

令和元年6月13日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11751

研究課題名(和文) 発生期の上皮間葉相互作用を再現したiPS細胞の分化誘導法と唾液腺再生医療の開発

研究課題名(英文) The inducing differentiation of iPS cells and salivary gland regeneration that reproduces the epithelial-mesenchymal interaction in initiation stage

研究代表者

山村 佳子 (YAMAMURA, Yoshiko)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：00581406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの顎下腺をチタンクリップで結紮し、顎下腺結紮モデルマウスを作成した。マイクロアレイ解析にて、非結紮顎下腺に比較して24時間結紮した顎下腺で4倍以上発現が上昇した15 miRNAおよび103遺伝子が同定された。miR-710では、カットオフ値2.5倍以上で、Clip4とIer 5が挙げられた。免疫組織学的染色では、Ier 5は腺房細胞に局在しており、24時間結紮すると発現が増加していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果より、Clip 4やIer 5は唾液腺の萎縮に関与している可能性が示唆された。この成果は唾液腺組織再生の研究にも貢献できると考える。さらに、臨床研究へ誘導できる重要な基礎研究として位置づけられ、“唾液分泌低下の改善”という患者のQOL向上が期待できるだけでなく、唾液腺疾患への治療応用へも可能性を秘めていると考える。

研究成果の概要(英文)： The submandibular duct of C57BL/6JJcl mice were ligated with titanium clips. The microarray analysis showed that the expressions of 103 genes and 15 miRNAs of duct ligation group were increased 4 times more than those of non-duct ligation group. The target genes of candidate miR-710 were Clip 4 and Ier 5 (cut-off value : 2.5 fold change). The expression of Ier 5 was localized in not duct cells but acinar cells. And these were increased the 24 hours ligation as compared with untreated.

研究分野：口腔外科学分野

キーワード：唾液腺 再生 マイクロアレイ解析

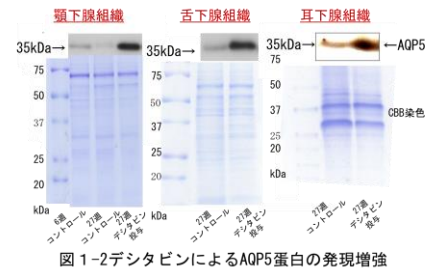
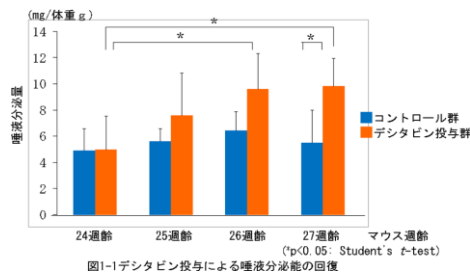
様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

唾液の分泌量は年齢とともに減少して口腔乾燥が生じるが、この口腔乾燥は口腔内の不快感だけでなく、齲蝕や歯周病、口臭、口腔粘膜炎、舌痛症、嚥下障害、構音障害など様々な障害を引き起こす。その原因は加齢だけではなく、唾液腺の炎症や腫瘍、薬剤の副作用、Sjögren 症候群などの全身疾患、ストレスなど様々である。また、頭頸部領域の悪性腫瘍に対する放射線治療では口腔乾燥は必発である。

65 歳以上の成人の約 30%に口腔乾燥が認められるという報告 (Ship JA: J Am Geriatr Soc; 2002) もあることから深刻な社会問題であるが、現在の治療法は人工唾液や唾液腺マッサージ、口腔乾燥症状改善薬の内服などの対症療法のみであり、有効な治療法はないのが現状である。

われわれは、これまでに唾液腺腺房細胞に発現している水輸送膜蛋白 Aquaporin (AQP) 5 の発現低下によって唾液の分泌量が減少すること、AQP5 の発現低下がプロモーター領域のメチル化によって誘導されること、DNA 脱メチル化剤 (デシタビン) の投与が加齢マウスの唾液分泌低下を改善することを明らかにしてきた (Yamamura Y: J Dent Res; 2012) (図 1)。



現在、DNA 脱メチル化剤は骨髄異形成症候群の治療薬として臨床応用されているが、強い骨髄抑制が問題となり、口腔乾燥の新規治療薬としては大きな障害となることが予想される。そこで、これまでの研究をもとに、口腔乾燥に対する新たな戦略として iPS 細胞を用いた唾液腺の再生医療を目指し、口腔乾燥改善に有効な治療法としての可能性を探ることとした。

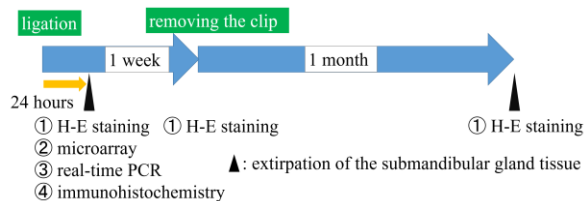
### 2. 研究の目的

本研究では、低下した唾液腺機能を回復させるために iPS 細胞を用いた唾液腺組織の再生医療を目指し、口腔乾燥改善に有効な治療法としての可能性を探ることを目的とした。そのために、まずはマウスの顎下腺導管を結紮して、遺伝子およびマイクロ RNA の発現をマイクロアレイにて解析し、唾液腺機能低下に伴う唾液腺の萎縮のメカニズムを検索した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 導管結紮モデルマウスの作成

Tamarin らの方法 (Tamarin A: J Ultrastruct. Res.; 1971) に準じて、ジエチルエーテル麻酔下にマウス (C57BL/6Jcl, 8 週, 雌性, 日本クレア社) の顎下腺をチタンクリップ (MINI 17-001-95, スギタチタンクリップ II) で結紮し、顎下腺導管結紮マウスを作成した (図 2)。結紮マウスを 24 時間後および 1 週間後に屠殺、顎下腺を摘出した。



#### (2) 摘出した顎下腺組織の形態変化

摘出した顎下腺の大きさ・重量を計測した。また、ヘマトキシリン・エオジン染色を用いて組織学的変化の観察を行った。

#### (3) 顎下腺組織と非結紮顎下腺組織の遺伝子およびマイクロ RNA 発現の網羅的検索

24 時間結紮した顎下腺と非結紮顎下腺組織について、Sure Print G3 マウス遺伝子発現 8 × 60kv2 (Agilent Technologies Japan) および 3D Gene Mouse miRNA Oligo チップ (TORAY, Japan) を用いて、遺伝子およびマイクロ RNA の発現変化を調べた。

#### (4) (3) で選定した候補となった遺伝子およびマイクロ RNA の発現定量

顎下腺の結紮によって発現変化した miRNA の標的遺伝子を miRBase と miRDB データベースを用いて検索し、顎下腺萎縮に関連する遺伝子と miRNA の発現定量を、real-time PCR を用いて行った。

#### (5) 顎下腺組織の免疫染色

(3) で選定し、候補となった遺伝子についてその局在と発現量を検索するため、ホルマリン

固定したパラフィン包埋組織標本を用いた。一次抗体には、Anti-Ier 5:ATLAS antibodies (HPA029894)およびAnti-AQP 5: Abcam (ab 78486)を用いた。

#### (6) 統計的解析法

得られたデータは平均値±標準偏差で表記し、Mann-Whitney U 検定を用いて有意差検定を行い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

### 4. 研究成果

#### (1) 摘出した顎下腺組織の形態変化

##### ① 顎下腺組織の形態

顎下腺組織は経時的に大きさ、重量ともに減少しており、1週間結紮顎下腺においては、非結紮顎下腺と比較して、明らかに大きさ、重量ともに減少しており、やや弾性硬であった(図3)。

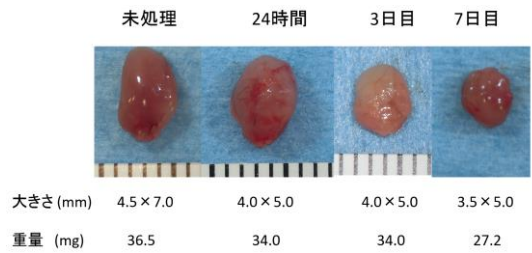
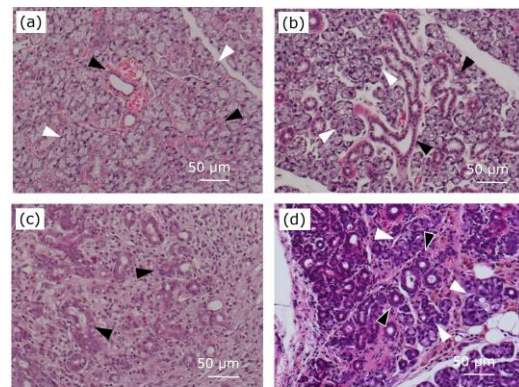


図3 顎下腺組織の形態

##### ② 摘出した顎下腺の組織学的変化

24時間結紮した顎下腺組織の導管は拡張していた(▲)。また、1週間結紮した顎下腺組織では、腺房細胞は萎縮し、その周囲に炎症細胞が浸潤しており、導管細胞は残存していた(▲)。さらに、1週間結紮し解除してから1か月後の顎下腺組織では、導管細胞の周囲に腺房細胞が確認できた(△)(図4)。このことより、導管細胞周囲に腺房細胞が再生された可能性が考えられた。



(a) untreated  
 (b) The submandibular gland of 24 hours after ligation: Atrophy of acinar cells and dilation of ducts were observed.  
 (c) The submandibular gland of 1 week after ligation: Atrophy and dilation were markedly shown in all lobules.  
 (d) The submandibular gland of 1 week after ligation and 1 month after removing the clip: The acinar cells were appeared around the duct.  
 △: acinar cell ▲: duct cell

図4 H-E 染色

#### (2) 24時間顎下腺導管を結紮した顎下腺組織と非結紮顎下腺組織の遺伝子およびマイクロRNA発現の網羅的検索

マイクロアレイ解析において、非結紮顎下腺と比較して24時間結紮した顎下腺で4倍以上発現が上昇した15 miRNAおよび103遺伝子、1/4倍以下に発現が低下した13 miRNAおよび150遺伝子を確認した。

そのうち、候補となったmiR-710は、カットオフ値2.5で、Clip 4 (CAP-GLY domain containing linker protein family, member 4)とIer 5 (Mus musculus immediate early response 5)がpick upされた(図5)。

24 hours after ligation group : untreated group			
Transcript ID	Fold Change	Transcript ID	Fold Change
miR-711	39.09	miR-378b	0.25
<b>miR-710</b>	12.60	miR-183-5p	0.24
miR-365-1-5p	10.05	miR-125a-3p	0.24
miR-328-5p	6.84	miR-128-3p	0.24
miR-714	6.80	miR-194-5p	0.23
miR-149-3p	6.25	miR-195a-3p	0.23
miR-204-3p	5.98	miR-181c-5p	0.22
miR-680	5.62	miR-378a-3p	0.22
miR-486a-3p	5.34	miR-497a-5p	0.22
miR-326-5p	5.26	miR-31-5p	0.21
miR-615-5p	4.93	miR-203-3p	0.20
miR-128-2-5p	4.88	miR-193a-3p	0.18
miR-208a-5p	4.36	miR-218-5p	0.06
miR-671-5p	4.23		
miR-30c-1-3p	4.20		

The target genes of candidate miR-710 were **Clip 4** and **Ier 5** (cut-off value : 2.5 fold change).

Clip 4 : CAP-GLY domain containing linker protein family, member 4  
 Ier 5 : Mus musculus immediate early response 5

図5 マイクロアレイ解析結果

#### (3) (2)で候補となったマイクロRNA(miR-710)および遺伝子(Clip 4, Ier 5)の発現定量

miR-710とClip 4, Ier 5について、リアルタイムPCRを用いて発現定量を行ったところ、マイクロアレイ解析に一致した結果を得た(図6)。

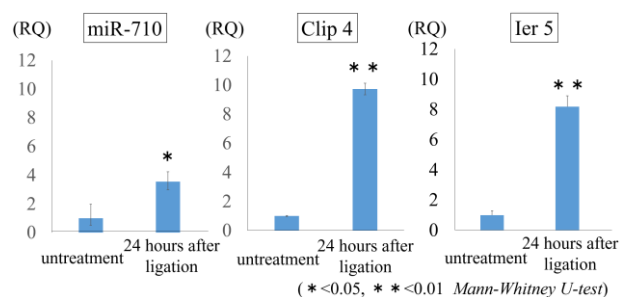
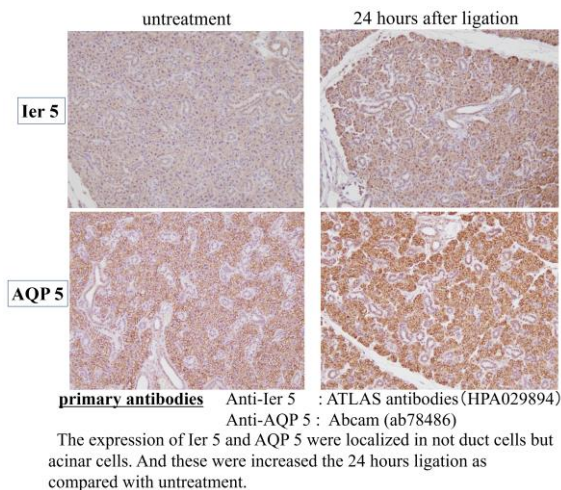


図6 real-time PCR

(4) (2)で候補となった遺伝子および AQP 5 の免疫組織学的染色

Ier 5 および AQP 5 とともにその局在は導管細胞ではなく、腺房細胞に存在しており、24 時間結紮することにより発現の増加が確認出来た (図 7)。

図 7 免疫組織学的染色



miR-710, Clip 4 と Ier 5 について、唾液腺に関する報告はないが、唾液腺萎縮に関連する新たな遺伝子および miRNA である可能性が考えられた。今後、これらの遺伝子および miRNA の機能解析をすすめ、口腔乾燥改善の治療に関する研究に役立てたいと考える。

5. 主な発表論文等

【雑誌論文】 (計 10 件)

- ①Takahashi A, Sugawara C, Kudoh K, Yamamura Y, Ohe G, Tamatani T, Miyamoto Y. Lingual tonsillolith: prevalence and imaging characteristics evaluated on 2244 pairs of panoramic radiographs and CT images. Dentomaxillofacial Radiology, 査読有 47(1); 2018.
- ②高石和美, 藤原茂樹, 江口 寛, 大塚 良, 赤澤友基, 北村尚正, 上田公子, 中川 弘, 可児耕一, 青田桂子, 桃田幸弘, 山村佳子, 工藤景子, 大江 剛, 玉谷哲也, 宮本洋二, 東 雅之, 岩本 勉, 北畑 洋. 当院における全身麻酔下歯科治療について 障害をもつ方へ安全な歯科治療の提供 Journal of Oral Health and Biosciences, 査読有 31(1); 2018, 62 - 67.
- ③工藤景子, 鎌田久美子, 高丸菜都美, 山村佳子, 大江 剛, 工藤隆治, 高橋 章, 玉谷哲也, 藤澤健司, 宮本 洋二. 徳島県における口腔がん検診の現状 日本歯科人間ドック学会誌 査読有 12(1); 2017, 21-25.
- ④西野豪志, 滝沢宏光, 澤田 徹, 河北直也, 坪井光弘, 梶浦耕一郎, 鳥羽博明, 吉田光輝, 川上行奎, 近藤和也, 山村佳子, 東 雅之. 肺癌手術における周術期口腔機能管理の術後肺炎予防効果 日本呼吸器外科学会雑誌 査読有 31(4); 2017, 432-438.
- ⑤西野豪志, 吉田卓弘, 井上聖也, 青山万理子, 滝沢宏光, 丹黒 章, 山村佳子, 東雅之. 外科診療におけるチーム医療の現況と展望 4. 周術期の口腔ケア-食道癌, 肺癌手術における周術期口腔機能管理- 日本外科学会雑誌 査読有 118(2); 2017, 155-160.
- ⑥Takamaru N, Tamatani T, Ohe G, Yamamura Y, Kudoh K, Miyamoto Y. Single non-contact Nd:YAG laser irradiation treatment for venous malformations in the oral cavity. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology, 査読有 29(5); 2017, 415-419.
- ⑦山村佳子, 藤澤健司, 鎌田久美子, 高丸菜都美, 工藤景子, 大江 剛, 工藤隆治, 高橋 章, 玉谷哲也, 永井宏和, 宮本 洋二. 口腔がん患者の歯科疾患罹患状況 日本歯科人間ドック学会誌 査読有 11(1); 2016, 29-32.
- ⑧西野豪志, 滝沢宏光, 吉田卓弘, 乾 友浩, 高杉 遥, 松本大資, 河北直也, 井上聖也, 先山正二, 丹黒 章, 東 雅之, 山村佳子. 肺癌・食道癌の周術期における口腔ケアの現状とその効果 胸部外科, 査読有 69(1); 2016, 30-34.
- ⑨山村佳子, 滝沢宏光, 松本文博, 桃田幸弘, 青田桂子, 武川大輔, 近藤智香, 山ノ井朋子, 高野栄之, 可児耕一, 十川悠香, 河野文昭, 松尾敬志, 先山正二, 東 雅之. 胸腔鏡下肺葉切除術における周術期口腔機能管理の効果に関する検討—後ろ向き研究— 日本口腔ケア学会雑誌, 査読有10(1); 2016, 106-110.
- ⑩Nishino T, Takizawa H, Yoshida T, Inui T, Takasugi H, Matsumoto D, Kawakita N, Inoue S, Sakiyama S, Tangoku A, Azuma M, Yamamura Y. Current Status and Effectiveness of Perioperative Oral Health Care Management for Lung Cancer and Esophageal Cancer Patients. The Japanese Journal of Thoracic Surgery, 査読有 69(1); 2016, 30-34.

【学会発表】 (計 19 件)

- ①山村佳子, 玉谷哲也, 眞野隆充, 宮本洋二 当科における悪性リンパ腫の臨床的検討 (第37回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 2019.1.24 長崎県・長崎市)
- ②山村佳子, 玉谷哲也, 工藤景子, 鎌田久美子, 工藤隆治, 栗尾奈愛, 大江 剛, 高丸菜都美, 宮本洋二 唾液腺の萎縮により誘導される遺伝子およびマイクロRNA 発現の変化 (第63回日本口腔外科学会総会・学術大会 2018.11.2 千葉県・千葉市)

- ③Yamamura Y., Tamatani T., Kudoh K., Akita K., Kamada K., Miyamoto Y. The Changes Of Genes And MicroRNA Expression Induced By Submandibular Gland Atrophy (24th Congress of the European Association for Cranio Maxillo Facial Surgery 2018.9-18-21 Germany・Munich)
- ④工藤景子, 工藤隆治, 玉谷哲也, 山村佳子, 高丸菜都美, 大江 剛, 高橋 章, 藤澤健司, 横田美保, 鎌田久美子, 宮本洋二. 当科における口腔扁平苔癬症例の臨床的検討 (日本歯科人間ドック学会第20 回学術大会 2017.12.10 神奈川県・横浜市)
- ⑤宮本洋二, 鎌田久美子, 山村佳子, 工藤景子, 高丸菜都美, 大江 剛, 玉谷哲也, 藤澤健司, 眞野隆充. 頸部郭清術後のリンパ漏・乳糜漏への対応(第 65 回 NPO 法人日本口腔科学会中国・四国地方部会 2017.11.11 高知県・高知市)
- ⑥鎌田久美子, 高丸菜都美, 工藤景子, 山村佳子, 大江 剛, 玉谷哲也, 眞野隆充, 宮本洋二. 特発性血小板減少性紫斑病を有する口底癌患者の治療経験 (第 65 回 NPO 法人日本口腔科学会中国・四国地方部会 2017.11.11 高知県・高知市)
- ⑦山村佳子, 玉谷哲也, 工藤隆治, 鎌田久美子, 工藤景子, 高丸菜都美, 大江 剛, 藤澤健司, 中川貴之, 栗尾奈愛, 眞野隆充, 宮本洋二. 放射線治療患者におけるピロカルピン塩酸塩を用いた口腔リンス法の有用性 (第 16 回中国四国口腔癌研究会 2017.11.10 高知県・高知市)
- ⑧山村佳子, 玉谷哲也, 工藤景子, 福田直志, 中川貴之, 高丸菜都美, 大江 剛, 藤澤健司, 宮本洋二. チタン上で培養したマウス骨芽細胞様細胞の硬組織分化にグルコース濃度が及ぼす影響 (第 62 回日本口腔外科学会学術大会 2017.10.20 京都府・京都市)
- ⑨横田美保, 工藤景子, 玉谷哲也, 鎌田久美子, 福田直志, 高丸菜都美, 山村佳子, 中川貴之, 大江 剛, 工藤隆治, 高橋 章, 藤澤健司, 鯨岡聡子, 工藤保誠, 石丸直澄, 宮本洋二. 当科における歯原性角化嚢胞の臨床的検討 (第 46 回日本口腔外科学会中国四国学術集会 2017.5.27 山口県・山口市)
- ⑩秋田和也, 高丸菜都美, 玉谷哲也, 鎌田久美子, 山村佳子, 工藤景子, 大江 剛, 藤澤健司, 宮本洋二. 当科における手術拒否口腔癌症例の臨床的検討(第 46 回日本口腔外科学会中国四国学術集会 2017.5.27 山口県・山口市)
- ⑪山村佳子, 藤澤健司, 工藤隆治, 工藤景子, 秋田和也, 中村勇貴, 高丸菜都美, 大江 剛, 玉谷哲也, 宮本洋二. ピロカルピン塩酸塩(サラジェン)を用いた口腔リンス法の有効性と安全性の検討 (第 14 回日本口腔ケア学会総会・学術大会 2017.4.23 沖縄県・宜野湾市)
- ⑫工藤景子, 鎌田久美子, 横田美保, 高丸菜都美, 山村佳子, 大江 剛, 工藤隆治, 高橋 章, 玉谷哲也, 藤澤健司, 永井宏和, 宮本洋二. 当科における口腔がん検診の現況 (日本歯科人間ドック学会第 19 回学術大会 2016.12.17 徳島県・徳島市)
- ⑬山村佳子, 玉谷哲也, 大江 剛, 藤澤健司, 高丸菜都美, 工藤景子, 永井宏和, 宮本洋二. チタン上で培養したヒト骨髄間葉系幹細胞の遺伝子および microRNA 発現の解析 (第 61 回日本口腔外科学会総会・学術大会 2016.11.26 千葉県・幕張市)
- ⑭高丸菜都美, 鎌田久美子, 工藤景子, 玉谷哲也, 山村佳子, 大江 剛, 永井宏和, 宮本洋二. 口腔内に発生したメトトレキサート関連リンパ増殖性疾患の 2 例 (第 61 回日本口腔外科学会総会・学術大会 2016.11.26 千葉県・幕張市)
- ⑮山村佳子, 玉谷哲也, 大江 剛, 藤澤健司, 高丸菜都美, 工藤景子, 永井宏和, 宮本洋二. チタンが培養ヒト骨髄間葉系幹細胞に及ぼす影響 -マイクロアレイによる解析-(日本バイオマテリアル学会 シンポジウム 2016 2016.11.21 福岡県・福岡市)
- ⑯玉谷哲也, 高丸菜都美, 鎌田久美子, 横田美保, 山村佳子, 工藤景子, 大江 剛, 工藤隆治, 高橋 章, 藤澤健司, 永井宏和, 宮本洋二. 当科における早期口腔扁平上皮癌患者の臨床的検討 (第 64 回 NPO 法人日本口腔科学会中国・四国地方部会 2016.10.29 山口県・山口市)
- ⑰横田美保, 藤澤健司, 山村佳子, 玉谷哲也, 高丸菜都美, 工藤景子, 大江 剛, 永井宏和, 鯨岡聡子, 石丸直澄, 宮本洋二. 骨破壊を伴った顎放線菌症の 2 例 (第 64 回 NPO 法人日本口腔科学会中国・四国地方部会 2016.10.29 山口県・山口市)
- ⑱高橋 章, 鎌田久美子, 山村佳子, 高丸菜都美, 工藤隆治, 工藤景子, 大江 剛, 藤澤健司, 玉谷哲也, 永井宏和, 宮本洋二. 口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移診断における FDG-PET 検査の有用性 (第 15 回中国四国口腔癌研究会 2016.10.28 山口県・山口市)
- ⑲鎌田久美子, 工藤景子, 玉谷哲也, 高丸菜都美, 山村佳子, 大江 剛, 藤澤健司, 永井宏和, 宮本洋二. 舌に発生したメトトレキサート関連リンパ増殖性疾患の 1 例(第 45 回日本口腔外科学会中国四国支部学術大会 2016.5.21 広島県・広島市)

〔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：  
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：宮本 洋二  
ローマ字氏名：(MIYAMOTO, Youji)  
所属研究機関名：徳島大学  
部局名：大学院医歯薬学研究部（歯学系）  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：20200214

研究分担者氏名：玉谷 哲也  
ローマ字氏名：(TAMATANI, Tetsuya)  
所属研究機関名：徳島大学  
部局名：病院  
職名：講師  
研究者番号（8桁）：30274236

研究分担者氏名：高丸 菜都美  
ローマ字氏名：(TAKAMARU, Natsumi)  
所属研究機関名：徳島大学  
部局名：大学院医歯薬学研究部（歯学域）  
職名：徳島大学専門研究員  
研究者番号（8桁）：40513031

研究分担者氏名：永井 宏和  
ローマ字氏名：(NAGAI, Hirokazu)  
所属研究機関名：東北大学  
部局名：歯学研究科  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：50282190

### (2) 研究協力者

なし  
研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。