

平成21年5月15日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390514
 研究課題名 (和文) 臓器再生をめざした唾液腺分枝形態形成機構の解析
 研究課題名 (英文) Analysis of mechanism in salivary gland branching morphogenesis for regeneration
 研究代表者
 阪井 丘芳 (SAKAI TAKAYOSHI)
 大阪大学・大学院歯学研究科・教授
 研究者番号：90379082

研究成果の概要：本研究は、口腔乾燥症（ドライマウス）の新しい治療法を開発するために、唾液腺再生をめざして、臓器形態形成機構を解明することを目的としている。具体的には、胎生期マウスの唾液腺の分枝部位(cleft)と非分枝部位(bud)から、上皮組織を摘出し、比較することにより、形態形成に寄与する新規遺伝子群を明らかにすることである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,700,000	2,910,000	12,610,000
2008年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：臓器再生医療・唾液腺・形態形成

1. 研究開始当初の背景

人工的に培養した細胞などを利用し、病気や事故などで失われた臓器や組織を治す治療法を再生医療といい、既存の医薬品に比べ副作用が少ないうえ、難病の治療に使えると期待されている。申請者はシェーグレン症候群や口腔癌術後、加齢に由来する口腔乾燥症（ドライマウス）の臨床治療に取り組んできた。一般臨床におけるドライマウスの治療法は人工唾液を投与する対症療法が主体であり、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。現在のところ、皮膚や骨に関しては、再生医療研究が進み、臨床応用が期待されているが、細胞から複雑な

臓器を形成し、機能回復に至るまでは進んでおらず、2次元的な細胞の集合から3次元的な臓器の完成には大きな障壁があると考えられる。

2. 研究の目的

多くの臓器（肺、唾液腺、腎臓、前立腺など）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。分枝はこれらの臓器形成にとり、必須の現象であり、臓器再生の鍵を握っていると考えられる。本研究では、形態観察しやすいマウス胎児唾液腺を分枝のモデルとして用い、形態形成に寄与する新規遺伝子群を明らかにす

る予定である。 交付期間中には、いくつかの遺伝子の機能解析を行い、分枝形態形成に関わる遺伝子群として報告したい。将来的には、これらの基礎データをもとに、腺組織を体外で器官培養し、機能的に低下した腺組織と置換する組織再生療法を試みることを目標としている。

3. 研究の方法

胎生期唾液腺の cleft (切れ目) と bud (先端部) の上皮の遺伝子発現を比較し、既知の遺伝子、新規遺伝子も含めて、分枝に対する遺伝子群を明らかにする計画である。分枝を制御している遺伝子をスクリーニングするために、連続的遺伝子発現解析法: SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) 法を用いる (www.sagenet.org)。本法はよくマイクロアレーと比べて、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 PCR 法の増幅による microSAGE 法が開発された。しかし、microSAGE 法は PCR 法の誤差が生じるため、申請者自身が T7-based RNA amplification 法を組み合わせた T7-SAGE 法を開発した。本研究では T7-SAGE 法を用いて、臓器、特にマウス胚の唾液腺の分枝部位と非分枝部位の遺伝子群のデータベースを構築する。そして、その情報をもとに、それぞれの遺伝子の分枝形態形成における機能を明らかにする予定である。

4. 研究成果

(1) 唾液腺の分枝形態形成に関わる遺伝子のスクリーニング

cleft と bud 領域の上皮組織から T7-SAGE ライブラリーを作製し、それぞれの領域に発現する遺伝子群を同定した。cleft/bud として比較し、cleft に強く発現する遺伝子に着目した。

(2) cleft 上皮に特異的に発現する遺伝子の発現量・発現分布確認

定量的 real-time PCR と in situ hybridization 法を用いて、同定した遺伝子 (仮名: 遺伝子 A、名称検討中) が cleft に強く発現していることを確認した。

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

遺伝子 A の siRNA を作製し、器官培養中の唾液腺に導入したところ、分枝形態形成が阻害され、分枝形態形成に関与する可能性が示唆された。

(4) 器官培養を用いた遺伝子導入実験

アデノウィルス等を用いて、唾液腺に遺伝

子 A を強制発現させようと準備中である。哺乳類の臓器への遺伝子導入はなかなか安定した結果が得られず、過去の研究においても成功率が少ないのが現状である。技術的に改良を加え、人工唾液腺臓器モデルの開発へと研究を進展させる予定である。

