

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20564

研究課題名(和文) 頭頸部癌治療後における唾液分泌機能亢進因子の検索

研究課題名(英文) Search for salivary secretion enhancing factor after head and neck cancer treatment

研究代表者

横山 愛 (YOKOYAMA, Megumi)

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号：70610252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：唾液腺の代償性メカニズムを解明することを目的とした本研究では、非傷害側の唾液腺は傷害側の唾液腺から何らかの影響を受けていることが推察され、そのシグナルは幹細胞を増加させるものではなく、細胞増殖を亢進させるものであることが示唆された。傷害側と非傷害側の唾液腺を用いてマイクロアレイで遺伝子発現変化を網羅的に解析したところ、唾液分泌機能促進因子としてはEgfrやBmpなどがその候補となることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study aiming to clarify the compensatory mechanism of the salivary glands, it is assumed that there are some kinds of signal pathway to the non-injured side from the injured side. The signal dose not increase the number of stem cell but increase the cell proliferation. Egfr and Bmp were considered factor that enhance salivary secretory function by microarray analysis.

研究分野：口腔生理学

キーワード：唾液腺 唾液分泌機能亢進 唾液腺傷害 細胞間情報伝達

## 1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌に罹患する患者数は年々増加している。口腔癌の治療法としては、手術治療、放射線治療、薬物療法などがあるが、これらを単独で行うのではなく組み合わせた治療を行うことが多い。唾液腺は頭頸部に分布する唾液を分泌する器官である。手術療法による唾液腺の切除、放射線療法による唾液腺への傷害、抗腫瘍薬による影響からどの治療法を選択しても口腔粘膜炎や味覚障害、口腔乾燥などの口腔合併症を発症する。これらは唾液分泌量の低下に伴い生じる。現時点での唾液分泌量低下に対する治療法としては人口唾液や水分補給などの対症療法が主である。口腔癌患者の5年生存率は他の癌と比較して高値を示すことから、患者の術後の生活の質を向上させるためにも唾液腺の分泌機能を回復させることは口腔内環境の維持にとっても重要である。

唾液腺は唾液を産生する腺房細胞と産生された唾液の通り道である導管から構成される。放射線照射や排泄導管の結紮により唾液腺に傷害が起こると、唾液を分泌する腺房細胞の萎縮やアポトーシスにより、腺房細胞数が減少し唾液分泌量が減少する。しかし、放射線や結紮の傷害が片側のみであれば、反対側の唾液腺が傷害された唾液腺の機能を補うといわれている。これまでに申請者らは、耳下腺の片側に排泄導管結紮による傷害を加えると唾液腺の幹細胞マーカーと言われる cytokeratin 5 (CK5) のタンパク質発現量が傷害側で増加し、続いて非傷害側の耳下腺においてもこのタンパク質の発現量が増加するという結果を得た。このことから、左右の唾液腺はなんらかの方法で連絡を取り合っていることが考えられる。傷害された唾液腺と反対側の非傷害側の唾液腺の間ではどのようなことが分子レベルで起こり、非傷害側の唾液腺の唾液分泌機能が亢進するのかを解明することで、頭頸部癌治療後における問題を根本的に解決できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

頭頸部癌の治療後の問題として、唾液分泌量の低下がある。唾液腺の腺房細胞が唾液分泌機能を担うが、この腺房細胞がダメージを受けると分泌能が低下する。大唾液腺は左右に1対ずつ存在し、各々が神経支配も異なる独立したものである。それにも関わらず、一方の唾液腺が傷害を受けると、反対側の唾液腺が減少した唾液分泌量を補うといわれている。報告の多くは臨床報告であり、この現象の詳細を述べた研究は無い。傷害側から非傷害側への情報伝達経路としては、血液を介した経路と神経を介した経路が考えられる。本研究では、血液を介した経路に焦点を絞り研究を進める。片側に傷害を受けた唾液腺と反対側の唾液腺間にはどのような情報伝達機構が存在するのか、そのメカニズムを解明

し、唾液分泌機能亢進因子を同定することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

野生型マウス(オス)を用いて、深麻酔下で片側耳下腺排泄導管をマイクロクリップにて結紮し、これを傷害とした。傷害側、非傷害側、コントロールの唾液腺を使用して研究を行った。

### (1) 片側唾液腺傷害時における非傷害側の唾液腺の重量変化

結紮後 4、7 日目に再度深麻酔下にて両側耳下腺を摘出した。その後、直ちに耳下腺の重量を測定した。全ての作業は実体顕微鏡を使用し、クリップ装着時には隣接して並走している血管や神経と一緒に固定しないように確認し、摘出時には可能な限り結合組織の除去を行った。

### (2) 形態学的変化

片側耳下腺結紮後 4、7 日目に摘出した耳下腺を 10%ホルマリン PBS で浸漬固定し組織切片を作製した。その後、通法に従いヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施した。

### (3) 細胞増殖能

作製した組織切片を用いて、抗 Ki67 抗体を使用し免疫組織化学染色を行った。1 標本に対して 400 倍率での顕微鏡観察下、3 視野において陽性細胞数と陰性細胞数をカウントし陽性細胞の割合を算出した。

### (4) 幹細胞マーカーCK5 のタンパク質発現

摘出した耳下腺を lysis buffer にてホモジナイズしタンパク質濃度を測定後、結紮側および非結紮側では 10  $\mu$ g、コントロールでは 20  $\mu$ gにおける CK5 の発現量をウエスタンブロット法にて検討した。

### (5) 遺伝子発現の変化

摘出した耳下腺から mRNA の抽出を行い、Whole Mouse Genome オリゴDNA マイクロアレイ (Agilent Technologies) を使用して遺伝子発現解析を行った。得られたデータは、GeneSpring (Agilent Technologies) で発現解析を行った。コントロールと比較して、結紮側で発現量が 2 倍以上の遺伝子、コントロールと比較して非結紮側で発現量が 2 倍以上の遺伝子を抽出し、結紮側でリガンド、非結紮側ではそのリガンドに対するレセプターの関係にある遺伝子の抽出を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 片側唾液腺傷害時における非傷害側の唾液腺の重量変化

結紮後 4、7 日目ともに耳下腺の重量は結紮側、非結紮側、コントロールの順で重かった。結紮側の重量が一番軽くなるのは予測できたが、非結紮側とコントロールを比較する

と非結紮側の耳下腺が軽くなる傾向にあった(表1)。

表1. 耳下腺の重量変化

	結紮側	非結紮側	コントロール
4日目	6.3(±0.6)	10.6(±1.1)	16.2(±1.3)
7日目	6.0(±1.1)	11.0(±1.7)	12.0(±1.2)

(単位:mg)

## (2) 形態学的変化

傷害時の唾液腺の変化を観察するためにHE染色を行った。結紮側の唾液腺では、腺房細胞が委縮して小さくなり導管様の構造を示す組織像が観察されたが、非結紮側とコントロールではその構造に変化は無かった(図1)。

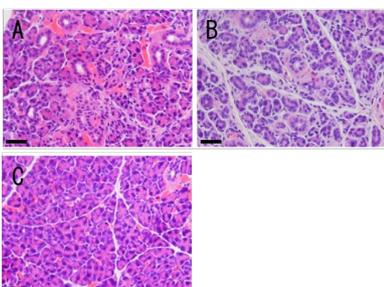


図1. 結紮による形態学的変化

A: 傷害側(4日目) B: 結紮側(7日目)  
C: 非結紮側(7日目)

