

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592737

研究課題名(和文) 口腔乾燥症の克服に向けた唾液腺腺房細胞の分化・成熟と機能発現の分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism on the differentiation/maturation and functional expression of salivary acinar cell toward conquest of xerostomia.

研究代表者

赤松 徹也 (AKAMATSU, Tetsuya)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：80294700

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、口腔乾燥症等の唾液腺の機能障害・喪失等に対する再生医療等を考える上でも重要となる、唾液腺腺房細胞の分化・成熟と機能発現の分子機構について解析した。

唾液腺腺房細胞分化誘導系やin vivo RNAi実験系、更には唾液腺再生モデル等による解析から、サチライシン様前駆体蛋白質変換酵素PACE4が、唾液腺腺房細胞の分化・成熟・再生に極めて重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)： In this study, we investigated the molecular mechanism on the differentiation, maturation and functional expression of salivary acinar cell, that is important to consider regenerative medicine (tissue engineering) toward the salivary dysfunction/lost function including xerostomia.

It is suggested that the subtilisin-like proprotein convertase PACE4 plays an important roles in differentiation, maturation, and regeneration of salivary acinar cell based on the analyses by salivary acinar differentiation induction system, in vivo RNAi experience, and salivary regeneration model.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：顎下腺 腺房細胞 発生・分化・再生 サチライシン様前駆体蛋白質変換酵素 PACE4 水チャネル AQ P5

1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまでに口腔組織発生において、増殖・分化因子等の不活性型前駆体蛋白質を特異的に活性化するサチライシン様プロテオソーム変換酵素 (SPC) の一つであるPACE4 (SPC4) が細胞の分化・成熟と密接に関わる可能性があることを報告した (Akamatsu T. *et al.*, *Dev. Dyn.* 216, 481-488, 1999; Akamatsu T. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272, 410-415, 2000)。ラット唾液腺発生過程においても、本酵素は時期・空間特異的に発現し、唾液腺腺房細胞や導管細胞の分化・成熟に重要な役割を果たすことが示唆されており、その発現は腺房細胞、導管細胞各々の分化・成熟過程で異なる転写制御を受けることが示唆されている (Akamatsu T. *et al.*, *Dev. Dyn.* 236, 314-320, 2007)。

一方、唾液腺の重要な生理機能である唾液分泌については、唾液腺に非常に多く発現する水チャネル、アクアポリン5 (AQP5) のノックアウトマウスが解析され、唾液の分泌量の低下と粘性が高くなることが報告された (Ma T. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274, 20071-20074, 1999)。更に、口腔乾燥症を呈する自己免疫疾患であるシェーグレン症候群の患者の一部においてAQP5の局在異常が報告され (Steinfeld S. *et al.*, *Lab. Invest.* 81, 143-148, 2001)、正常な唾液分泌においてAQP5が重要な役割を果たしていると考えられる。申請者らは唾液腺の分化・成熟と唾液分泌能の発現との関係を明らかにするため、ラット唾液腺発生過程におけるAQP5の発現と局在の詳細を解析し、胎生期の唾液腺未分化腺房細胞の分化過程でAQP5の発現レベルが著増することを明らかにした (Akamatsu T. *et al.*, *Pflugers Arch.-Eur. J. Physiol.* 446, 641-651, 2003)。

また、ラット胎仔顎下腺器官培養系を用いて、前述のPACE4 (SPC4) の機能や発現を阻害剤、特異抗体、siRNA等で抑制した場合に、唾

液腺の分枝形成が抑制されるのみではなく、AQP5の発現レベルも顕著に低下することを明らかにしている (Akamatsu T. *et al.*, *Dev. Biol.* 325, 434-443, 2009)。従って、唾液腺腺房細胞の分化・成熟過程において、PACE4 (SPC4) が重要な役割を担い、分化に伴いAQP5の発現が誘導され、機能し得る腺房細胞へ成熟することが考えられる。

唾液腺発生過程において、腺房細胞は介在部導管細胞より分化し、成熟すると考えられているが、その分子メカニズムは依然明らかではない。関連して、古くから唾液腺主導管結紮・再解放実験により、唾液腺腺房細胞がアポトーシスにより消失した後、腺房部 (腺房細胞) が再生することも知られているが、その分子メカニズムも未だ明らかではない。我々は、マウス唾液腺の主導管結紮により、大部分の導管細胞で幹細胞マーカーとして知られるSca-1の発現が著しく誘導されることを報告した (Purwanti N. *et al.*, *J. Oral Pathol. Med.* 40, 651-658, 2011; *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* 301, G814-G824, 2011)。Sca-1は正常唾液腺では介在部導管細胞でのみ発現しており、唾液腺腺房細胞の分化誘導時に重要な役割を果たしていることが予想される。

