

機関番号：11301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792154

研究課題名 (和文) 口腔乾燥症の治療を目指した唾液腺分岐促進法の開発

研究課題名 (英文) Promotion of the salivary glands branching for treatment of dry mouth

研究代表者

福本 恵美子 (FUKUMOTO EMIKO)

東北大学・病院・助教

研究者番号：10264251

研究成果の概要 (和文)：

PDGF による唾液腺分岐促進は、細胞間のカルシウムや IP3 の輸送に係わるギャップ結合の阻害剤により完全に抑制された。また、PDGF 刺激により唾液腺の間葉組織における FGF7 および FGF10 の発現が誘導され、MAPK 経路の解析を試みた。その結果、発生唾液腺への PDGF 刺激により ERK1/2 のリン酸化が認められ、唾液腺分岐が促進されたことから、上皮細胞における MAPK 経路の活性化が、唾液腺分岐に関与していることが示唆された。ギャップ結合分子 Cx43 の欠損マウスの解析により、遺伝子欠損マウスでは唾液腺の分岐形成が著しく阻害されていることが判明した。

研究成果の概要 (英文)：

GAP junction Inhibitor related to calcium and IP3 transport inhibit the PDGF -mediated salivary glands branching. PDGF induced FGF7 and FGF10 expression in mesenchymal tissue of salivary glands. We analyzed about the MAPK pathway. PDGF induced phosphorylation of ERK1/2 in developing salivary glands. It indicates that activation of MAPK pathway on epithelial cells involves the branching of salivary glands. In Cx43 knockout mice, branching of salivary gland was inhibited compared with control mice, indicating that Cx43 may be important for salivary gland morphogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：予防歯科学、唾液腺、発生、口腔乾燥症

## 1. 研究開始当初の背景

唾液腺に関連した疾患においては、口腔内の症状として口腔乾燥 (ドライマウス) を呈し、(1) 食事や嚥下困難、(2) う蝕や歯周病の進行を助長し、(3) 口臭の一因となり、

(4) 口腔を介した感染症の誘発を引き起こす。これらの治療に関しては、唾液分泌を促進する薬剤を応用したり、人工唾液などを用いた代替療法が中心となっている。

これらドライマウスの原因は、加齢にともなった唾液腺萎縮による機能低下、薬剤によ

る唾液の分泌低下、自己免疫疾患に関連したものなどが挙げられる。これら原因を根本的に改善するためには、機能的な唾液腺の再生や賦活化をおこなうことが有効であると考えられるが、現状では不可能といわざるを得ない。そこで、我々は唾液腺器官培養系を用いて、分岐形成に重要な因子の同定をおこい、さらには、個々の因子について、その分子シグナルの解明や、創薬開発のための基礎基盤の確立を行う。

## 2. 研究の目的

本研究では、従来から実施してきた(1)PDGFにおける唾液腺分岐形成メカニズムについて詳細な解析を行うとともに、(2)唾液腺特異的に発現する遺伝子を同定し、その分子メカニズムを明らかにする(PDGFで行ってきた解析と同様の手法を応用)。これらの知見を応用し、唾液腺の分岐促進をめざした、口腔乾燥症治療法開発のために基盤構築を行う。

PDGFは、現在までA-Dの4種類の遺伝子が報告され、その組み合わせにより複数の分子種が存在する。例えばPDGF-AとPDGF-Bの組み合わせから、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BBが増殖因子として細胞に作用する。PDGF-AAおよびPDGF-BBを唾液腺の器官培養系に添加した結果、唾液腺の分岐形成が促進され、逆にPDGF-AあるいはPDGF-B遺伝子の発現抑制を行うsiRNAの導入により、逆に分岐形成が著しく抑制された。このことから、PDGFが唾液腺の形成促進や、再生療法へ応用可能な分子ターゲットとなった。そこで、このPDGFにおける分岐形成促進作用について、どのようなメカニズムで分岐が誘導されるかを検討する。現時点では、PDGFが唾液腺の間葉組織においてFGF7やFGF10の発現を誘導することから、これら分子の誘導メカニズムを明らかにするとともに、FGFファミリー以外の分子種に関しても、その同定と機能解析を実施する。

一方、PDGFのみならず他の分子も同様の作用を有する可能性が示唆される。そこで、オーラルゲノムプロジェクトで実施してきた手法を唾液腺研究に応用し、唾液腺器官培養における24時間、48時間において発現変化の認められる分子を、包括的にスクリーニングし、PDGFと同様の解析へと発展させる。

近年、遺伝子発現後の負の調節因子として、microRNA(miRNA)の機能が報告されてきた。これは、転写されたmRNAの3'末端の非翻訳領域に結合し、そのmRNAの蛋白質への翻訳を抑制するものである。したがって、固有の蛋白質発現に関してはシグナル分子や転写因子によるmRNAと、miRNAによる負の調節とのバランスで行われている。またmiRNAの機能調節は約20塩基程度の外来性に添加した核酸で制御可

能であるため、miRNAをターゲットとした遺伝子発現調整は、直接創薬へと応用可能な核酸製剤となりうる。したがって、唾液腺分岐形成過程におけるmiRNAの発現解析も、同時に行う予定である。

唾液腺の発生および再生研究は、他の組織に比較して十分行われていない。その理由として、器官培養法などの実験が、ごく限られた研究室でしか行われていないためである。しかしながら、加齢に伴う口腔内症状の大部分は、唾液腺の機能低下によるものであり、う蝕や歯周病との関連も極めて高い。唾液腺の分岐形成促進メカニズムの解明と、その促進効果を臨床へ応用した場合の波及効果は大きく、他の腺組織の機能改善にも応用可能である。

したがって、本研究で得られた知見は、広く他の組織発生の理解や、再生療法へと相互に応用可能となるであろう。さらに、本研究の成果は、同定された増殖因子や、遺伝子発現制御に関わる核酸(siRNA等)を口腔用軟膏などに含有させることで直接臨床応用可能であり、口腔乾燥やドライアイに罹患した患者に対する画期的な治療法へと発展させることが可能となる。

## 3. 研究の方法(実施計画当初)

### (1) PDGF 添加による遺伝子発現変化の検討

PDGF-AA および PDGF-BB を唾液腺の期間培養系に添加することで、その分岐を促進することを明らかにした。そこで、PDGF 添加によって生じる唾液腺での遺伝子発現の変化について、cDNA マイクロアレーを用いた解析を行う。同定された分子については、マウス胎生 13-17 日における唾液腺発生過程においての分子発現につき、in situ hybridization 法あるいは、免疫組織学的な解析を行う。

### (2) PDGF による FGF 発現制御に関わる分子シグナルの同定

PDGF 刺激により、唾液腺の間葉組織における FGF7 および FGF10 の発現が誘導されることを見出した。これは従来から頭部神経堤細胞(唾液腺上皮の周囲に集積する)のマーカーとして同定されていた PDGF 受容体を介したものであることが示唆される。しかしながら、PDGF 受容体を介したシグナル伝達が、どのようにして FGF7 および FGF10 の発現に関わっているか未だ不明である。そこで、本項目では、PDGF 受容体を介したシグナルの同定と、転写レベルでの FGF7 および FGF10 の発現制御機構の解明を目的とする。PDGF 刺激による細胞内のリン酸化酵素の活性化を指標とし、リン

酸化分子の包括的なスクリーニング（リン酸化蛋白を対象としたプロテインアレー）をもちいて、候補シグナルの同定を行う。すでに、既知の MAPK 経路に関しては、解析済みである。

### （3）新規唾液腺分岐促進および抑制因子の同定

唾液腺の期間培養系を用いて、培養 48 時間以内に発現変化の認められる分子について、その同定を試みる。また、発現量の少ない転写因子等については、マイクロアレーによるスクリーニングで検索が困難であることもありえるため、サブトラクションなどを用いた方法も同時に行う。前述の miRNA に関しては、直接創薬として応用可能であり、抑制系因子の解除を期待した唾液腺分岐形成を誘導する可能性が示唆される。そこで、miRNA の抽出と、miRNA アレーを用いた発現解析も同時に行う。

## 4. 研究成果

### （1）PDGF 添加による唾液腺分岐形成促進メカニズムの解明

PDGF-AA および PDGF-BB を唾液腺の器官培養系に添加することで、その分岐を促進した。この分岐促進は、細胞間のカルシウムや IP3 の輸送に係わるギャップ結合の阻害剤により完全に抑制された。これは上皮細胞における FGF 受容体の活性化の抑制に起因することが判明した。

### （2）PDGF による FGF 発現制御に関わる分子シグナルの同定

PDGF 刺激により、唾液腺の間葉組織における FGF7 および FGF10 の発現が誘導され、従来から頭部神経堤細胞（唾液腺上皮の周囲に集積する）のマーカーとして同定されていた PDGF 受容体を介したものであることが示唆された。次に我々は、PDGF 受容体を介したシグナルの同定と、転写レベルでの FGF7 および FGF10 の発現制御機構を解明するために、MAPK 経路の解析を試みた。その結果、発生唾液腺への PDGF 刺激により ERK1/2 のリン酸化が認められ、唾液腺分岐が促進されたことから、上皮細胞における MAPK 経路の活性化が、唾液腺分岐に関与していることが示唆された。

### （3）包括的な遺伝子スクリーニングによる Cx43 の同定

唾液腺の形成過程において、細胞間結合に関

わる分子であるギャップ結合分子 Cx43 が発現していることが明らかとなった。免疫染色による発現解析を行った結果、本分子は発生過程の上皮に特異的に発現していることが明らかとなった。

### （4）ギャップ結合分子の唾液腺分岐形成に及ぼす役割解明

唾液腺の器官培養に、ギャップ結合の機能的な阻害剤である Oleamide を添加し、分岐形成に及ぼす影響を検討した。その結果、PDGF により誘導される分岐形成を、Oleamide が完全に抑制することが明らかとなった。さらに、Oleamide 処理による、PDGF 誘導性の FGF の発現を確認した結果、間葉組織における FGF7 および FGF10 の発現には影響を及ぼしていないことが分かった。さらにこれら FGF による上皮での MAPK の活性化について確認した結果、Oleamide 処理により、FGF による上皮の MAPK の活性化が抑制されていることが判明した。このことから、ギャップ結合は、上皮細胞における間葉からの FGF シグナルを制御し、分岐形成を制御していることが判明した。

### （5）Cx43 欠損マウスにおける唾液腺形成の評価

ギャップ結合蛋白の 1 つである Cx43 の唾液腺形成における役割を明らかにする目的で、Cx43 欠損マウスにおける唾液腺の表現系解析を行った。その結果、Cx43 欠損マウスでは、唾液腺が小さく、分岐形成が抑制されていることが明らかとなった。

以上の結果から、唾液腺上皮における細胞間結合は、唾液腺分岐形成に重要であり、この細胞間結合を活性化する薬剤は、直接唾液腺の再生を促進、あるいは他の増殖因子の作用を増強させる効果があると予想された。

## 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 3 件）

1. Iwamoto T, Yamada A, Arakaki M, Sugawara Y, Ono M, Futaki M, Yoshizaki K, Fukumoto E, Nakamura T, Fukumoto S. Expression and functions of neurotrophic factors in tooth development. J Oral Biosci. 査読有、53(1)、2011、13-21.
2. Iwamoto T, Yamada A, Yuasa K, Fukumoto E, Nakamura T, Fujiwara T, Fukumoto S. Influences of interferon-gamma on cell proliferation and interleukin-6 production in Down syndrome derived

fibroblasts. 、査読有、54(10)、2009、  
963-969

3. Sonoda A, Iwamoto T, Nakamura T, Fukumoto E, Yoshizaki K, Yamada A, Arakaki M, Harada H, Nonaka K, Nakamura S, Yamada Y, Fukumoto S、Critical role of heparin binding domains of ameloblastin for dental epithelium cell adhesion and ameloblastoma proliferation. 査読有、284(40)、2009、176-184

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福本 恵美子 (FUKUMOTO EMIKO)  
東北大学・病院・助教  
研究者番号：10264251

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：