

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390452

研究課題名(和文) 唾液腺の局所的再生をめざした分枝形態形成機構の探求

研究課題名(英文) Exploration of the mechanism of branching morphogenesis for the partial regeneration of salivary gland

研究代表者

阪井 丘芳 (SAKAI, TAKAYOSHI)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90379082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は唾液腺をモデルとして臓器形成機構を明らかにしようとして取り組んでいる。本研究の最終的な目標は、唾液腺の局所的な再生を実現することである。今までに唾液腺上皮の分枝部位(cleft)と非分枝部位(bud)からグローバルなデータベースを得てきた。その中から臓器形成に重要な遺伝子を発見しようとして試みてきた。本研究の進展により、特定の細胞接着因子や転写因子が臓器の形成に必要であり、ホルモンが大きさの調整に関与していることは明らかになってきた。それらの相互作用についてさらに引き続いて解析することにより、唾液腺の局所的な再生を実現できることを期待している。

研究成果の概要(英文)：We are investigating the mechanism of organ development using embryonic salivary gland. The purpose of our research is the establishment of partial salivary gland regeneration. The global database of salivary gland epithelium from cleft and bud was utilized for the finding of key gene and hormone for organ development. Further challenge for the future will be to develop realistic models that integrate many types of data to establish salivary gland regeneration.

研究分野：外科系歯学

キーワード：唾液腺

1. 研究開始当初の背景

再生医療は病気や事故などで失われた臓器や組織を修復するだけでなく、さまざまな難病の治療への応用が期待されている。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。ドライマウスの治療法は対症療法が主体であり、腺組織そのものを再生させるような画期的な治療法の開発が望まれている。現在のところ、皮膚や骨に関しては、再生医療研究が先行し、臨床への応用が始まりつつあるが、細胞から複雑な臓器を形成し、機能回復に至るまでは発展しておらず、2次元的な細胞の集合から3次元的な臓器の完成には依然として大きな障壁が存在する。

2. 研究の目的

肺、唾液腺、腎臓、前立腺などの臓器は、胎生期において上皮細胞の塊が生じ、立体的な分枝(枝分かれ)を繰り返して発達する。分枝形態形成はこれらの臓器にとって必須の現象であり、臓器再生に大きく関与する可能性が考えられる。本研究では、形態観察しやすいマウス胎仔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ことを目的としている。将来的には、これらの基礎データをもとにして、機能低下した腺組織と再生した唾液腺とを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

発生時期のマウス唾液腺の cleft (切れ目) と bud (先端部) の上皮組織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、分枝に関与することが予測される遺伝子群を網羅的に解析する。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(www.sagenet.org) と T7-based RNA amplification 法を組み合わせた 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。さらに、その情報をもとに、それぞれの遺伝子の臓器形態形成における機能を解析する。

4. 研究成果

(1) 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) 唾液腺上皮 cleft 部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、同定した遺伝子の中にフィブロネクチンや Btd7 が存在し、cleft に強く発現していることを確認した。

(3) RNA 干渉(siRNA, small interfering RNA) 法による阻害実験

Btd7 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) 遺伝子導入実験

唾液腺にアデノウイルス等を用いて転写因子 Btd7 を強制発現させたところ、分枝形成が誘導された。哺乳類の臓器への遺伝子導入は安定した結果が得られず、過去の研究においても成功例が少なかったが、上皮組織単独においても遺伝子導入が成功している。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) 臓器形成におけるホルモンの関与

本研究遂行中に胎仔マウス唾液腺がホルモンの1つであるメラトニンを分泌していること、腺房上皮細胞にメラトニン受容体を有していること、外因性のメラトニンが唾液腺形成時の大きさを制御していることが明らかになった。今後再生医療への応用性を含めて検討していきたい。

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10件)

Tanaka N, Nohara K, Okuno K, Kotani Y, Okazaki H, Matsumura M, Sakai T. Development of a swallowing frequency meter using a laryngeal microphone. Journal of Oral Rehabilitation 39(6):411-420, 2012

Mima J, Koshino A, Oka K, Uchida H, Hieda Y, Nohara K, Kogo M, Chai Y, Sakai T. Regulation of the Epithelial Adhesion Molecule CEACAM1 is Important for Palate Formation. PLoS ONE 8(4), e61653, 2013

Ueda N, Nohara K, Kotani Y, Tanaka N, Okuno K, Sakai T. Effects of the bolus volume on hyoid movements in normal individuals. Journal of Oral Rehabilitation 40(7), 491-499, 2013.

