

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462608

研究課題名(和文)細胞治療に分化誘導因子およびマイクロRNA制御を加えた粘膜再生治療

研究課題名(英文) Epigenetic regulation in the process of oral mucosal regeneration in a rat oral ulcer model

研究代表者

穉山 直太郎 (AKIYAMA, Naotaro)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：90554238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：難治性口腔潰瘍は摂食障害・栄養状態悪化から生活の質の低下を招く。難治性口腔潰瘍の治療は未だ不十分な場合も多く、新規治療開発を目標に、ラット口腔潰瘍モデルを用いた粘膜再生過程におけるDNAメチル化制御及び上皮幹細胞/前駆細胞の分化誘導因子Wnt5aの発現解析を免疫組織学的に行った。結果、DNAメチル化レベルは再生上皮で細胞増殖活性の上昇がピークに近づくと低下し、新規メチル化酵素Dnmt3a、3bに制御される可能性が示された。再生粘膜上皮細胞の分化誘導にDNAメチル化制御が強いかかわっている可能性が示唆され、上皮幹細胞/前駆細胞の分化誘導因子Wnt5aの発現様式と一致する傾向が示された。

研究成果の概要(英文)：Severe oral ulcers can lead to undernutrition and poor quality of life. In this study, we analyzed an oral ulcer model immunohistochemically using antibodies for the molecules as follows: PCNA, a marker for late G1 to S phase; 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC), a DNA methylation marker; 5-methylcytosine (5-mC), a DNA demethylation marker; Dnmts, DNA methyltransferases; and Wnt5a, a regulator of epithelial stem/progenitor cell differentiation. As results, PCNA-positive cells increased at Day 2 and returned to normal at Day 6 after ulceration. The ratio of the expression level of 5-mC to 5-hmC declined at Day 5. Dnmts' expression pattern was compatible for these results. Moreover, Wnt5a-positive cells increased in the regenerating epithelium at Day 5. These results indicated that DNA methylation level was critically controlled in the process of oral mucosal regeneration and Wnt5a may possibly play an important role in regulation of stem/progenitor cell differentiation.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：口腔潰瘍 粘膜再生 DNAメチル化 Wnt5a

1. 研究開始当初の背景

難治性潰瘍は上皮の幹細胞あるいは前駆細胞の増殖・分化制御機構の破たんが発症契機の一つと考えられる。摂食経路における粘膜上皮の欠落は疼痛に伴う摂食障害から栄養状態の悪化を招くだけでなく、免疫抑制・不全状態では局所における感染から菌血症、真菌血症、敗血症を誘発しうる重大な危険因子として指摘されている(Duncan M and Grant G, 2003)。難治性潰瘍の治療ターゲットは粘膜保護作用を有する薬剤のみでなく増殖因子や炎症性サイトカイン制御など多岐に渡るがその効果は未だ十分でない場合も多く、根本的な解決策が望まれる。自己の培養細胞を用いた細胞治療は一つの理想形であるが臨床応用についてはさらに効率化を図る必要がある。われわれは先行研究において生体環境に近い組織再生、移植方法の簡素化といった観点から組織再生の3要素である、細胞、足場、調節因子を移植し、生体内で組織再生を図る *in situ tissue engineering* に注目し、粘膜再生治療の確立を目標にかかげ、ラット実験モデルを用いてその有用性を示すことができた(Akiyama N *et al.*, 2013)。

エピジェネティクスとは、DNAの塩基配列の変化を伴わずにヒストンタンパクやそれを取り巻くDNAの修飾によってクロマチンの構造や遺伝子発現が制御される現象である。DNAのメチル化修飾は遺伝情報の発現を抑制するエピジェネティックな制御機構のひとつであり、DNAのメチル化状態はシトシン5位がメチル化された5-メチルシトシン(5mC)と脱メチル化経路で生じる中間体の5-ヒドロキシメチルシトシン(5hmC)が知られており、細胞増殖過程でメチル化パターンの維持に働くDNAメチル基転移酵素(Dnmt)1と新規にメチル基を付加するDnmt3a及びDnmt3bによる制御機構が存在する。未分化細胞は一般的にDNAが高メチル化状態にあると考えられるが、分化誘導段階で分子発現機構において皮膚創傷治癒過程での未分化細胞の活性化メチル化制御機構がどのように機能しているのか生体内においては未だ不明な点が多い。再生医療の分野にもエピジェネティックな要素を解析し、時間的・空間的分子発現制御を加えることで細胞治療による組織再生の効率化を目指すことが可能となれば、さらに細胞治療の臨床応用が加速することが期待されるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

