

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24070

研究課題名(和文) 臓器再生を目指した転写因子p63の機能解析

研究課題名(英文) deltaNp63 is upregulated during salivary gland regeneration following duct ligation and irradiation in mice

研究代表者

井階 一樹 (Ikai, Kazuki)

大阪大学・歯学研究科・特任研究員

研究者番号：00849432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子p63は上皮組織の発達や恒常性、再生に重要な役割を果たしている。しかし、唾液腺を含む外分泌腺の再生におけるp63の機能は明らかにされていない。本研究では導管結紮と放射線照射により誘導された唾液腺の再生におけるp63の発現を解析した。唾液腺の再生過程ではp63アイソフォームであるNp63の発現が増加し、Keratin5陽性の筋上皮細胞に局在することが明らかとなった。また、Np63の発現はp38 MAPKリン酸化を介したFGF7刺激によって調節され、唾液腺の形態形成に影響を与えた。本研究によりNp63は唾液腺再生に不可欠であり、再生治療の新しい標的となる可能性が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

高齢者は様々な原因から口腔機能が低下するが、特に頻度の高い原因が口腔乾燥である。放射線照射やシェーグレン症候群により唾液腺が損傷を受けると、唾液の分泌量は減少しQOLが著しく低下する。腺機能を回復させる根本的な治療法はなく、唾液腺の再生医療が期待されている状況である。本研究により、唾液腺の再生過程ではNp63とKeratin5両陽性の筋上皮細胞が重要な役割を果たしていること、Np63の発現はFGF7刺激により誘導できることが明らかとなった。Np63は唾液腺再生における有力な機能分子であり、再生治療の新しい標的となる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The transcription factor p63, a component of the p53 family, has important functions in development, homeostasis, and regeneration of epithelial tissues. However, the role of p63 in the regeneration of exocrine glands, including the salivary glands (SGs), has not been fully investigated. We investigated p63 expression in SG regeneration induced by duct ligation and irradiation. The expression of deltaNp63, a p63 isoform, increased and was colocalized with keratin 5 positive cells were myoepithelial cells. Furthermore, deltaNp63 expression was regulated by FGF7 stimulation via p38 MAPK phosphorylation and affected SG morphogenesis. These results suggest that deltaNp63 is essential for SG regeneration and may be a new target for regenerative treatment.

研究分野：口腔科学

キーワード：唾液腺 再生医療 p63 導管結紮 放射線障害

1. 研究開始当初の背景

高齢者は、加齢や原疾患など様々な原因から口腔機能が低下する。特に頻度の高い原因が、唾液の分泌低下に伴う口腔乾燥である。排泄主導管の閉塞、放射線照射、シェーグレン症候群などにより唾液腺が損傷を受けると、唾液の分泌量は減少する。重篤な唾液分泌障害は、齲蝕や歯周病だけでなく、摂食嚥下障害などの口腔機能低下症を引き起こし、QOL が著しく低下する。対症療法として保湿剤の使用や唾液分泌刺激薬の服用が挙げられるが、腺機能を回復させる根本的な治療法はなく、唾液腺の再生医療が期待されている。

唾液腺の再生研究では、再生過程における幹・前駆細胞や機能分子の探索が進められている。Sox2 や Keratin5 など機能分子の解析が進み、唾液腺再生の詳細な分子機構が解明されつつあるが、未だ唾液腺再生の実現には至っていない。

2. 研究の目的

本研究は、唾液腺の再生過程における p63 の役割を明らかにすることを目的とした。唾液腺再生には未だ明らかとなっていない重要な機能分子が存在すると考え、転写因子 p63 に着目した。p63 は癌抑制因子 p53 のファミリーメンバーであるが、上皮組織の発生や恒常性の維持、さらに再生にも重要であることが示唆されている。p63 ノックアウトマウスでは、上皮だけでなく唾液腺などの臓器も欠如することが確認されており、p63 は上皮組織を含む臓器の再生に有力な機能分子であることが推察された。

3. 研究の方法

唾液腺の再生過程における転写因子 p63 の発現と局在を確認するため、唾液腺の損傷モデルを作製し解析した。成体マウス唾液腺に導管結紮あるいは放射線照射 (9 Gy) による可逆的な損傷を与え、再生過程における p63 の発現と局在を免疫組織染色により確認した。また、再生開始時の唾液腺を採取し、qPCR により p63 のアイソフォームの発現を解析した。

また、増殖因子による p63 の発現活性と制御機構を解析するために胎仔唾液腺の器官培養を行った。FGF7 など形態形成に重要な増殖因子を添加し、培養後の唾液腺における p63 の発現活性をウェスタンブロット法により解析した。さらに、唾液腺の形態形成や p63 の発現に関するシグナル (MAPK, PI3K/Akt など) の活性を確認し、p63 の制御機構を検討した。