2. 研究の目的

口腔乾燥症は唾液分泌の低下に起因し、自己免疫疾患や薬物副作用、老化等により発症するが、近年は若い女性での発症が増加している。しかし、その発症メカニズムは依然不明であり、治療法も人工唾液等の対症療法のみである。唾液分泌の低下は虫歯の増加のみならず、口腔内環境を悪化させ、誤嚥性肺炎等の各種感染症との関連からも、特に現在の高齢化社会において克服すべき課題の一つである。

唾液は唾液腺腺房細胞から分泌されるが、腺房細胞の分化・成熟と唾液分泌能等の唾液

腺機能の発現との関係は明らかではない。本研究では、唾液腺機能の障害や喪失等に対する再生医療等を考える上でも重要となる、唾液腺腺房細胞の分化・成熟と機能発現の分子機構について解析する。

3. 研究の方法

(1) 腺房細胞分化誘導系

本研究では3次元培養マトリックスとしてメビオールジェル(株式会社池田理化)を、培養用培地はDMEM/Ham's F12 (1:1)培地を用い、培養時には5-10%ウシ胎仔血清を添加した。メビオールジェル(入手時、凍結乾燥状態)は事前にプロトコルに従い、クリーンベンチ内で無菌的に培地を加えて低温下(4℃)で数時間静置する。時々、泡立てないように緩やかに振盪して完全に溶解する。メビオールジェルは転移点が約20℃とされており、溶解後の取扱は全て冷却したピペット、チップ等を用いる。また、細胞の懸濁等の操作はクリーンベンチ内で氷上等、十分低温条件下で行う。完全に溶解したメビオールジェルでHSG細胞を懸濁する。このためHSG細胞は事前に回収または十分に濃縮しておく(メビオールジェルを希釈しすぎない)。メビオールジェルは粘性が強いため、気泡を生じないようにゆっくりと、細胞ができるだけ均一になるようにピペティング等で懸濁する。気泡が入らないように注意し、適量をシャーレまたはプレート内に入れ、CO₂インキュベーター(37℃, 5% CO₂)内でゲル化させる。ゲル化後、直ちに予め37℃に保温した培地を加え、通常通りに培養する。必要に応じ、培養期間中のスフェロイド形成(形態変化)を経時的に記録する。

培養終了後、前述の通り氷上等で冷却するか、よく冷やした生理食塩水等を十分量加えて、メビオールジェルを液化(流動化)・希釈し、遠沈管等に移して遠心分離により細胞(スフェロイド)を回収する。回収した細胞(スフェロイド)は常法により生化学・分子生物

学・組織化学的解析に用いる。

(2) in vivo RNAi 実験系

本研究ではアテロコラーゲンを主成分としたAteloGene(株式会社高研)を用いて新生仔ラット顎下腺近傍にPACE4に特異的なsiRNAを局所投与した。マニュアルに従い、siRNAは専用のバッファーで溶解、または希釈する。siRNAの終濃度が5-10μMとなるよう、AteloGeneとsiRNA溶液を等量混和する。直ちに、4℃で20分間、ゆっくり回転混和し混合液を調製する。混合液は10,000rpmで1分間の遠心分離により気泡を除去後、ディスプレイザブルシリンジに気泡が入らないよう注意して吸引し、使用時まで保冷する。

ラット新生仔の顎下部皮下の顎下腺近傍に、AteloGene-siRNA混合液を注意深く注入する。投与後、1-15日の間、経時的に顎下腺を摘出し、常法により生化学・分子生物学・組織化学的解析に用いる。

(3) 顎下腺主導管結紮-再開放系

本研究では7週齢雄性SDラットを用いた。ラットは深麻酔下、外科的に注意深く顎下腺右側主導管を結紮する。左側は非結紮の対照とする。結紮1日後と1-2週間後に顎下腺の形態を記録し、摘出後に重量を測定し、常法により生化学・分子生物学・組織化学的解析に用いる。また、結紮1週間後に再開放し、更に1-2週間後に同様に顎下腺を摘出し、各種解析に用いる。

4. 研究成果

サチライシン様前駆体蛋白質変換酵素PACE4は、増殖・分化因子前駆体等の活性化に必須のプロセッシングを触媒する。顎下腺発生過程においても分枝形成や腺房細胞の分化・成熟の制御に様々な増殖・分化因子等が関与するが、PACE4が、これらの増殖・分化因子等の活性化により唾液腺の発生に重要