Sakai T, Onodera T. Btd7/Cleftin regulates cleft formation and branching morphogenesis of epithelial cells. *Journal of Oral Biosciences* 55, 73-75, 2013

Okuno K, Tachimura T, Sakai T. Influences of swallowing volume and viscosity on regulation of levator veli palatini muscle activity during swallowing. *Journal of Oral Rehabilitation* 40(9): 657-663, 2013

Tanaka N, Nohara K, Kotani Y, Matsumura M, Sakai T. Swallowing frequency in elderly people during daily life. *Journal of Oral Rehabilitation* 40(10): 744-750, 2013

Okuno K, Nohara K, Tanaka N, Sasao Y, Sakai T. The efficacy of a lingual augmentation prosthesis for swallowing after a glossectomy: A clinical report. *Journal of Prosthetic Dentistry* 111(4), 342-345, 2014

Inada Y, Uchida H, Umemura Y, Nakamura W, Sakai T, Koike N and Yagita N. Cell and tissue-autonomous development of the circadian clock in mouse embryos. *FEBS Letters* 588(3), 459-465, 2014

Sasao Y, Nohara K, Okuno K, Nakamura Y, Sakai T. Videoendoscopic diagnosis for predicting the response to oral appliance therapy in severe obstructive sleep apnea. *Sleep Breathing* 18(4), 809-815, 2014

Obana-Koshino A, Ono H, Uchida H, Miura J, Nakamura W, Nohara K, Maruyama Y, Hattori A, Sakai T. Melatonin inhibits embryonic salivary gland branching morphogenesis by regulating both epithelial cell adhesion and morphology. *PLoS ONE*: 10(4), e0119960, 2015

[学会発表](計 19 件)

Okuno K, Nohara K, Wakasugi Y, Sakai T. Comparison of swallowing reflex during sleep and while awake, The 20th Annual Dysphagia Research Society Meeting, Toronto, Canada, March 8-10, 2012

Sakai T, Mima J, Koshino A, Uchida H, Kogo M, Nohara K, Hieda Y. The Potential Role of Ceacam1 in Folic Acid-Related Mouse Embryonic Palatal Fusion, The 69th Annual Meeting of American Cleft Palate-craniofacial Association,

California, April 17-21, 2012

Takai E, Nohara K, Satoh K, Sugiyama C, Sakai T. Videofluorographic Study of Velar Velocity during Speech in Adults with/without Cleft Palate, The 69th Annual Meeting of American Cleft Palate-craniofacial Association, California, April 17-21, 2012

Otsuki K, Yamanishi T, Morimoto Y, Miya S., Ishihama K, Kida K, Tsuji T, Nohara K, Sakai T, Kogo M. Morphological Assessment of the Maxillary Alveolar Arch after Early Two-Stage Palatoplasty -A Modification in the Hard Palate Closure Technique, The 69th Annual Meeting of American Cleft Palate-craniofacial Association, California, April 17-21, 2012

Kida K, Yamanishi T, Otsuki K, Ishihama K, Miya S, Takai E, Satoh K, Nohara K, Sakai T, Kogo M. Postoperative Assessment of Alveolar Bone Grafting with A Combination of the Chin Bone and Beta-Tri Calcium Phosphate (Beta-TCP), The 69th Annual Meeting of American Cleft Palate-craniofacial Association, California, April 17-21, 2012

Okuno K, Nohara K, Wakasugi Y, Sakai T. Comparison of swallowing reflex during sleep and while awake. DRS 20th annual meeting, Seattle, WA, USA, March 13, 2012

