

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 12 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463032

研究課題名(和文) 転写因子導入によるヒト唾液腺細胞の再生

研究課題名(英文) Grhl2 regulation of SPINT1 expression controls organogenesis of the embryonic salivary gland

研究代表者

吉田 博昭 (YOSHIDA, Hiroaki)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：40260624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウス胎仔顎下腺を転写因子Grhl2 siRNAおよび、その標的遺伝子であるプロテアーゼ阻害因子SPINT1タンパク質の存在下で培養し、顎下腺形成への影響を解析した。培養顎下腺でのGrhl2、SPINT1、E-cadherin、claudin、ZO-1の発現を解析した。Grhl2 siRNA存在下では上皮組織の発育が抑制され、E-cadherin、claudin、ZO-1、SPINT1の発現も抑制された。一方、siRNAによる発育抑制効果は、SPINT1タンパク質を添加することで救済された。本研究は、Grhl2によるSPINT1の発現調節が器官形成に関わっていることを初めて示した。

研究成果の概要(英文)：Various molecules including signaling molecules and cell adhesion molecules have been implicated in salivary gland development, transcription factors regulating the expression of those molecules and SMG development are largely unknown. In the present study we show that the Grhl2 transcription factor, which is involved in development of several epithelial tissues, is expressed in the epithelial tissue of embryonic mouse submandibular gland (SMG). Grhl2 knockdown in cultured SMG results in retardation of epithelial growth and branching morphogenesis of the gland. Grhl2 binds to SPINT1 gene, which encodes a protease inhibitor functioning in the extracellular space, and positive regulates SPINT1 protein expression in the epithelial tissue. Furthermore, the addition of SPINT1 protein rescues defects in SMG development upon Grhl2 knockdown. Grhl2 and SPINT1 may be utilized for therapy and regeneration of damaged salivary glands.

研究分野：口腔外科

キーワード：転写因子 マウス胎仔顎下腺 器官培養 Grainy-head like 2

1. 研究開始当初の背景

唾液腺は、様々な酵素を口腔内へ供給することによって口腔機能に重要な役割を果たしている。

唾液分泌量の低下はシェーグレン症候群や頭頸部癌の放射線治療によって起こるだけでなく、加齢（生理的な老化）による現象でもある。

重篤な唾液分泌障害は口腔内細菌の増加をもたらし、とくに高齢者では誤嚥性肺炎を誘発することが多い。

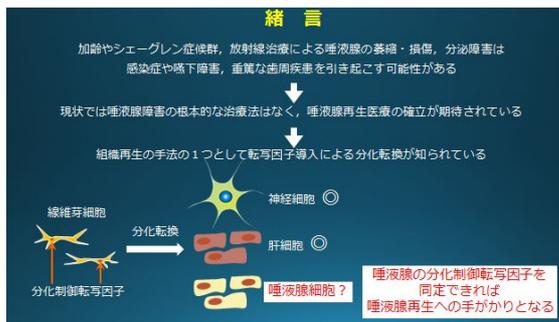
我が国では肺炎は悪性新生物、心疾患について死因の3番目であり、超高齢化社会の到来により今後も増えることが予想される（平成24年度厚生労働省報告）。

また、若年・青年においても、唾液分泌障害は生活の質（QOL）の著しい低下を招くだけでなく、全身疾患のリスク要因となる。

このような状況を踏まえると、唾液分泌障害は、世界で最も早く超長寿・超高齢化社会を迎えつつある我が国が諸外国に先駆けて取り組むべき疾病と言える。

唾液分泌障害の主な原因は唾液腺の線維化や腺房細胞の萎縮などの不可逆的な変性であり、現状では唾液分泌障害の根本的な治療法は無く、対症療法にとどまっている。

このため、根本的な治療法として唾液腺再生医療の確立が期待されている。



2. 研究の目的

本研究では、唾液腺再生のアプローチのひとつとして、転写因子を用いた唾液腺細胞再生の可能性を探る。マウス唾液腺をモデル系として唾液腺細胞の再生に必要な転写因子を同定し、ヒトへの応用を検討する。

具体的には、転写因子 Grhl2 が、その標的遺伝子であるプロテアーゼ阻害因子 SPINT1 の発現を調節することでマウス顎下腺形成に関与していることを調べることを研究目的とする。

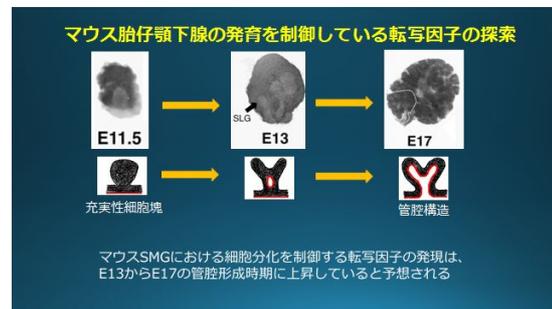
3. 研究の方法

唾液腺再生の方法には唾液腺幹細胞の分化誘導や転写因子による唾液腺細胞への分

化転換などが考えられ、これらの方法を確立するための重要なステップは唾液腺の幹細胞や各構成細胞を分離して解析することである。

そのため、成体マウスから顎下腺を摘出し組織切片と単一上皮細胞標本を作製した。CD117, CD66a, E-cadherin, AQP5, CLDN4, NKCC1 および CK5 に対する抗体と蛍光標識2次抗体を用いて染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。動物実験は大阪歯科大学動物実験規定に従った。

次の研究では、唾液腺形成過程で発現している転写因子の同定と機能解析を進め、上皮の分化を制御している転写因子 Grainyhead-like 2(Grhl2)についてマウス顎下腺における発現と機能を解析した。



本研究では、マウス胎仔顎下腺における Grhl2 の発現は、E-cadherin との二重免疫染色法により共焦点レーザー顕微鏡で解析した。

顎下腺形成における Grhl2 の関与を調べるために Grhl2 遺伝子に対する siRNA およびネガティブコントロール siRNA の存在下で胎仔顎下腺を培養して、腺房数を計測した。

また、Grhl2 および上皮細胞接着関連因子 E-cadherin, Cldn3, ZO-1 の mRNA とタンパク質の発現をリアルタイム PCR, ウェスタンブロット法で解析した。

さらに、マウス胎仔顎下腺を Grhl2 siRNA および SPINT1 タンパク質の存在下で培養し、顎下腺形成への影響を解析した。

培養顎下腺での Grhl2, SPINT1, E-cadherin, claudin, ZO-1 の発現を解析した。

4. 研究成果

結果として、組織切片観察から、CD66a と CD117 は主に上皮組織で発現するが、両者の発現パターンは異なることがわかった。

CD66a は腺房で強く、また導管では介在部で強く、線条部と排出部では弱かった。

CD117 は介在部導管で強く、線条部と排出部の一部の細胞で弱く発現し、腺房では発現していなかった。

CD66a と CD117 は基底細胞や筋上皮細胞では発現していなかった。CD117 と NKCC1 は介在部、線条部、排出部の導管で発現していた。

CD66a と CD117 のこのような発現パターンは単一上皮細胞標本でも確認できた。

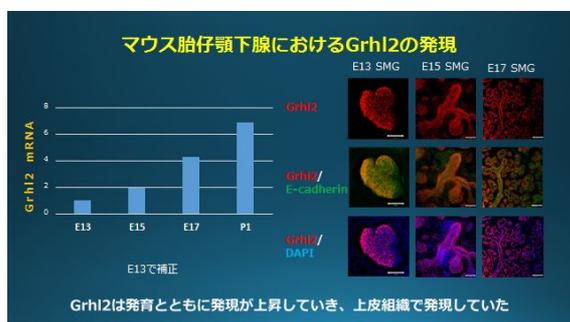
以上の結果から、唾液腺を構成する腺房、介在部、線条部および排出部導管の各細胞、基底・筋上皮細胞は CD66a と CD117 の発現量の違いによって区別できることを示している。これらによって、FACS を用いて各細胞に特異的な遺伝子の同定や幹細胞の濃縮が可能となり、唾液腺再生医療の確立に貢献することが証明された。

本研究成果は、第 59 回日本口腔外科学会総会にて“CD117 と CD66a における唾液腺上皮細胞の分類”と 2014th American Association of Oral and Maxillofacial surgery にて、“Expression patterns of CD66a and CD117 in the mouth submandibular gland”のタイトルで発表し、ゴールドリボン賞、優秀ポスター発表賞を受賞した。さらに第 26 回日本口腔科学会近畿地方会でも発表を行った。

顎下腺における Grh12 の発現は E-cadherin 陽性細胞だけで認められた。Grh12 siRNA 存在下の顎下腺では、コントロールに比べて成長が著しく抑制され、また腺房数および Grh12 mRNA 量が有意に減少していた。



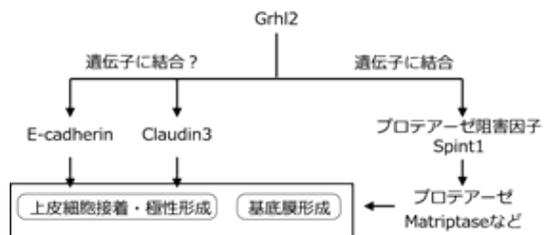
E-cadherin, Cldn3, ZO-1 の mRNA およびタンパク質の発現も有意に減少していた。以上のことから、マウス顎下腺では Grh12 は上皮で発現し、上皮組織の形態形成と分化に関わっていることが示唆された。



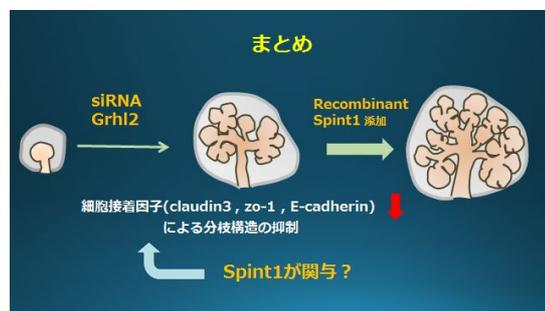
これらの研究成果は、第 60 回日本口腔外科学会総会と、さらに第 70 回日本口腔科学会総会で発表を行った。

最後に、Grh12 は上皮組織特異的に発現しており、Grh12 siRNA 存在下では上皮組織の

成長および分枝形態形成が抑制され、E-cadherin, claudin, ZO-1, SPINT1 の発現も抑制された。一方、siRNA による顎下腺形成抑制効果は、SPINT1 タンパク質を添加することで救済された。



本研究は、Grh12 による SPINT1 の発現調節が器官形成に関わっていることを示す世界初の報告である。



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 4 件)

Takumi MATSUSHITA, Takayoshi SAKAI, Hiroaki YOSHIDA, Shosuke MORITA: Expression of Grh12 and Its Target Gene Products in Developing Mouse Submandibular Gland. Journal of Oral Tissue Engineering. 14:98-106 2016 (査読有)

Shoichi YAMAMOTO, Hiroaki YOSHIDA, Tadashi OHKUBO, Hirofumi SAWAI, Shosuke MORITA: Evaluation of Effect in the Mouth with New Spray-type Oral Moisturizer: A Preliminary Study. Oral Health and Dental Management 15(6):1-3 2016 (査読有)

Shoichi YAMAMOTO, Hiroaki YOSHIDA, Tadashi OHKUBO, Hirofumi SAWAI, Shosuke MORITA: Evaluation of Environmental Change in the Mouth with the use of Spray-type Oral Moisturizer Containing -PGA. Journal of Oral Maxillofacial Surgery, Medicine, Pathology. 28:446-449 2016 (査読有)

Akira TAKEYAMA, Yoshihiro YOSHIKAWA, Takashi IKEO, Shosuke MORITA, Youki HIEDA : Expression Patterns of CD66a and CD117 in the Mouse Submandibular Gland. Acta histochemica. 117: 76-82 2015 (査読有)

〔学会発表〕(計 7 件)

松下 巧, 阪井丘芳, 吉田博昭, 森田章介, 檜枝洋記: マウス顎下腺発生過程における転写因子 Grhl2 とその標的遺伝子の発現. 第 28 回口腔科学会近畿地方部会, 大阪市, 大阪薬業年金会館 2016/12/10

松下 巧, 吉田博昭, 田中準一, 美島健二, 阪井丘芳, 森田章介: 顎下腺形成には, 転写因子 Grhl2 によるプロテアーゼ阻害因子 SPINT1 の発現調節が関与する. 第 61 回日本口腔外科学会学術大会, 千葉市, 幕張メッセ 2016/11/26

松下 巧, 吉田博昭, 森田章介: 転写因子 Grhl2 はマウス胎児顎下腺の分枝形態形成に関与する. 第 60 回日本口腔外科学会学術大会, 名古屋市, 名古屋国際会議場 2015/10/17

吉田博昭: ドライマウスへの新たなアプローチ~アクアバランス®, 薬用マウススプレーの使用における口腔内環境の変化についての検討~. 第 69 回日本口腔科学会総会 .ランチョンセミナー 3 . 大阪市, 大阪国際会議場 2015/05/14

竹山 旭, 松下 巧, 辻 要, 吉田博昭, 森田章介: CD117 と CD66a を用いた唾液腺幹細胞の同定. 第 69 回日本口腔科学会学術集会, 大阪市, 大阪国際会議場 2015/05/14

竹山 旭, 松下 巧, 辻 要, 吉田博昭, 森田章介: CD117 と CD66a を用いた唾液腺構成細胞の分離. 第 26 回口腔科学会近畿地方部会, 京都市, 京都大学百周年時計台記念館 2014/12/06

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉田 博昭 (YOSHIDA, Hiroaki)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号 : 40260624

(2)研究分担者

森田 章介 (MORITA, Shosuke)
大阪歯科大学・歯学部・教授
研究者番号 : 90148461

辻 要 (TSUJI, Kaname)
大阪歯科大学・歯学部・助教
研究者番号 : 80632083
(削除 : 平成 28 年 6 月 20 日)

(4)研究協力者

松下 巧 (MATSUSHITA, Takumi)
大阪歯科大学・歯学部・大学院生