4. 研究成果

(1) 結紮 1, 3 日目および開放 0, 7, 14 日目の耳下腺を 8 週齢の ICR 雌マウスから摘出し、形態変化を確認した。耳下腺組織は開放 0 日目に損傷しており、腺房細胞の萎縮、導管の拡張、細胞間隙の増加が観察された (Fig. 1A)。開放 14 日目では組織は回復し、非結紮群と同様の形態を示した。結紮 1 日目では耳下腺の重さは変化しなかったが、結紮 3 日目と開放 0 日目では徐々に減少した (Fig. 1B)。結紮開放後、耳下腺の重さは徐々に増加し、開放 14 日目に非結紮と同程度まで回復した。

結紮 1, 3 日目および開放 0, 7, 14 日目の Np63 の発現と局在を免疫組織染色により確認した。非結紮群と比較して Np63 陽性細胞数は結紮 1 日目から徐々に増加し、開放 0 日目で最も増加した (Fig. 1C, D)。開放後、Np63 陽性細胞数は徐々に減少し、開放 14 日目では非結紮群と同程度であった。また、Np63 陽性細胞は腺房と導管の基底側に局在していた。

導管結紮により増加した p63 のアイソフォームを確認するために、p63, Np63, TAp63 の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR で解析した。p63 と Np63 の mRNA 発現は、開放 0 日目において相対的に増加した (Fig. 1E, F)。一方、TAp63 の mRNA 発現は減少した (Fig. 1G)。

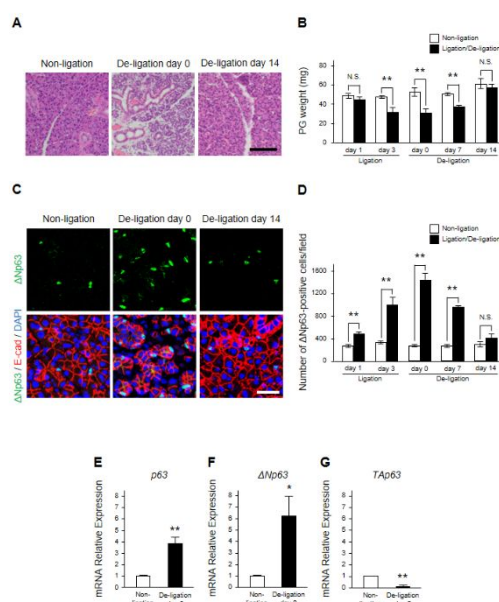


Fig. 1

(2) 開放 0, 14 日目の Krt5 発現を免疫組織化学的染色により確認し、Np63 との関係を検討した。Krt5 陽性領域の割合は開放 0 日目に増加し、開放 14 日目には非結紮と同程度まで減少した (Fig. 2A, B)。また、ほぼ全ての Np63 陽性細胞は Krt5 と共局在していた。

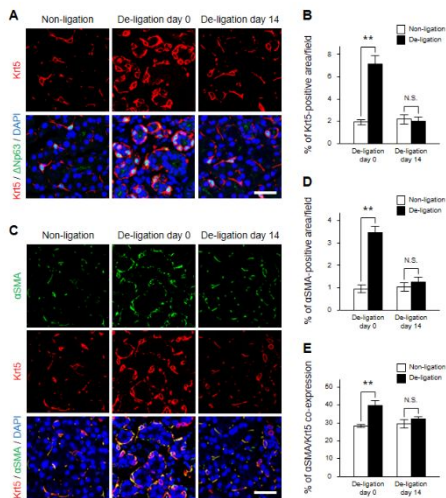


Fig. 2

さらに筋上皮細胞のマーカである SMA の発現を免疫組織染色により確認し、 Np63 と Krt5 との関係を検討した。 SMA の発現は開放 0 日目に増加し、開放 14 日目に非結紮と同程度まで減少した (Fig.2C,D)。 SMA と Krt5 の共発現の割合は、開放 0 日目に増加した (Fig.2E)。

(3) 照射 1,3,7,14,28 日目における耳下腺の形態学的変化を解析した。照射 7 日目に耳下腺組織は腺房細胞の喪失、線維性組織への置換、細胞間隙の増加などの損傷が確認された (Fig.3A)。その後、組織は回復傾向にあり、照射 28 日目には損傷が認められなかった。照射 1,3 日目の耳下腺の重さは非照射群と比較して変化しなかったが、照射 7 日目には減少していた (Fig.3B)。照射 14,28 日目は耳下腺の重さが増加傾向にあった。

照射 1,3,7,14,28 日目における Np63 の発現と局在を免疫組織染色によって確認した。 Np63 陽性細胞数は照射 1,3 日目では変化しなかったが、照射 7 日目では増加した (Fig.3C,D)。照射 7 日目以降、 Np63 陽性細胞の数は徐々に減少し、照射 28 日目では非照射群と同程度であった。 p63 陽性細胞は腺房と導管の基底側に局在していた。放射線照射による p63 アイソフォームの発現を確認するために、 p63, Np63, TAp63 の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR で分析した。 p63 と Np63 の mRNA 発現は照射 7 日目において相対的に増加した (Fig.3E,F)。一方、 TAp63 の mRNA 発現に変化は認められなかった (Fig.3G)。