組織再生の効率化を追求するためにラット口腔潰瘍モデルを用い、潰瘍部の上皮化過程において経時的にDNAメチル化レベルを解析し、DNAメチル基転移酵素を含めたエピジェネティックな遺伝子発現制御機構に関して時間的・空間的解析を行い、口腔粘膜再生にかかわる制御分子を検索することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) ラット口腔潰瘍モデルの作製

6週齢のラットを用い、三種混合麻酔(メドミジン0.375 mg/kg、ミダゾラム2 mg/kg、ブトルファノール2.5 mg/kg)の腹腔内投与による麻酔鎮静下に頬粘膜に載除鉗子で径2.5mmの潰瘍を形成した。潰瘍形成後0~7日目及び14日目に各群4匹を安楽死させ、頬粘膜を採取後、4%PFA/PBS(pH=7.4)で固定した。パラフィン切片を作成し、厚さ5µmの連続切片を作成し解析に用いた。H&E染色を用いて、潰瘍形成および粘膜再生過程の経時的变化の解析を行った。

(2) 口腔潰瘍部の粘膜再生過程におけるDNAメチル化制御の解析

免疫組織学的に以下の抗体を用いて解析を行った。細胞増殖に関し、G1後期およびS期のマーカーとして抗PCNA抗体(mouse monoclonal anti-Proliferating cell nuclear antigen(PCNA) antibody [PC10], 1:200)を用い、DNAメチル化レベルについて抗5mC抗体(mouse monoclonal anti-5mC antibody, 1:400)および抗5hmC抗体(rabbit polyclonal anti-5hmC antibody, 1:500)を用いた。DNAメチル基転移酵素については、維持メチル化酵素の解析として抗Dnmt1抗体(Mouse monoclonal anti-Dnmt1 antibody, 1:250)を、新規メチル化酵素として抗Dnmt3a抗体(rabbit polyclonal anti-Dnmt3a antibody, 1:200)、抗Dnmt3b抗体(rabbit polyclonal anti-Dnmt3b antibody, 1:200)を用いた。二次抗体にHRP-goat anti-mouse IgG(1:100)、HRP-goat anti-rabbit IgG(1:100)、goat anti-mouse Alexa-546(1:500)、goat anti-rabbit Alexa-488(1:500)を用いた。発色に関して、PCNAは

3,3'-diaminobenzidine-4HCl(DAB)/H₂O₂(50 mM Tris HCl pH 7.6, DAB 0.2 mg/ml, 0.005% H₂O₂), DnmtはDAB/Ni/Co/H₂O₂(0.1 M PB pH 7.4, DAB 0.5 mg/ml, 0.025% CoCl₂, 0.02% NiSO₄(NH₄)₂SO₄, 0.01% H₂O₂)を用い、対比染色はPCNAにMethylgreenを、5mCおよび5hmCに4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)を用いた。

(3) 粘膜再生過程における分化誘導因子Wnt5aの発現解析

上皮幹細胞/前駆細胞の分化誘導因子としてWnt5aに着目し、抗Wnt5a抗体(rabbit polyclonal anti-Wnt5a antibody, 1:100)を用い解析を行った。二次交代にgoat anti-rabbit Alexa-488(1:500)を用い、対比染色にDAPIを用いた。

4. 研究成果

H&E染色による形態学的解析では潰瘍形成0日目に真皮に達する潰瘍形成が確認された。潰瘍部については2日目に上皮の伸長が確認され4日目に上皮化が完了し、5日目で再生上皮が肥厚し、7日目まで上皮の肥厚、間質

の炎症細胞浸潤を認め、14日目に再生粘膜は正常化した。

細胞増殖についてはPCNAを用いた解析により再生上皮の増殖活性のピークは5日目であることが確認された。

DNAメチル化状態は正常口腔粘膜では基底層で5mCが高発現、基底上層で5hmCが高発現であり、潰瘍モデルでは基底層の発現パターンは同様であったが、潰瘍形成後5日目の肥厚再生粘膜の基底上層では5mCのシグナルが低下した。Dnmtの発現パターンについてはDnmt1の発現パターンに有意差は認められなかったが、Dnmt3a、3bは潰瘍形成5日目に有意に低下し、6日目に正常レベルに回復した。本モデルでは未分化細胞の増殖から分化段階に切り替わるタイミングで新規メチル化酵素であるDnmt3a、3bの発現が低下することが示唆され、粘膜再生において分化誘導のタイミングでDNAメチル化制御が強いかかわっている可能性が示唆された。