## (3) 細胞増殖能

非傷害側の唾液腺が唾液分泌量を増やす方法としては、細胞が増殖することが考えられる。従って、細胞の増殖能を判定する抗Ki67抗体による免疫組織化学染色を行った。陽性細胞率は結紮後4日目では、結紮側で最も高く、非結紮側、コントロールの順であったが、非結紮側とコントロールでは陽性細胞率にほとんど差は無かった。結紮7日目では、4日目と同様に結紮側で最も高値を示し、非結紮側、コントロールの順であった。しかし、非結紮側の陽性細胞率はコントロールと比較して有意に高値を示した。このことから、非結紮側の唾液腺が細胞増殖能を増加させるような因子の影響を受け取っていることが考えられた。

## (4) 幹細胞マーカーCK5のタンパク質発現

増殖能がコントロールと比較して非結紮側で高値を示したことから、次に幹細胞が増えているのかを検討した。この結果、CK5のタンパク質発現量はコントロールと比較して非結紮側で増加が認められなかった。このことから非結紮側で唾液分泌が亢進する因子は幹細胞を増加させるものではないことが示唆された。

## (5) 遺伝子発現解析

遺伝子発現の変化を検討するにあたり、細胞増殖能を比較した実験において結紮7日目のコントロールと非結紮側の唾液腺で差が観察されたことから、結紮7日目のサンプルで検討することとした。マイクロアレイの結果を解析したところ、コントロールと比較して結紮側で2倍以上発現が増加している遺伝子は4,821遺伝子、コントロールと比較して非結紮側で2倍以上発現量が増加している遺伝子は1,040遺伝子あり、結紮側と非結紮側のどちらにおいても増加している共通遺伝子は473遺伝子であった。結紮側でリガンド、非結紮側でレセプターの関係にあるものを抽出したところ、Fgfr、Bmpが候補となった。

これらのことから、片側唾液腺傷害時には非傷害側で細胞増殖能が上昇し、唾液分泌量が増加することが考えられ、傷害側の耳下腺からFgfrやBmpが放出され、非傷害側の唾液腺でこのシグナルを受け取ることが予測された。Egfrは細胞の増殖や成長を制御する因子であり、Bmpは骨形成因子として知られているが、初期発生の調節因子としても役割があることが報告されている。これらの因子が唾液腺分泌機能を亢進する因子の一つであることが本研究で推察された。

## 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)

Expression of a neural stem/progenitor cell marker Nestin in salivary glands. (2017) Yokoyama M, Katsumata-Kato O, Sakurai H, Ogawa H, Fujita-Yosigaki J. *MOJ Anat & Physiol* (査読有り) DOI: 10.15406/mojap. 2017.04.00133

Expression of the Stem Cell Marker Nestin in Response to Tissue Injuries of Parotid Acinar Cells. (2017) Yokoyama M, Ogawa H, Katsumata-Kato O, Fujita-Yoshigaki J. *Int J Oral-Med Sci*, 15: 93-97 (査読有り)

[学会発表](計5件)

片側唾液腺傷害時における非傷害側唾液腺の検討: 横山愛, 加藤治, 吉垣純子, 日本大学女性研究者交流シンポジウム, 2017年11月10日, 日本大学(千葉県習志野市)

片側唾液腺傷害による反対側唾液腺への影響: 横山愛, 加藤治, 吉垣純子, 第59回歯科基礎医学会学術大会 2017年9月18日, 松本歯科大学(長野県塩尻市)

傷害側唾液腺と非傷害側唾液腺における

相互作用：横山愛，加藤治，吉垣純子，第 58 回歯科基礎医学会学術大会，2016 年 8 月 26 日，札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

唾液腺傷害後における非傷害側の nestin の発現：横山愛，加藤治，吉垣純子，第 60 回日本唾液腺学会学術集会，2015 年 12 月 5 日，文京学院大学（東京都文京区）

唾液腺傷害時と回復時における前駆細胞マーカーの発現：横山愛，加藤治，吉垣純子，第 57 回歯科基礎医学会学術大会，2015 年 9 月 13 日，朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター（新潟県新潟市）

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

横山 愛（YOKOYAMA, Megumi）

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号：70610252