Obana A, Uchida H, Miura Z, Nakamura W, Nohara K, Maruyama Y, Hattori A, Sakai T. Melatonin regulates the branching morphogenesis of embryonic salivary gland by adjusting the adhesion and morphology of epithelial cells Best Poster Presentation, The 9th Annual Meeting of Gordon Conference -Salivary Gland and Exocrine Biology-, Galveston, TX, USA, Feb 4, 2013

Uchida H, Obana A, Nakamura W, Sakai T. Demonstration of circadian oscillation in the mouse salivary glands (parotid gland, submandibular gland, and sublingual gland) in vitro, The 9th Annual Meeting of Gordon Conference ~Salivary Gland and Exocrine Biology~, Galveston, TX, Feb 4, 2013

Sakai T, Koshino A, Ono H, Uchida H, Mima J, Hieda Y, Nohara K, Koga M, Chai Y, Oka K. The relationship between CEACAM1 and TGF in palatal fusion. 12th international congress on cleft

lip/palate and related craniofacial anomalies, Florida USA, May 5-10, 2013

Sugiyama C, Nohara K, Takai E, Sakai T. A comparison of the prevalences of speech sound errors in Japanese children with or without cleft palate. 12th international congress on cleft lip/palate and related craniofacial anomalies, Florida USA, May 5-10, 2013

Sugiyama C, Nohara K, Hikage A, Miyamoto K, Koshino A, Okuno K, Sakai T. An investigation of relationship between articulation and motor coordination in individuals with cleft palate. 12th international congress on cleft lip/palate and related craniofacial anomalies, Florida USA, May 5-10, 2013

Takai E, Nohara K, Sato K, Sugiyama C, Sakai T. Videofluorographic study of velar velocity during speech and swallowing in adults with/without cleft palate. 12th international congress on cleft lip/palate and related craniofacial anomalies, Florida USA, May 5-10, 2013

Otsuki K, Yamanishi T, Yamamoto T, Fujibayashi E, Hiroishi S, Tsuji T, Seikai T, Nohara K, Sakai T, Kogo M. Cephalometric analysis of patients with complete unilateral cleft lip and palate following the early two-stage palatoplasty. 12th international congress on cleft lip/palate and related craniofacial anomalies, Florida USA, May 5-10, 2013

Hiroishi S, Yamanishi T, Yamamoto T, Fujibayashi E, Otsuki K, Isomura E, Sato K, Takai E, Sakai T, Kogo M. Treatment outcome of premaxillary osteotomy for patients with complete bilateral cleft lip and palate. 12th international congress on cleft lip/palate and related craniofacial anomalies, Florida USA, May 5-10, 2013

Kaneko N, Nohara K, Uchida Y, Ueda N, Tanaka N, Mitsuyama M, Sakai T. Effect of mucociliary transport function on incidence of aspiration pneumonia in elderly aspirators, The 22th Annual Meeting of the Dysphasia Research Society. Tennessee, USA, March 6, 2014.

Ueda N, Nohara K, Tanaka N, Okuno K, Sakai T. A comparison of the maximum hyoid velocity in healthy younger and older women. The 22th Annual Dysphagia Research Society Meeting, Nashville, USA, March 6-8,

2014

Nohara K, Tanaka N, Sakai T. Relationships between salivary flow, swallowing frequency, and GERD symptoms. The 22th Annual Dysphagia Research Society Meeting, Nashville, USA, March 6-8, 2014

Nohara K, Kaneko N, Uchida Y, Tanaka N, Sakai T. Relationship between airway clearance function and aspiration pneumonia in geriatric nursing home residents. The 4th ESSD Congress, Brussels, Belgium, October 23-25, 2014

Sugiyama C, Nohara K, Hikage A, Hishikawa A, Takai E, Kogo M, Sakai T. An investigation of relationship between articulation and motor coordination in individuals with UCLP. 71th Annual American Cleft Palate-Craniofacial Meeting, Indianapolis, USA, March 24-29, 2014

〔図書〕(計0件)

〔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

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

(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：20346167

研究分担者

福本 敏 (FUKUMOTO SATOSHI)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：30264253

(3)連携研究者

()

研究者番号：