(4) 照射 7,28 日目の Krt5 発現を免疫組織染色で確認し、 Np63 との関係を検討した。 Krt5 陽性細胞の割合は照射 7 日目に増加し、照射 28 日目には非照射群と同程度まで減少した (Fig.4A,B)。また、ほぼ全ての Np63 陽性細胞は Krt5 と共同在した。さらに、免疫組織染色により照射 7,28 日目の SMA 発現を確認し、 Np63 と Krt5 との関係を検討した。 SMA 陽性領域の割合は、照射 7 日目に増加し、照射 28 日目には非照射群と同程度に減少した (Fig.4C,D)。 SMA と Krt5 の共発現の割合は、照射 7 日目に増加した (Fig.4E)。

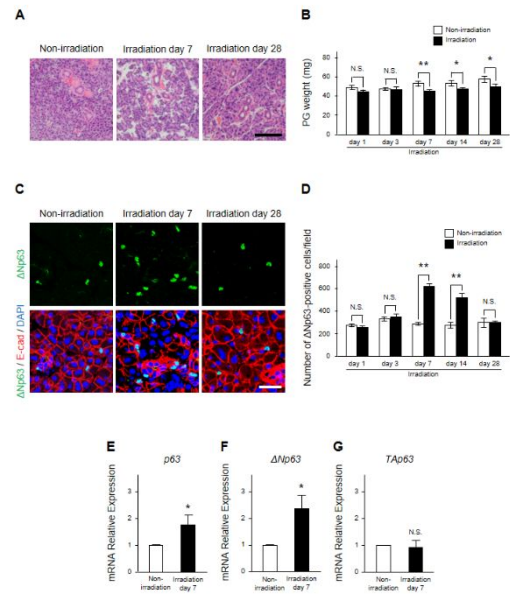


Fig. 3

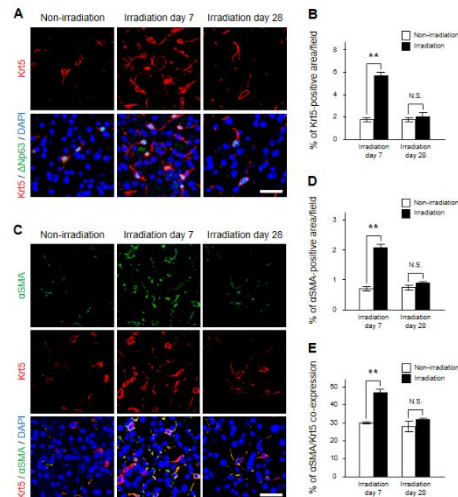


Fig. 4

(5) Np63 の発現を増加させる増殖因子を特定するために、唾液腺の器官培養を用い、ウエスタンブロッティングで解析を行った。 FGF7 添加群では Np63 の発現が著しく増加した (Fig.5A)。

しかし、他の群ではほぼ変化が認められなかった。角膜において FGF7 刺激による Np63 の発現は p38MAPK のリン酸化を介して調節されることから、唾液腺における Np63 制御機構を明らかにするために p38MAPK 阻害剤 SB203580 を使用した。FGF7 添加群、SB203580 添加群、両方添加群における胎仔唾液腺の形態変化を確認した。また、Phospho-p38MAPK の発現をウエスタンブロッティングにより解析した。FGF7 添加群では、唾液腺の大きさは変化しなかったが、腺房数は増加した (Fig. 5B,C,D)。さらに、Phospho-p38MAPK の発現が増加した (Fig. 5E)。一方、SB203580 を添加すると、唾液腺の大きさと腺房数が減少した。Np63 と phospho-p38MAPK の発現も減少した。細胞増殖を確認するために、サイクリン D1 の発現を評価したが、FGF7 刺激によって増加したが、p38MAPK のリン酸化阻害により変化は認められなかった。

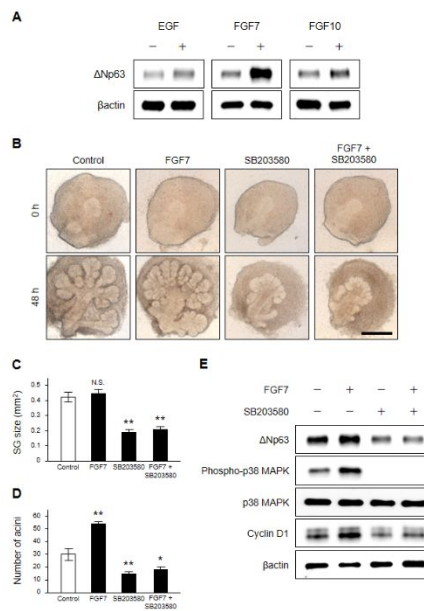


Fig. 5

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 Ikai Kazuki, Sakai Manabu, Minagi Hitomi Ono, Gojo Nao, Sakai Takayoshi	4. 巻 594
2. 論文標題 Np63 is upregulated during salivary gland regeneration following duct ligation and irradiation in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 3216 ~ 3226
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.13896	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
---------	---------