な役割を果たすことを、器官培養法を用いて明らかにしてきた。

ヒト唾液腺由来細胞株である HSG 細胞は、マトリゲルでの三次元培養等により腺房細胞様に分化することが知られ、我々も人工マトリゲル、メビオールゲルや低付着性培養器材、ハイドロセルで HSG 細胞を培養すると、経時的に球形状の腺房様の構造が形成されることを確認した。通常のプラスチックシャーレでの培養時の HSG 細胞では PACE4 と AQP5、および、PACE4 の発現制御に関わると考えられる bHLH 型転写因子 Mist1 の発現は認められないのに対して、メビオールゲルにて培養したところ、培養開始 1, 3, 5 日目に PACE4、AQP5、Mist1、いずれの発現も経時的に増加傾向にあることが示唆された。Mist1 は膵臓腺房細胞分化過程で重要な役割を果たすことが報告されている。従って、唾液腺腺房細胞の分化・成熟過程では Mist1 を介した PACE4 の発現誘導が起こり、分化の進行の結果、AQP5 の発現が誘導される可能性が示唆された。

唾液腺腺房細胞の分化・成熟における PACE4 のより直接的な生理機能を明らかにするため、新生仔ラットの顎下腺に対する *in vivo* RNAi 実験により、PACE4 の発現を抑制した場合の影響を解析した。PACE4 発現を特異的に抑制する siRNA を投与後、1-15 日目に顎下腺を摘出した。Total RNA を調整し、PACE4 の発現レベルを RT-PCR で解析したところ、経時的に抑制されることが示唆された。また、同時に組織切片を作製し、TUNEL 染色によるアポトーシスの検出を試みたところ、部分的にはあるが TUNEL 陽性反応が検出され、アポトーシスの誘導が示唆された。このことから、PACE4 による増殖・分化因子前駆体等の活性化が唾液腺細胞の正常な分化・成熟に極めて重要であることが考えられる。

また、唾液腺は主導管結紮・再開放により、腺房細胞はアポトーシスが誘導され消失す

るが、導管細胞が増殖して腺房細胞を再生することが、随分以前より報告されてはいるが、その分子機構等は未解明である。本実験系は腺房細胞の分化・再生誘導機構を解明する上でも有用であることから、一部解析に着手した。主導管結紮により、顎下腺は唾液の貯留を伴う腫脹の後、萎縮した。ウエスタンブロット解析により、この間、水チャネル AQP5 蛋白質レベルの減少が認められ、少なくとも腺房部がダメージを受けたと考えられた。一方、PACE4 については発現の著しい誘導が認められた。主導管結紮 1 週間後に再開放し、更に 1-2 週間後に同様に解析した結果、再開放により、完全ではないものの AQP5 蛋白質レベルの回復が、また、PACE4 蛋白質レベルについては抑制が、各々示唆された。PACE4 は唾液腺発生初期より強く発現するが、分化・成熟の進行に伴い、その発現は減少し、成体ラット唾液腺では殆ど検出できないことから、本実験系により誘導された唾液腺再生時に PACE4 の発現が再び強力に誘導されることは非常に興味深く、PACE4 の未解明な生理機能を解明する上でも有用である。

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 1 件)

赤松徹也, 姚陳娟, 長谷川敬展, 吉村弘
唾液腺再生におけるサチライシン様前駆体蛋白質変換酵素 PACE4 の関与
J. Oral Biosci., 査読無, Suppl. 2013, p199

[学会発表](計 1 件)

赤松徹也, 姚陳娟, 長谷川敬展, 吉村弘
唾液腺再生におけるサチライシン様前駆体蛋白質変換酵素 PACE4 の関与
第 55 回歯科基礎医学会(岡山コンベンションセンター/岡山県) 2013.9.19(金)-21(日)

[図書](計 2 件)

赤松徹也, 姚陳娟, 細井和雄, (株)技術情報

協会, In: 動物細胞培養の手法と細胞死・増殖不良・細胞変異を防止する技術(第9章 12節 唾液腺研究における組織培養・分化誘導系), 2014, 584(pp.417-425)

Tetsuya Akamatsu, Oxford: Academic Press, In: Neil D. Rawlings and Guy S. Salvesen, editors, Handbook of Proteolytic Enzymes, 3rd Edn. (Chapter 729: Proprotein Convertase PACE4.), 2013, 4104(pp.3299-3305).

〔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

赤松 徹也 (AKAMATSU, Tetsuya)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部(歯学系)・准教授
研究者番号: 80294700

(2) 研究分担者

細井 和雄 (HOSOI, Kazuo)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部(歯学系)・教授
研究者番号: 10049413
平成23年度限りで定年退職に伴い辞退:
平成24年4月18日

長谷川 敬展 (HASEGAWA, Takahiro)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部(歯学系)・助教
研究者番号: 50447273

姚 陳娟 (YAO, Chenjuan)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部(歯学系)・助教
研究者番号: 20432750
平成24年度より研究分担者
(追加: 平成24年4月18日)

(3) 連携研究者
()

研究者番号: