

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：16101  
研究種目：若手研究  
研究期間：2019～2020  
課題番号：19K19200  
研究課題名(和文) 導管結紮による唾液腺再生マウスモデルを用いた再生に関わる遺伝子とmiRNAの同定  
  
研究課題名(英文) The identification of genes and miRNAs involved in regeneration using a conduit ligation model mouse  
  
研究代表者  
横田 美保 (YOKOTA, Miho)  
  
徳島大学・病院・医員  
  
研究者番号：50836145  
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)：腺房細胞再生のメカニズムを再現したマウスモデルを用いて、腺房細胞の再生に関連する遺伝子ネットワークの同定を試みた。その結果、腺房細胞の再生に関わるハブ遺伝子として、Nrep (Neuronal regeneration related protein) が同定された。これら同定された幹細胞制御ネットワークが腺房再生に重要な役割を果たしていると考えられた。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果より、腺房細胞の再生に関わるハブ遺伝子として、腺上皮前駆細胞に特異的に発現する遺伝子 (Neuronal regeneration related protein) が同定された。これら同定された幹細胞制御ネットワークが腺房再生に重要な役割を果たしていると考えられた。この成果は、“唾液分泌低下の改善”という患者のQOL向上が期待できるだけでなく、唾液腺疾患への治療応用の可能性も考えられた。

研究成果の概要(英文)： We try to identify the gene network involved in regeneration of acinar cells by using a conduit ligation mouse model. As a result, we identified Nrep (Neuronal regeneration related protein) as a hub gene involved in the regeneration of acinar cells. We suggest that the regulatory network of stem cells may play an important role for the regeneration of acinar cells.

研究分野：口腔外科分野

キーワード：唾液腺 再生 マイクロアレイ解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

唾液の分泌量は加齢とともに減少し口腔乾燥が生じる。この口腔乾燥は口腔内の不快感だけでなく、齲蝕の多発や歯周病、口臭、口腔粘膜炎、舌痛症、嚥下障害、構音障害など様々なトラブルを発症させ生活の質を低下させる深刻な問題である。口腔乾燥症は加齢だけではなく、唾液腺の炎症や腫瘍、薬剤の副作用、Sjögren 症候群などの全身疾患、ストレスなどで発症し、頭頸部領域の悪性腫瘍に対する放射線治療でも口腔乾燥症は必発である。

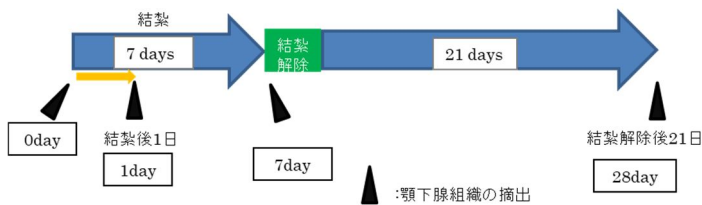
65 歳以上の成人の約 30%に口腔乾燥が認められるという報告 (Ship JA : J Am Geriatr Soc; 2002) もあることから深刻な社会問題であるが、現在の治療法は人工唾液や唾液腺マッサージ、唾液の分泌を促進する薬の内服などの対症療法のみであり、有効な治療法はないのが現状である。

### 2. 研究の目的

本研究では、実験的にマウスの顎下腺導管を結紮すると 1 日目には導管が拡張し、7 日目には腺房細胞が消失する。その後、結紮を解除すると腺房細胞が再生するという腺房細胞再生のメカニズムを再現したマウスモデルを用いて、顎下腺組織のマイクロアレイ解析を行い、再生に関わる遺伝子と micro(mi)RNA を同定し、唾液腺再生のメカニズムを解明するとともに唾液腺幹細胞を同定した。今後、新たな戦略として口腔乾燥改善に有効な治療法としての可能性を探ることとした。

### 3. 研究の方法

Tamarinらの方法 (Tamarin A: J Ultrastruct. Res.; 1971) に準じて、ジエチルエーテル麻酔下にマウス (C57BL/6Jcl マウス, 雌性, 8 週齢, 日本クレア社) の唾液腺導管を 1 週間チタンクリップ (Sugita Titanium Clip) で結紮し、結紮解除後 0, 1, 7, 28 日目にそれぞれ顎下腺を摘出し (図 1), HE 染色を用いて組織学的変化の観察を行った。さらに、顎下腺組織から RNA を抽出し、マイクロアレイによる遺伝子発現の時系変化を解析した。特定の時系列発現パターンを示す mRNA からなる遺伝子ネットワークを構築し、腺房細胞の再生に関わるハブ遺伝子を検索した。同定したハブ遺伝子は real-timePCR をもちいて、その時系列発現パターンを再検討した。



### 4. 研究成果

#### (1) 摘出した顎下腺の組織学的変化

1 日間結紮した顎下腺組織の導管は拡張していた (黒矢頭)。また、1 週間結紮した顎下腺組織では、腺房細胞は萎縮し、その周囲に炎症細胞が浸潤しており、導管細胞は残存していた (黒矢頭)。さらに、1 週間結紮し解除してから 28 日目の顎下腺組織では、導管細胞の周囲に腺房細胞が確認できた (白矢頭) (図 2)。

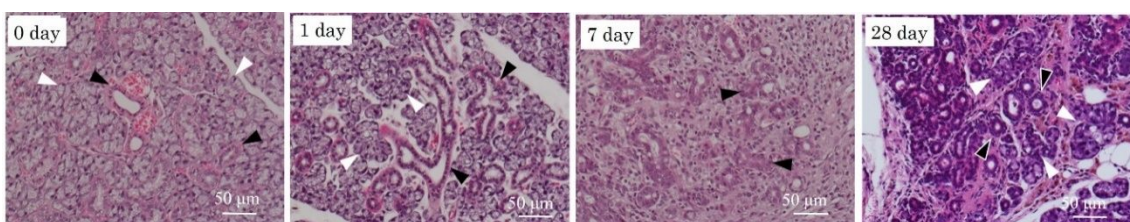
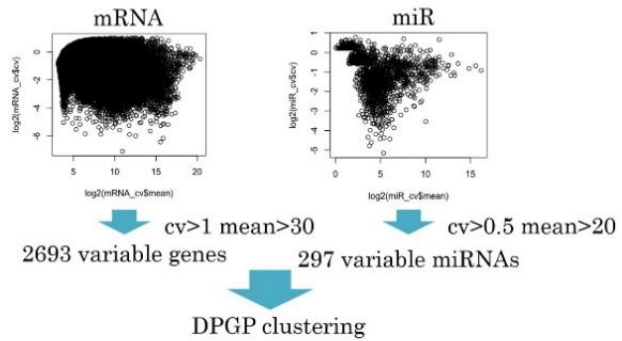


図 2 H-E 染色

(2) マイクロアレイによる遺伝子および miRNA の時系列変化

マイクロアレイデータのフィルタリング  
 バイオツール(ガウスモデル)を用いて,  
 mRNA, miRNA それぞれの遺伝子の変動係  
 数(CV)および発現平均値(mean)を対数  
 表示で二次元プロットした。mRNA と  
 miRNA それぞれの変動係数(cv)および発  
 現平均値(mean)を対数表示で二次元プロ  
 ットした。発現平均値が低い遺伝子(mean  
 $\leq 30$ ,  $\leq 20$ )を除去し,変動の大きい  
 遺伝子( $cv > 30$ ,  $> 20$ )を以後の解析対象  
 とした。

図3 . マイクロアレイデータのfiltering

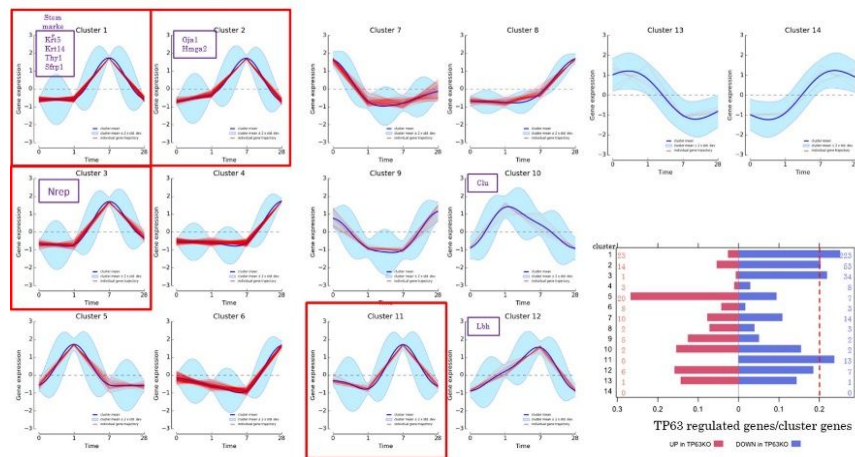


.遺伝子の発現パターン

ファイリングした 2693 の mRNA を DPGP 法 (PLoS Comput Biol.2018) によってクラスタリ  
 ングした。遺伝子の発現変化は 14 パターンに分類され,7 日目にピークを示すクラスター(赤  
 四角)には幹細胞のマーカー遺伝子が多く含まれていた。

そこで幹細胞とその機能維持に關与する Np63 が制御している遺伝子と各クラスターの関  
 係を調べたところ 7 日目でピークを示すクラスター中に Np63 に正に制御される遺伝子が濃  
 縮されていることが確認できた。

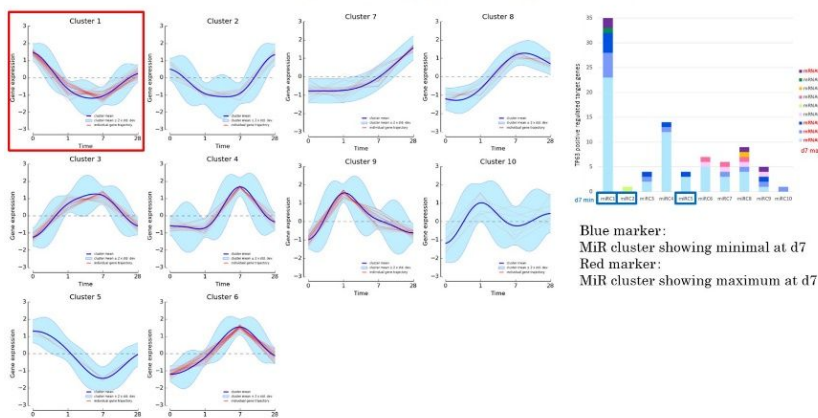
図4 The patterns of temporal variation in gene expression during salivary gland regeneration



miRNA の発現パターン

ファイリングした 297 の miRNA を, mRNA と同様に DPGP 法によってクラスタリングした。  
 miRNA の発現変化は 10 パターンに分類された。各クラスターの miRNA の標的遺伝子のうち,  
 Np63 によって正に制御されている mRNA およびその所属のクラスターを検索した。その結果,  
 miR クラスター1(7 日目極小)の標的遺伝子群中に 7 日目で発現極大となる Np63 被制御遺  
 伝子(mRNA)が濃縮されていた。

図5 patterns of temporal variation in miRNA expression during salivary gland regeneration



(3) 特定の時系列発現パターンを示す miRNA/inRNA からなる遺伝子ネットワーク

. 遺伝子ネットワークの構築

miR クラスター-1 および 7 日目まで発現極大となる Np63 被制御遺伝子 (mRNA) からなる遺伝子ネットワークを構築した。色が強い紫であるほど中心性が高い。

. Nrep の発現

miR では mmu-mir-30e-5p (免疫反応の調節), mRNA では Zeb2 (TGFβ シグナル伝達経路に関与する転写因子) や Gja1 が高い中心性を示していた。Gja1 (Gap junction alpha-1) と Nrep (Neuronal protein) は導管前駆細胞のマーカートとして報告されており, 再生に関与している可能性がある。

そこで, 再生に関係している遺伝子の候補である Nrep と Gja1 の発現について 1 細胞 RNAseq データの再解析を行ったところ, Nrep がケラチン 19 陽性の導管細胞に発現していることを確認した。

図6 遺伝子ネットワークの構築

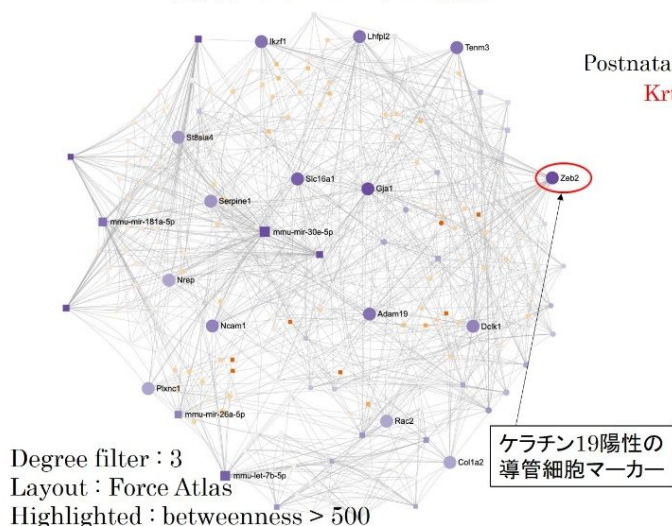
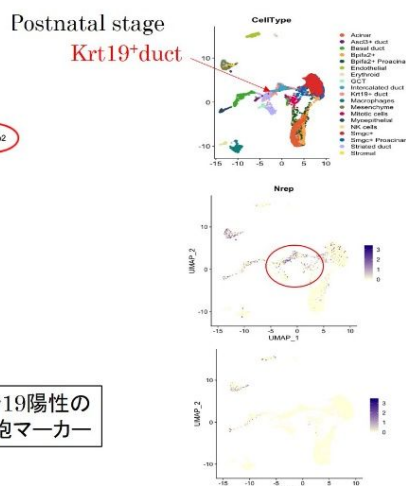


図7 Nrep expression in postnatal salivary



#### (4) Real-time PCR による Nrep の発現定量

ここまでの解析から、Np63 に正に発現制御される遺伝子のうち Nrep が腺房再生に関与している可能性が考えられる。そこで、Nrep の発現を Real-time PCR で再検討した。その結果、マイクロアレイ と類似の発現パターン（7日目極大）を示した。

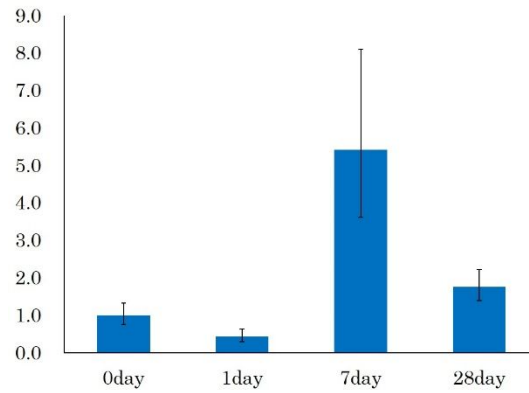


図 8 Real-time PCR による Nrep の発現

#### (5) Nrep の免疫組織染色

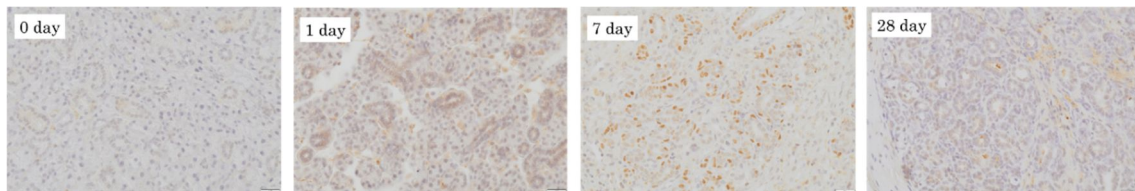


図 9 免疫組織学的染色

7日目に導管周囲の核に強発現を認めた。

以上のことより、腺房細胞の再生に関わるハブ遺伝子として、腺上皮前駆細胞に特異的に発現する遺伝子とその発現制御に関わる miRNA が同定された。これら同定された幹細胞制御ネットワークが腺房再生に重要な役割を果たしていると考えられた。

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 0件）

1. 著者名 山村佳子, 眞野隆充, 鎌田久美子, 横田美保, 福田直志, 高丸菜都美, 栗尾奈愛, 大塚邦紘, 工藤保誠, 宮本洋二	4. 巻 33
2. 論文標題 口腔領域に発症した悪性リンパ腫の臨床的検討	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本口腔腫瘍学会	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山村 佳子, 工藤保誠, 毛利安宏, 邵 文華, 横田美保, 宮本 洋二
2. 発表標題 腺房細胞の再生に関わる遺伝子ネットワークの同定
3. 学会等名 第75回 日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鎌田久美子, 栗尾奈愛, 福田直志, 横田美保, 秋田和也, 上杉篤史, 山村佳子, 工藤隆治, 高橋章, 宮本洋二
2. 発表標題 口腔癌術後に多発肺結節を認めた敗血症性肺塞栓症の一例
3. 学会等名 第49回 日本口腔外科学会中国四国支部学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗尾 奈愛, 鎌田 久美子, 横田 美保, 山村 佳子, 牛尾 綾, 工藤 保誠, 石丸 直澄, 宮本 洋二
2. 発表標題 上顎歯肉に発生した微小嚢胞性付属器癌の1例
3. 学会等名 第38回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗尾 奈愛, 鎌田 久美子, 大江 剛, 横田 美保, 山村 佳子, 工藤 景子, 工藤 保誠, 眞野 隆充, 石丸 直澄, 宮本 洋二
2. 発表標題 歯肉腫瘍により白血病化が明らかとなった骨髄異形成症候群の1例
3. 学会等名 第67回 日本口腔科学会中国・四国地方部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗尾 奈愛, 鎌田 久美子, 大江 剛, 横田 美保, 山村 佳子, 工藤 保誠, 石丸 直澄, 宮本 洋二
2. 発表標題 上顎歯肉に発生したMicrocystic adnexal carcinoma(MAC)の1例
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------