

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19068

研究課題名（和文）特異的分子発現を利用したヒト口唇および赤唇インビトロモデル開発とその有効性の検証

研究課題名（英文）Development of human lip and lip vermillion in vitro models mimicking gene expressions of specific molecules and evaluation of the efficacy of those models

研究代表者

上野山 敦士（Uenoyama, Atsushi）

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：40804571

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：組織学的検索から、ニホンザル口唇にもヒト同様に皮膚、口腔粘膜と特徴が異なる赤唇があることがわかった。従って、ニホンザル口唇サンプルの皮膚、赤唇、口腔粘膜における特異的な遺伝子発現を検討することでヒト口唇に応用できると考えた。マイクロアレイ解析の結果、サルのin vivo赤唇上皮において、in vivo、in vitroの皮膚、口腔粘膜より有意に発現上昇している69遺伝子を見つけた。しかし、ヒト口唇組織でその遺伝子に関連するタンパク発現を検索したが、単独のマーカー発見には至らなかった。その代わり、ヒト赤唇ではSPRR3とK10の2重染色の陽性像が赤唇特異的なパターンであることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医薬品などの安全性評価、製品開発や効能効果実証に動物実験使用が廃止となり、日本動物実験代替法評価センターが中心となって代替法の利用を推進している。3Rsの理念から、動物実験代替法の開発は急務であり、ヒト口唇モデルの開発は、世界中の人々が利用しているリップクリームや口紅などの安全性、効能を直接評価できるツールの開発につながり、大きな社会的波及効果が期待される。本課題では開発されるであろう、ヒト赤唇モデルの品質保証として特異的マーカーを突き止めた。将来的にヒト細胞で製造される3次元培養モデルは、赤唇に類似した組織形態を有し、単層培養系で困難であった製品の評価が可能となり、3Rsに大きく貢献できる。

研究成果の概要（英文）：Our histologic examination demonstrated that a Japanese macaque had vermillion in the lip distinct from adjacent skin and oral mucosa like the human lip. This study examined the gene expression profile of the three distinct epithelia (skin/vermillion/oral mucosa) within the lip of a Japanese macaque to explore a single potential marker of human vermillion epithelium. Six pairwise comparisons in the skin/vermillion/oral mucosa epithelium in vitro and in vivo revealed 69 differentially up-regulated genes in vermillion epithelium in vivo when compared with both skin and oral mucosa epithelium in vivo and in vitro using clustering analysis. However, we could not detect a single marker specific to vermillion epithelium supported by the gene expression profile of a Japanese macaque. Instead, the pair of keratin 10 and small proline-rich protein 3 resulted in a potential marker of human vermillion epithelium via a double-immunostaining technique.

研究分野：医歯薬学

キーワード：赤唇 白唇 インビトロモデル ニホンザル μ アレイ

1．研究開始当初の背景

ヒトの口唇は顔面の審美にとって極めて重要な器官であり、乾燥しやすく、荒れやすい部位である。口唇の最大の特徴である“赤唇”はヒトにしか存在しないとされていたため、唇の荒れ、かさつき等の病態解析に、動物実験は不適当だった。ヒトの組織を使用した実験は、テープで剥がした赤唇の角質層の解析があるのみで、口唇の組織内や細胞レベルで起きている現象は未解明のままである。従って、口唇への適用を目的とした医薬品評価には、ヒト・動物の皮膚組織が使用されていた。香粧品に関しては、国際的に動物実験を用いて開発された製品の販売禁止により、それらの安全性評価、製品開発へ応用される動物実験代替法の重要性は一層高まり、その確立は喫緊の課題である。この問題を解決するには、ヒト *in vivo* 口唇組織を再現した 3 次元培養モデルが不可欠であるが、これまでヒト“口唇モデル”は開発されていない。

2．研究の目的

口唇はヒト顔面の審美にとって極めて重要で、特に赤唇の審美障害はQOL低下につながる。“口唇”に適用される薬剤は多く、安全性・効果・副作用に関して国民の関心も高いが、“ヒト3次元培養口唇モデル”は未開発で、主に皮膚モデルで代用されている。しかし、口唇は紫外線や乾燥に晒されるものの毛包や口唇腺がなく、角質層も薄くバリア機能が低いため、皮膚（や口腔粘膜）モデルと同じ評価が適用されるのは望ましくない。また、病態の解明につながる評価ツールとして適当なモデルがないため、口唇トラブルにおいて口唇の組織内や細胞レベルで起きている変化がわかっていない。そこで本研究は、申請者と協力者の泉で独自に見出した組織学的なサル赤唇の存在とそのデータと申請者が保有する細胞培養基盤技術と融合することで“ヒト3次元口唇インビトロモデル”の開発を目的とする。

3．研究の方法

口唇形成術時にトリミングされる余剰の“ヒト口唇組織”を用いて、(1)網羅的遺伝子発現と、(2)免疫組織化学的検討を行い、解析中のニホンザルのデータと比較し、口唇、赤唇上皮の分子生物学的基盤を確立する。同時に、申請者の3次元モデル作成基盤技術を駆使し、(3)ヒトのインビトロ口唇上皮モデル（口腔粘膜/赤唇/皮膚3部位連続）及び(4)赤唇複合（上皮-間葉）モデルを開発する。そして、免疫組織化学的にモデルと実組織との違いを把握することで、製品評価、試験に用いる場合の有用性が担保できる。最後に、開発したインビトロモデルに対して、(5)紫外線と乾燥により生じる口唇モデルの応答性評価を行い、インビトロモデルとしての利用可能性と機能検証を実施する。

4．研究成果

図1に本研究で実施した、サル口唇を構成する皮膚、赤唇、口腔粘膜上皮の *in vivo*, *in vitro* のサンプルのマイクロアレイから作製したクラスター図を示す。クラスターC11で発現が亢進している69遺伝子が、皮膚、口腔粘膜どちらより赤唇での発現が高く、赤唇特異的マーカーとなる可能性の高い遺伝子群であったが、対応する抗体を用いて免疫組織化学染色をヒトの口唇に対して実施したが、明らかな特異的染色像を得ることができなかったため、赤唇の単独マーカー

の発現に至らなかった。

一方、クラスターC6 と C13 で発現が亢進している遺伝子は、それぞれ、口腔粘膜と皮膚と比較した場合に有意に発現が亢進しており、C6 では SPRR 3 , C13 では K10 を選択して、同様に免疫組織化学的染色を施した結果、図 2 (a) , (b) がサル、(c) , (d) , (e) がヒトの口唇) に示すように、特異的な染色パターンが示されたことで、赤唇では SPRR3 と K10 が共発現していることをつきとめ、将来的な口唇モデルの質を担保するマーカーとなり得ることが示唆された。

図 1

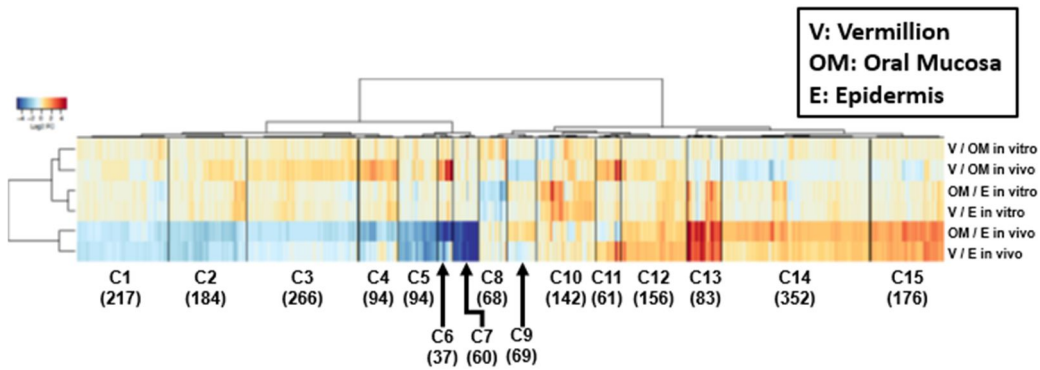
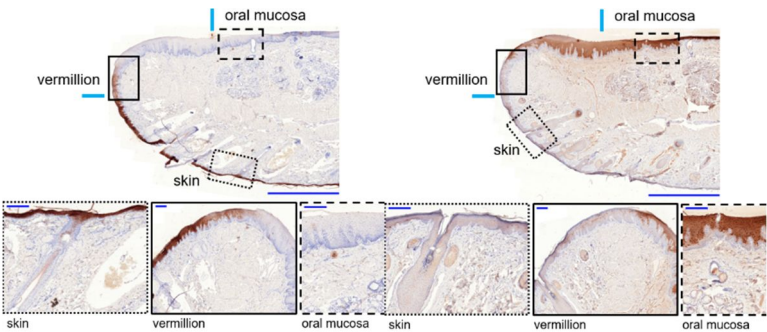
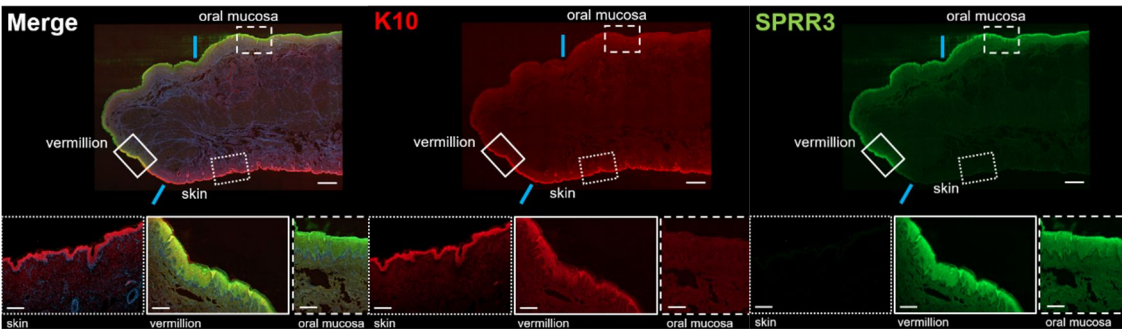


図 2



(a)

(b)



(c)

(d)

(e)

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1 . 著者名 Hiroko Kato , Yiwei Ling , Emi Hoshikawa, Ayako Suzuki, Kenta Haga, Eriko Naito, Atsushi Uenoyama, Shujiro Okuda and Kenji Izumi	4 . 巻 1
2 . 論文標題 Detection of Potential Markers for Lip Vermilion Epithelium in Japanese Macaques Based on the Results of Gene Expression Profile.	5 . 発行年 2022年
3 . 雑誌名 Anatomia	6 . 最初と最後の頁 3-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/anatomia1010002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------