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 7 件)

① 佐々生康宏、奥野健太郎、野原幹司、阪井丘芳、睡眠時無呼吸症候群治療における歯科の役割第 2 回—口腔内装置の治療効果予測—、睡眠医療、査読有、3(1)、2009、97-102

② Sakai, T and Onodera, T. Embryonic Organ Culture. Current Protocols in Cell Biology、査読有、19. 8、2008、1-8

③ Yamamoto, S, Yoshizaki, K and Fukumoto, S. Platelet-derived growth factor receptor regulates salivary gland morphogenesis via FGF expression. J Biol Chem. 査読有、283、2008、23139-23149

④ Yoshizaki, K, Yamamoto, S and Fukumoto, S Neurotrophic factor nuerotrophin-4 regulates ameloblastin expression via full-length TrkB. J Biol Chem. 査読有、283、2008、3385-3391

⑤ 佐々生康宏、野原幹司、小谷泰子、阪井丘芳、内視鏡による食塊形成機能の評価—健常有歯顎者を対象として—、老年歯科医学会雑誌、査読有、23(1)、2008、42-29

⑥ Nohara, K, Kotani, Y, Ojima, M Sasao, Y, Tachimura, T and Sakai, T. Power spectra analysis of levator veli palatini muscle electromyogram during velopharyngeal closure for swallowing, speech, and blowing. Dysphagia、査読有、22、2007 135-139、

⑦ De Vega, S, Iwamoto, T, Hozumi and Fukumoto, S. TM14 is a new member of the fibulin family that interacts with extracellular matrix molecules and is active for cell binding. J Biol Chem. 査読有、282、2007、30878-30888

[学会発表] (計 3 7 件)

① Nohara, K, Sasao, Y, Kotani, Y, Ojima, M, and Sakai, T. Videoendoscopic

evaluation of the bolus preparation function. The 17th Annual Dysphagia Research Society Meeting, 2009年3月5日、New Orleans, LA, USA

② Tanaka, N, Kotani, Y, Nohara, K and Sakai, T. Swallowing frequency in elderly people during daily life. The 17th Annual Dysphagia Research Society Meeting, 2009年3月5日、New Orleans, LA, USA

③ 尾島麻希、野原幹司、小谷泰子、岸川裕、阪井丘芳、在宅症例における未対応の摂食・嚥下障害患者に関する調査、第11回日本在宅医学会大会、2009年3月1日、鹿児島

④ 小谷泰子、野原幹司、尾島麻希、岸川裕、阪井丘芳、訪問歯科診療における嚥下専門部門の役割—訪問嚥下診療の実際、第11回日本在宅医学会大会、2009年3月1日、鹿児島

⑤ Sakai, T. Cleft formation and branching morphogenesis of salivary gland: exploration of new functional regulators. The 3rd International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai, 2009年1月15日、Sendai, Japan

⑥ Onodera T, Sakai, T and Yamada, KM, Cleftin: A Novel Fibronectin-Induced Gene that Promotes Branching Morphogenesis. 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, 2008年12月13日、San Francisco, USA

⑦ 奥野健太郎、佐々生康宏、野原幹司、阪井丘芳、睡眠時無呼吸症候群の治療における口腔内装置の効果とCPAP至適圧との関係について、大阪大学歯学会第55回総会、第107回例会、2008年12月3日、大阪

⑧ 奥野健太郎、佐々生康宏、野原幹司、吉田良子、熊ノ郷卓之、阪井丘芳、口腔内装置の効果とCPAP至適圧との関係について、第7回日本睡眠歯科医学会、2008年10月19日、東京

⑨ 奥野健太郎、野原幹司、佐々生康宏、尾島麻希、小谷泰子、阪井丘芳、下顎に装着する嚥下補助装置の効果—舌悪性腫瘍術後症例への適用—、第14回日本摂食・嚥下リハビリテーション学会学術大会、2008年9月13日、千葉

⑩ 河合利彦、館村卓、外山義雄、阪井丘芳、食物レオロジー特性が嚥下時の口蓋帆挙筋活動に及ぼす影響～異なる非ニュートン特性を

持つ試料を用いた試行～、第14回日本摂食・嚥下リハビリテーション学会学術大会、2008年9月13日、千葉

⑪ 小谷泰子、田中信和、野原幹司、阪井丘芳、要介護高齢者における嚥下回数と誤嚥性肺炎の既往、第14回日本摂食・嚥下リハビリテーション学会学術大会、2008年9月13日、千葉

⑫ 尾島麻希、野原幹司、岸川裕、阪井丘芳、在宅症例における未対応の摂食・嚥下障害患者に関する調査、第14回日本摂食・嚥下リハビリテーション学会学術大会、2008年9月13日、千葉

⑬ Yamada, KM, Onodera, T and Sakai, T. Cell and Matrix Dynamics in Branching Morphogenesis. British Society for Cell Biology Autumn Meeting 2008, 2008年9月8日、Greenwich, England

⑭ 奥野健太郎、佐々生康宏、野原幹司、吉田良子、熊ノ郷卓之、阪井丘芳、口腔内装置の効果とCPAP至適圧との関係について、第33回日本睡眠学会定期学術集会、2008年6月25日、福島

⑮ 上田菜美、野原幹司、小谷泰子、深津ひかり、阪井丘芳、大阪大学歯学部附属病院顎口腔機能治療部における高齢初診患者の動向、第19回日本老年歯科医学会総会・学術大会、2008年6月19日、岡山

⑯ 深津ひかり、野原幹司、小谷泰子、上田菜美、阪井丘芳、大阪大学歯学部附属病院顎口腔機能治療部における嚥下内視鏡検査の施行状況、第19回日本老年歯科医学会総会・学術大会、2008年6月19日、岡山

⑰ 小谷泰子、田中信和、野原幹司、阪井丘芳、日常生活における嚥下頻度—健常者と口腔乾燥症例との比較—、第19回日本老年歯科医学会総会・学術大会、2008年6月19日、岡山

⑱ Sasao, Y, Okuno, K, Nohara, K and Sakai, T. Videoendoscopic diagnosis for predicting the response to the oral appliance therapy in obstructive sleep apnea syndrome, The 17th Annual Meeting of American Academy of Dental Sleep Medicine, 2008年6月6日、Baltimore, USA

⑲ 美馬淳子、宮成典、古郷幹彦、野原幹司、檜枝洋紀、阪井丘芳、口蓋裂治療のための胎生期口蓋閉鎖機構の解析、第32回日本口蓋裂学会、2008年5月28日、広島

⑳ 高井英月子、野原幹司、佐藤耕一、小谷泰子、阪井丘芳、鼻咽腔閉鎖機能評価によるスピーチエイド撤去可否の予測—第2法—、第32回日本口蓋裂学会、2008年5月28日、広島

21. 小谷泰子、野原幹司、高井英月子、阪井丘芳、Robin sequence症例における塞栓子付き軟口蓋挙上装置の作成—開業歯科医院との連携、第32回日本口蓋裂学会、2008年5月28日、広島

22. Satoh, K, Nohara, K, Tachimura, T, Sakai, T, Aikawa, T, Yamanishi, T and Kogo, M. Morphological Differences of the Velum in Patients with Repaired Cleft Palate Following Furlow or Push-back Procedure. 65th Anniversary Meeting of American Cleft Palate-craniofacial Association, 2008年4月14日、Philadelphia, Pennsylvania, USA

23. Tanaka, S, Namikawa, M, Miya, S, Nohara, K, Sugiyama, T, Takai, E, Senoo, H, Iida, S, Sakai, T and Kogo, M. Clinical Evaluation of Primary Palatoplasty using Early Two-stage Furlow Method. 65th Anniversary Meeting of American Cleft Palate-craniofacial Association, 2008年4月14日、Philadelphia, Pennsylvania, USA

24. Tanaka, N, Yamashita, M, Matsumura, M, Sakai, T, Kotani, Y, and Nohara, K. Development of Swallowing Frequency Meter. The 16th Annual Dysphagia Research Society Meeting, 2008年3月6日、Charleston, SC, USA

25. Nohara, K, Tanaka, N, Kotani, Y, Sasao, Y, Ojima, M, and Sakai, T. Velopharyngeal Function during Speech and Swallowing in Patients after Tongue and/or Oral Floor Cancer Surgery. The 16th Annual Dysphagia Research Society Meeting, 2008年3月6日、Charleston, SC, USA

26. 尾島麻希、野原幹司、佐々生康宏、館村卓、小谷泰子、奥野健太郎、田中信和、阪井丘芳、啼泣時に顔面費外傷を呈した3例、第24回日本障害者歯科学会総会、2007年11月24日、長崎

27. 野原幹司、佐々生康宏、高井英月子、田中信和、阪井丘芳、内視鏡による食塊形成機能評価～嚥下障害症例を対象として、第24回日本障害者歯科学会総会、2007年11月24日、長崎

28. 高井英月子、野原幹司、小谷泰子、奥野健太郎、阪井丘芳、鼻咽腔閉鎖不全により言語障害を呈した糖原病症例に対する歯科のアプローチ、第24回日本障害者歯科学会総会、2007年11月24日、長崎

29. 佐々生康宏、館村卓、野原幹司、尾島麻希、小谷泰子、高井英月子、奥野健太郎、田中信和、河合利彦、土岐祐一郎、宮田博志、森田輝代、木下直美、安井洋子、阪井丘芳、食道癌手術省令へのチームアプローチ～歯科の立場から～、第4回日本口腔ケア学会総会、2007年11月18日、名古屋

30. Sakai, T., and Yamada, K.M. Morphogenesis of Salivary Gland Epithelia: Exploring the Regeneration Process for Xerostomia Treatment. The 89th American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons (AAOMS) meeting, 2007年10月12日、Hawaii, HI, USA, (Best Oral Abstract Scientific Award for a presentation)

31. 阪井丘芳、唾液腺形態形成機構—口腔乾燥症治療をめざした再生機構の探求—、第52回日本口腔外科学会総会、2007年9月29日、名古屋

32. 中原寛和、古郷幹彦、由良義明、丹羽均、阪井丘芳、雫石聡、大阪大学歯学部附属病院夜間緊急診療の現状と問題点、大阪大学歯学会第104例会、2007年7月19日、大阪

33. 佐々生康宏、野原幹司、小谷泰子、阪井丘芳、内視鏡検査による口腔内装置治療の適応症の診断、第1回日本睡眠歯科医学会、2007年7月15日、東京

34. 田中信和、野原幹司、小谷泰子、佐々生康弘、尾島麻希、阪井丘芳、喉頭マイクروفオンを用いた嚥下回数測定デバイスの開発、第18回日本老年歯科医学会総会、2007年6月22日、札幌

35. 小谷泰子、野原幹司、田中信和、戸原玄、植松宏、阪井丘芳、高齢者の日常生活における嚥下回数、第18回日本老年歯科医学会総会、2007年6月22日、札幌

36. 佐々生康宏、野原幹司、小谷泰子、阪井丘芳、内視鏡による食塊形成機能の検討～嚥下障害症例を対象として～、第18回日本老年歯科医学会総会、2007年6月22日、札幌

37. 佐藤耕一、野原幹司、館村卓、阪井丘芳、相川友直、山西整、古郷幹彦、Furlow法またはPushback法による口蓋裂術後患者にお

る軟口蓋の形態的比較、第 31 回日本口蓋裂
学会、2007 年 5 月 24 日、群馬

〔図書〕(計 1 件)

① 阪井丘芳、コロナ社、細胞外マトリックスによる器官形成の制御機構、再生医療のための細胞生物学 第 2 巻 (赤池敏宏・関口清俊編)、2007、122-136

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪井 丘芳 (SAKAI TAKAYOSHI)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：9 0 3 7 9 0 8 2

(2) 研究分担者

野原 幹司 (NOHARA KANJI)
大阪大学・歯学部附属病院・助教
研究者番号：2 0 3 4 6 1 6 7

福本 敏 (FUKUMOTO SATOSHI)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：3 0 2 6 4 2 5 3

(3) 連携研究者

該当無し