実際、上皮幹細胞/前駆細胞の分化誘導に重要と考えられているWnt5aの発現は細胞増殖が負に制御されるタイミングで上昇し、その局在は増殖期の上皮幹細胞/前駆細胞局在と一致する傾向が認められた。

以上の結果から、粘膜再生には細胞増殖から細胞分化に転換する際に緻密なエピジェネティック制御がかかわっており、時間的・空間的に分化誘導を行うこと、すなわち、上皮幹細胞/前駆細胞にWnt5aの発現を加えることで難治性潰瘍に対して効率的な上皮化を行える可能性が示唆され、さらなる細胞治療による再生医療の飛躍を期待できる可能性が示唆された。

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2件)

Tomomi Yamamoto-Fukuda, Naotaro Akiyama, Masahiro Takahashi, Hiromi Kojima, Keratinocyte Growth Factor (KGF) Modulates Epidermal Progenitor Cell Kinetics through Activation of p63 in Middle Ear Cholesteatoma, J Assoc Res Otolaryngol, 査読あり, 2018 Mar 16 [Epub ahead of print], DOI: 10.1007/s10162-018-0662-z.

Naotaro Akiyama, Tomomi Yamamoto-Fukuda, Mamoru Yoshikawa, Hiromi Kojima, Evaluation of YAP signaling in a rat tympanic membrane under a continuous negative pressure load and in human middle ear cholesteatoma, Acta oto-laryngologica, 査読あり, 137 (11), 2017, 1158-1165. DOI: 10.1080/00016489.2017.1351040.

[学会発表](計8件)

Akiyama N, Yamamoto-Fukuda T, Yoshikawa M, Kojima H, Evaluation of mechanotransduction in a rat tympanic membrane under a continuous negative pressure load and in human middle ear cholesteatoma, Association for Research in Otolaryngology The 41th Annual MidWinter Meeting, February 10-14, 2018, San Diego, USA.

Yamamoto-Fukuda T, Akiyama N, Masahiro T, Kojima H, Keratinocyte growth factor (KGF) modulates epidermal progenitor cell kinetics through activation of p63 in middle ear cholesteatoma, Association for Research in Otolaryngology The 41th Annual MidWinter Meeting, February 10-14, 2018, San Diego, USA.

種山直太郎, 福田智美, 吉川衛, 小島博己, ラット中耳陰圧モデルおよび弛緩部型真珠腫におけるYAPシグナルの解析, 第27回日本耳科学会総会・学術講演会, 2017年11月22日~24日, 横浜

福田智美, 種山直太郎, 高橋昌寛, 小島博己, 中耳真珠腫発症機序の解明 中耳真珠腫形成における神経堤由来細胞の役割, 第27回日本耳科学会総会・学術講演会, 2017年11月22日~24日, 横浜

種山直太郎, 福田智美, 吉川衛, ラット口腔潰瘍上皮化過程におけるWnt5a発現の解析, 第118回日本耳鼻咽喉科学会通常総会・学術講演会, 2017年5月17日~20日, 広島

Naotaro Akiyama, Tomomi Yamamoto-Fukuda, Haruo Takahashi and Hiromi Kojima, Novel Experimental model for Negative Pressure in the Middle Ear and Effects of Epithelial-cell Proliferation in the Tympanic Membrane, Association for Research in Otolaryngology The 40th Annual MidWinter Meeting, February 11-15, 2017, Baltimore, USA.

種山直太郎, 遠藤大輔, 小路武彦, ラット口腔潰瘍上皮化過程での粘膜上皮細胞におけるDNAメチルトランスフェラーゼ(Dnmt)発現の解析, 第121回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2016年3月28日~30日, 福島

福田智美, 小路武彦, 真珠腫性中耳炎発生機序の分子形態学的解析, 第47回日本臨床分子形態学会総会・学術集会, 2015年9月18日, 19日, 長崎

6. 研究組織

(1)研究代表者

種山直太郎 (AKIYAMA, Naotaro)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号: 90554238

(2)研究分担者

福田 智美 (YAMAMOTO-FUKUDA, Tomomi)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：40372776