽 淳 (OHAZAMA, Atsushi)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号: 40266169

井上 佳世子 (野澤 佳世子) (INOUE, Kayoko)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号: 90303130

(3)連携研究者

()

研究者番号: