

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462814

研究課題名(和文) 唾液腺再生の分子機構の解明～口腔乾燥症等の再生医療への応用を目指して～

研究課題名(英文) Elucidation of Molecular Mechanism of the Salivary Gland Regeneration ~ Toward the application to the Regenerative Medicine for Xerostomia ~

研究代表者

赤松 徹也 (Akamatsu, Tetsuya)

徳島大学・大学院生物資源産業学研究部・准教授

研究者番号：80294700

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： 唾液腺再生の分子機構解明のため、ラット顎下腺主導管結紮・再開放系を用いた。主導管結紮により顎下腺は萎縮し、唾液分泌に関わる水チャネルAQP5発現は減少するが、PACE4発現は著しく誘導された。結紮1週間後に再開放し、更に2,4週間後に解析すると、雄性ラットでは再開放による顎下腺サイズ・重量の回復は不十分だが、AQP5発現の回復とPACE4発現の減少が認められた。雌性ラットでもAQP5発現の回復は認められ、雄性ラットより優位に顎下腺サイズ・重量が回復した。この雌雄差は一部、卵巣摘出ラットを用いた解析から発現パターンの変動が雄性ラット同様になることを見出している。

研究成果の概要(英文)： Ligation and re-opening of the main excrete duct of submandibular gland is used as regeneration model of salivary gland.

No change was observed in the contralateral glands of ligated rats, while the atrophy and weight decrease of ligated gland was observed. These changes were also observed in the re-opening group, but the recovery of gland weight was significantly observed in female rats than male rats. By Western blotting, the induction and changes of expressions of PACE4 and AQP5 were observed in the ligated glands, but not in the contralateral glands. In male rats, inverse correlation of the expression levels of PACE4 and AQP5 was observed, but not in female rats. Although it is still preliminary, we found the induction and changes of expressions of PACE4 and AQP5 in the ligated glands of ovariectomized rats seemed to be like male rats, suggesting the involvement of sex hormone in sexual difference of the salivary gland regeneration.

研究分野：生理学・口腔生理学

キーワード：顎下腺 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 AQP5 雌雄差

1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまでにラット唾液腺発生過程において、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前駆体蛋白質変換酵素の一つである PACE4 が時期・空間特異的に発現し、唾液腺腺房細胞や導管細胞の分化・成熟と密接に関わり、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可能性があることを報告した (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の解析から、唾液の分泌量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)。また、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た (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 AQPs 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)。加えて、ラット胎仔顎下腺器官培養系を用いて、前述の PACE4 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 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・成熟すると考えられているが、詳細は依然不明である。申請者らは、ヒト唾液腺介在部導管細胞由来細胞株 HSG 細胞を用いた腺房細胞分化誘導系を用いた解析から、前述の PACE4、AQP5、転写因子等の関係についての知見を得ているが全容解明には至っていない。

一方、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後、導管細胞が増殖・分化して腺房細胞が再生することが知られているが、その分子メカニズムも未解明である。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 はマウス正常唾液腺では介在部導管細胞でのみ発現し、唾液腺腺房細胞分化誘導時に重要な役割を果たすことが期待されるが、ヒトやラットでは存在しない。最近、我々はラット唾液腺主導管結紮-再開放実験において、結紮側でのみ前述の PACE4 の発現が著しく誘導されることを見出している。

2. 研究の目的

口腔乾燥症は唾液分泌低下に起因するが、老化以外にも、頭頸部癌に対する放射線照射や自己免疫疾患、あるいは薬物副作用等で発症する。しかし、発症機構も不明なら、治療法も人工唾液等対症療法のみである。唾液分泌低下は、口腔内環境を悪化させ、誤嚥性肺炎等の各種感染症とも関係することから、原因解明・治療法確立は臨床上も非常に重要である。

唾液は唾液腺腺房細胞から産生・分泌され、この腺房細胞の異常・萎縮・死滅等が唾液分泌低下に直結する。唾液腺の腺房細胞は介在部導管細胞より発生・再生すると考えられているが、詳細は不明である。本研究では、口腔乾燥症を含めた唾液腺機能の障害・喪失等に対する再生医療を考える上で重要となる、唾液腺再生の分子機構について、唾液腺主導管結紮により誘起される再生モデルを用いて解析する。

3. 研究の方法

7週齢雄性SDラットを深麻酔下で、外科的に注意深く右側顎下腺主導管を結紮する。左側は非結紮の対照(CL)とする。また、未施術ラット顎下腺もコントロール(C)として比較する。結紮3,5週間後(L3,L5),および、結紮1週間後に再開放し、更に2,4週間後(L1O2,L1O4)に各々顎下腺を摘出する。摘出時にはまず外観を写真撮影により記録する。摘出後は腺重量を測定し、必要に応じて顎下腺組織を分割し、蛋白質調製(ウェスタンブロット分析),核酸調製(RT-PCR),組織標本作製(免疫組織化学)等に用いる。唾液腺は特にげっ歯類では雌雄差があることから、雌性ラットにおいても同様に解析する。

ウェスタンブロット分析ではPACE4,AQP5を中心に発現量の変化について解析する。免疫組織化学は適宜、免疫蛍光法,ABC法により行い、PACE4,AQP5の局在変化等を解析し、相関関係等について検討する。また、主導管結紮時(あるいは一定時間後)に、アテロコラーゲンを主成分とした局所投与方法により、PACE4に特異的なsiRNA(Akamatsu T. *et al.*, Dev. Biol. 325, 434-443, 2009)を投与し(*in vivo* RNAi実験),PACE4の発現を抑制した場合の影響を前述の方法により解析する。

4. 研究成果

まず、雄性ラットでは対照群(CL)の変化はなく、結紮群(L3,L5)では顎下腺の萎縮と腺重量の減少が、結紮期間に応じて認められた。再開放群(L1O2,L1O4)では若干の腺重量の回復は認められたが、十分ではなかった。ウェスタンブロット分析の結果、結紮群ではAQP5発現の減少とPACE4発現の誘導を確認したが、再開放群でのPACE4発現レベルはAQP5発現レベルの回復度に依存し、AQP5発現が十分回復した場合にPACE4発現は減少・消失するが、回復が不十分な場合にはPACE4発現は引続き継続する、逆相関関係が認められ、PACE4発現レベルと機能回復との関連性が示唆された。

一方、雌性ラットでも対照群(CL)の変化はなく、結紮群(L3,L5)での顎下腺の萎縮と腺重量の減少は認められたが、結紮期間での差はあまり認められなかった。しかし、再開放群(L1O2,L1O4)では、依然完全ではないものの、雄性ラットより明らかに優位に腺重量の回復が認められた。ウェスタンブロット分析の結果は雄性ラットほど、PACE4発現とAQP5発現の間に顕著な逆相関関係は認められなかったが、基本的にPACE4発現レベルと機能回復との関連性は示唆された。また、これらのPACE4発現の誘導・変動は雌雄共にコントロール群(C)では全く認められなかった。

in vivo RNAi実験も試みたが、成獣ラットの場合、現時点で十分な効果が認められず、投与方法・部位等、今後課題を残した。代わりに、唾液腺再生における雌雄差については、口腔乾燥症を発症するシェーグレン症候群が女性優位に発症することから、そのメカニズム解明の糸口になる可能性もあり、一部、予備実験的に卵巣摘出群を用いた解析に着手した。その結果、卵巣摘出群(oxL1O2,

oxL1O4)の腺重量の変化は、雌性ラットより雄性ラットに近い傾向にあり、ウェスタンブロット分析でも卵巣摘出群では雄性ラット同様の逆相関関係が示唆され、本唾液腺再生過程で見られる雌雄差は性ホルモン、特に雌性ホルモンの影響が考えられた。今後、この雌雄差について詳細に解析する予定である。

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 6件)

赤松徹也、姚陳娟、長谷川敬展、吉村弘；唾液腺再生過程で見られる雌雄差について、J. Oral Biosci. Suppl. 2016, p451. (査読無)

嶋谷達哉、嶺岸誠、赤松徹也、姚陳娟、長谷川敬展、吉村弘；唾液腺再生モデルにおけるサチライシン様前駆体蛋白質変換酵素 PACE4 の発現誘導-Part II- , J. Oral Biosci. Suppl. 2016, p415. (査読無)

赤松徹也；唾液腺の構造と機能, J Oral Health & Biosci 28(2): 77-86, 2016. (査読有)

赤松徹也；基礎系教育講演-唾液腺の構造と機能, J Oral Health & Biosci 28(2): 97, 2016. (査読無)

嶺岸誠、赤松徹也、姚陳娟、長谷川敬展、吉村弘；唾液腺再生モデルにおけるサチライシン様前駆体蛋白質変換酵素の発現誘導, J. Oral Biosci. Suppl. 2014, p138. (査読無)

姚陳娟、赤松徹也、長谷川敬展、吉村弘；唾液腺再生モデルにおける水チャンネル AQP5 の発現, J. Oral Biosci. Suppl. 2014, p204. (査読無)

[学会発表](計 9件)

Tetsuya Akamatsu, Chenjuan Yao, Takahiro Hasegawa, and Hiroshi Yoshimura. Sexual difference in the regeneration model of the rat submandibular gland. The 4th International Symposium on Salivary Glands in Honor of Niels Stensen, 2016.11.30-12.2, Okazaki (Japan).

Chenjuan Yao, Tetsuya Akamatsu, Takahiro Hasegawa, and Hiroshi Yoshimura. Induced expression of a subtilisin-like proprotein convertase PACE4 in the regeneration model of rat submandibular gland. The 4th International Symposium on Salivary Glands in Honor of Niels Stensen, 2016.11.30-12.2, Okazaki (Japan).

赤松徹也、姚陳娟、長谷川敬展、吉村弘；唾液腺再生過程で見られる雌雄差について、第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016 年 8 月 24-26 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

嶋谷達哉、嶺岸誠、赤松徹也、姚陳娟、長谷川敬展、吉村弘；唾液腺再生モデルにおけるサチライシン様前駆体蛋白質変換酵素 PACE4 の発現誘導-Part II- ,第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016 年 8 月 24-26 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

赤松徹也；基礎系教育講演-唾液腺の構造と機能,第 47 回四国歯学会例会(徳島),2015 年 6 月 25 日、徳島大学歯学部(徳島県・徳島市)

Tetsuya Akamatsu, Chenjuan Yao, Takahiro Hasegawa, and Hiroshi Yoshimura. Salivary Gland Development, Differentiation, and Regeneration - Role of Subtilisin-like Proprotein Convertase PACE4/SPC4. BIT's 1st Annual World Congress of Oral & Dental Medicine,

2014.11.13-16, Haikou (China)

Chenjuan Yao, Tetsuya Akamatsu, Takahiro Hasegawa, and Hiroshi Yoshimura. The Defense System of Oral Cavity: Lipopolysaccharide Induced Inflammatory Response in the Mice Salivary Gland. BIT's 1st Annual World Congress of Oral & Dental Medicine, 2014.11.13-16, Haikou (China)

嶺岸誠, 赤松徹也, 姚陳娟, 長谷川敬展, 吉村弘; 唾液腺再生モデルにおけるサチライシン様前駆体蛋白質変換酵素の発現誘導, 第56回歯科基礎医学会, 2014年9月25-27日, 福岡国際会議場(福岡県, 福岡市)

姚陳娟, 赤松徹也, 長谷川敬展, 吉村弘; 唾液腺再生モデルにおける水チャネル AQP5 の発現, 第56回歯科基礎医学会, 2014年9月25-27日, 福岡国際会議場(福岡県, 福岡市)

〔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

赤松 徹也 (AKAMATSU, Tetsuya)
徳島大学・大学院生物資源産業学研究所・
准教授
研究者番号: 80294700

(2) 研究分担者

姚 陳娟 (YAO, Chenjuan)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学
系)・助教
研究者番号: 20432750

吉村 弘 (YOSHIMURA, Hiroshi)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学
系)・教授
研究者番号: 90288845

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()