

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15863

研究課題名(和文)がん治療における唾液分泌低下原因の探索を目指すアミラーゼ分泌モデル動物の作出

研究課題名(英文)The trial of clarification of the mechanism of salivary hypofunction involved in cancer therapies and development the care for protection of salivary glands by producing a model mouse.

研究代表者

関亦 明子 (Sekimata, Akiko)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：50321823

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)：がん治療による唾液分泌低下は、様々な口腔内トラブルを誘発し、患者にとっては闘病意欲の低下や時に命の危険にも結びつくことから、がん看護において重大な問題となっている。本研究は、唾液分泌を蛍光タンパク質発現として容易に可視化・定量化できるVenus遺伝子導入マウス(遺伝子改変-蛍光唾液腺マウス)を作製し、唾液腺障害メカニズムの解明と唾液腺防護ケア開発を行うことを目的とした。今回の研究では、遺伝子改変マウスと唾液腺体外培養系の作製に成功した。今後は、作製したモデルマウスからの唾液腺細胞モデル培養系を構築し、唾液分泌防護剤や促進剤の検索と同定を行ってがん支持療法の開発に貢献していく。

研究成果の概要(英文)： Hyposalivation as a consequence of cancer therapies is the significant complication, because hyposalivation causes various side effects such as oral trouble, reducing illness motivation, including danger of life. This study aimed at clarification of the mechanism of salivary hypofunction involved in cancer therapies and development the care for protection of salivary glands, by producing a transgenic mouse introduced Venus gene which is enabled visualization and quantification of saliva secretion. We successfully produced the transgenic mouse and in vitro salivary gland culture-systems in this study. In future, we would like to contribute to the development of supporting treatments for cancer therapies by the identification of protectants for salivary glands and promoters for saliva secretion using the transgenic mouse and the culture systems.

研究分野：基礎看護学、細胞生物学

キーワード：唾液腺 唾液分泌低下 放射線療法 がん化学療法 がん支持療法

## 1. 研究開始当初の背景

「がん化学療法や頭頸部放射線療法で起こる唾液分泌低下を事前に予防できないだろうか。」という発想から本研究を着想した。唾液分泌低下は、不可逆的な細胞死によって引き起こされるが、命に直接関わらないことが多いため根本的解決に向けた研究は少ない。しかし、唾液分泌低下により、嚥下困難、味覚異常、感染症等の口腔内のトラブルが誘発され、患者にとっては闘病意欲の低下、時に命の危険に結びつくことから問題解決は急務である。我々は、唾液分泌低下の予防、軽減、治療を目的として、唾液腺細胞の体外での長期培養モデルの構築を進めている。

唾液腺は、大きく顎下腺、舌下腺、耳下腺に分けられる。これら3つの主要唾液腺はその役割や組織的な構造が大きく異なっている。その中でも耳下腺は、副交感神経刺激によりアミラーゼなどの消化酵素を分泌し、がん放射線療法で最も影響を受ける器官と言われている。にもかかわらず、耳下腺の生体内での発生過程や体外での培養研究は進んでいない。また、マウス等のモデル動物における唾液分泌の定量はきわめて困難であり、かつ唾液中のアミラーゼ産生を容易に可視化できる系がないため、がん治療における唾液分泌低下の詳細な研究やケア・治療法の開発は全く進んでいない。

## 2. 研究の目的

「がん治療における唾液分泌低下の予防看護ケア開発への貢献」

唾液分泌低下は、様々な口腔内トラブルを誘発し、患者にとっては闘病意欲の低下、時に命の危険に結びつくことから、がん看護において重大な問題となっている。本研究では、唾液分泌を緑色蛍光タンパク質発現として容易に可視化・定量化できる Venus 遺伝子導入マウス(遺伝子改変-蛍光唾液腺マウス)を作製し、個体レベルでの放射線療法や化学療法による唾液腺障害メカニズムを解明することで、予防看護ケア開発の達成を目指した。さらに、作製したモデルマウスから唾液腺細胞モデル培養系を構築することで、唾液分泌防護剤や分泌促進剤の検索と同定を行ってがん支持療法の開発に貢献していく。

## 3. 研究の方法

### (1) 唾液腺培養モデルの作成

#### 顎下腺の培養

体外培養を成功させるには、無数の増殖因子の中から必須の因子を探し出し、体内での増殖環境を再現する必要がある。我々のこれまでの顎下腺体外培養の知見の蓄積を活かして、まず始めに上皮増殖因子(EGF)ファミリーと線維芽細胞増殖因子(FGF)ファミリーの組み合わせによる培養からスタートした。EGFファミリーやFGFファミリーに属する増殖因子は多数存在するため、形態観察を行いながら適宜、増殖因子の組み合わせを決

定した。

#### 耳下腺の培養

顎下腺については、その生体内発生がよく研究されており、マウスの妊娠12日目の胎児で顎下腺の原基が発生していることがわかっている。体外培養にあたっては、妊娠13日目の胎児より原基を体外にとりだして培養することができる。ところが、耳下腺は生体内での発生についてはこれまで研究が進んでいなかった。我々の観察において、妊娠13日目ではまだ原基がみられていないが、妊娠16日目には明確に耳下腺が確認できた。このことから耳下腺の原基は妊娠14-15日目に現れると考えられ、まずその原基出現時期の特定を行い、顎下腺と同様の培養条件で三次元培養が可能かを検証した。

### (2) 遺伝子改変-蛍光唾液腺マウスの作製

#### 遺伝子改変用プラスミドDNAの作製

唾液分泌(アミラーゼ分泌)を簡便に可視化・定量化するために、アミラーゼ遺伝子の発現と同時に、蛍光タンパク質が発現する Venus 遺伝子導入マウスの作製を行った。まず、アミラーゼの遺伝子発現を調節している転写調節領域(プロモーター)の支配下に Venus 遺伝子を挿入したプラスミドDNAを作製した。アミラーゼのプロモーターはPCR法により、マウス染色体DNAから増幅し単離した。

#### Venus 遺伝子導入マウス

アミラーゼの遺伝子発現と同時に Venus を発現可能な遺伝子改変用プラスミドDNAを、マウス受精卵に注入し、遺伝子改変マウスを数系統作製した。数系統作製する理由は、注入したプラスミドDNAは、その後マウスの染色体DNAに組み込まれて安定に Venus を発現するようになるが、挿入した染色体DNAの位置によって Venus 発現量が異なってくるからである。そこで、産仔マウスの中から、耳下腺からの唾液分泌の様子を正確に反映していると思われる Venus 発現マウスを選択し、以後の解析用に使用することにした。

### (3) 遺伝子改変-蛍光唾液腺マウスからの唾液腺体外培養系の作製

当初の予定では、遺伝子改変-蛍光唾液腺マウスから唾液腺を摘出して体外培養をスタートする予定であった。遺伝子改変マウスの作出に時間を要したため、遺伝子改変-蛍光唾液腺マウスからの唾液腺培養はまだ行っていない。本研究において遺伝子改変マウスの完成が確認できたため、遺伝子改変マウスの解析と唾液腺培養に向けて、マウスの導入遺伝子 homo 系統を増殖させているところである。

#### 4. 研究成果

##### (1) 唾液腺の試験管内培養

###### 顎下腺の三次元培養

増殖因子添加によるマウス顎下腺体外培養上皮組織において、形態とフローサイトメトリーによる細胞表面マーカーの変化を観察した。培養顎下腺上皮組織に、ニューレグリン 1 (neuregulin1: NRG1), トランスフォーミング増殖因子 (transforming growth factor alpha: TGF- $\alpha$ ) を添加したところ、小葉 (腺房) の分枝と増加がみられ、線維芽細胞増殖因子 1 (fibroblast growth factor-1: FGF1) を添加したところ、導管の伸長がみられた。これらの形態的变化は他のグループの結果とも一致した。細胞表面マーカー (c-Kit, aquaporin5 : AQP5) を用いた、フローサイトメトリーによる解析 (図 1) では、幹細胞と考えられている c-Kit 陽性細胞 (c-Kit+細胞) の割合は NRG1 または、NRG1 + FGF1 の組み合わせで増加した。唾液分泌細胞の分化マーカーである AQP5 陽性細胞 (AQP5+細胞) が最も増加したのは、NRG1 単独添加の場合であった。本研究の結果、マウス培養唾液腺上皮組織に NRG1+FGF1 を添加することにより、c-Kit+細胞を維持し、また NRG1 のみを添加することで AQP5+細胞を増殖させる等のように、培地に添加する増殖因子の組み合わせを変えることで唾液腺体外培養系を構築できる可能性が示唆された。 [Hayasaka(2016)]

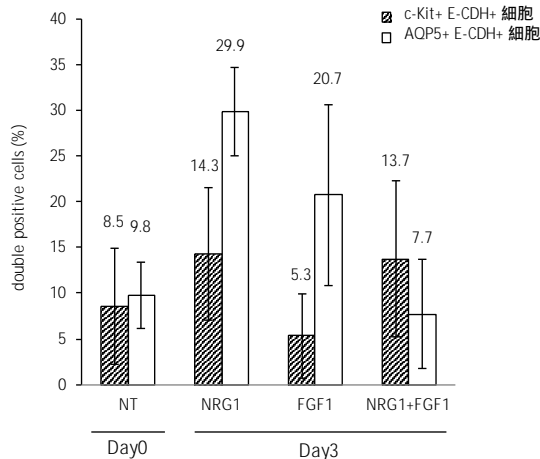


図 1. 添加増殖因子の違いによる細胞表面マーカーの変化

###### 顎下腺細胞の単層培養

三次元培養の結果を受けて、マウス胎児の顎下腺 (ME-SMG : mouse embryonic submandibular gland) 上皮細胞の無血清単層培養に挑戦した。当初、ME-SMG 細胞を分散培養すると、安定した増殖がみられなかったため、培養に添加が必要と思われる因子を文献などから検索し、培養液に添加してその増殖の様子を観察した。培養成功時の培養条件を検討して、必要と思われる条件や因子を選定し、試行錯誤を重ねた。本研究では、これ

らの条件検討の結果から選択した 4 つの添加因子の効果を観察したところ、選択した 4 つの添加因子を基礎培地にすべて加えることで、単一細胞に分散した ME-SMG 上皮細胞の体外培養に成功した。このうち、KnockOut™ Serum Replacement (KSR) と Y-27632 の添加は ME-SMG 上皮細胞の培養に必須であった (図 2)。また、幹細胞性の維持や細胞の分化に関わる Wnt-3a、R-spondin 1 の添加による ME-SMG 上皮細胞の増殖促進作用を観察したが、どちらを添加しても増殖の促進は観察されなかった。本研究において、KSR と Y-27632 を基礎培地に添加することで ME-SMG 上皮細胞の無血清培地による単層での安定した培養に成功した。 [Suina(2018) *in press*]

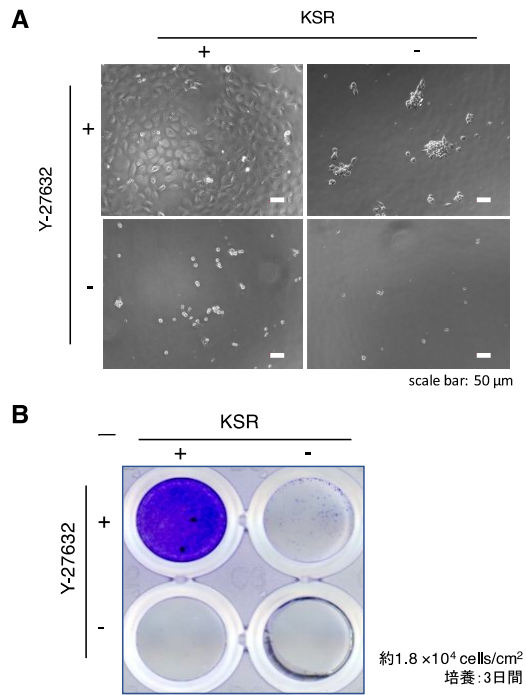


図 2. KnockOut™ Serum Replacement (KSR) と Y-27632 の ME-SMG 培養細胞への添加の必要性

###### 耳下腺の三次元培養

三大唾液腺のうち、これまで耳下腺原基は特定が困難であったが、本研究において耳下腺原基を特定し、妊娠 13 日目 (E13) のマウス胎児より単離できることがわかった。E13 の耳下腺原基はまだ分枝がみられず導管状の構造の先端が腺房様にふくらんだ構造であった。これまでの顎下腺培養時と同様に、Matrigel™中に包埋し、NRG1, FGF1 を添加して培養したところ、顎下腺と同様に試験管内でも盛んな分枝がみられた。しかし、アミラーゼ発現や分泌は確認できなかった。 [Nakao (2017)]

三大唾液腺のうち、耳下腺は解剖学的に顎下腺の直近に存在するにも関わらず、顎下腺より発生時期が遅いことから、生体内で発生

を促進する増殖因子やその作用の順序も顎下腺とは異なっていることが想定されるため、我々の顎下腺培養では使用していない因子、例えばカルバコール (CCh) などの副交感神経刺激因子などについても試行する必要があると考えている。

## (2) 遺伝子改変-蛍光唾液腺マウスの作製

アミラーゼ発現と同時に発現可能になるように細工した Venus 蛍光タンパクとルシフェラーゼ (NonoLuc™) の融合遺伝子をゲノム編集法にてマウス受精卵に導入し、遺伝子解析を行った。その結果、2匹のマウスに遺伝子導入が成功していた。この遺伝子導入マウスにおいて、血清中のルシフェラーゼ活性、耳下腺のフローサイトメトリー解析を行ったところ、NonoLuc™、Venus 蛍光タンパク質の発現が確認された。現在この遺伝子導入マウスを掛け合わせによって増殖させ、導入遺伝子を homo で持ち、ICR マウス系統をバックグラウンドに持つ実験用マウスを作製している。

今後は、本研究で作製した遺伝子改変マウスと唾液腺試験管内培養系を用いて、マウス個体を使用した唾液腺防護ケア開発や唾液腺培養系を利用した唾液腺防護剤のスクリーニングを行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Suina A, Homma C, Aso Y, Yagihashi S, Sekimata M, Sekimata A, The effects of serum replacement and Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitor, Y-27632 on the monolayer-culture of mouse embryonic submandibular gland epithelial cells in serum-free medium, Yamagata Med J, 2018 (*in press*)

Nakao A, Inaba T, Murakami-Sekimata A., Nogawa H, Morphogenesis and Mucus Production of Epithelial Tissues of Three Major Salivary Glands of Embryonic Mouse in 3D Culture, Zool Sci, 34(6): 475-483. 2017

Hayasaka Y, Nogawa H, Sekimata M, Murakami-Sekimata A, The effects of neurogulin 1 and/or fibroblast growth factor 1 on the differentiation of mouse embryonic submandibular gland ex vivo culture cells, Yamagata Med J, 34(2): 42-49. 2016

[学会発表](計6件)

吉田大貴, 関亦明子, 伊関憲, 関亦正幸, “インターロイキン 9 (IL9) 遺伝子サイレンサーと転写因子 Runx1 によるエピジェネティックな IL9 転写調節機構の解明”, 第 40 回日

本分子生物学会年会, 神戸, 2017 年 12 月

関亦明子, 阿蘇祐子, 推名祐美, 本間千明, 柳橋志帆, 関亦正幸, “唾液腺保護ケア開発を目指したマウス唾液腺培養モデル構築の試みにおける Serum Replacement の効果について”, 第 5 回 看護理工学会学術集会, 金沢, 2017 年 10 月

関亦明子, 野川宏幸, 関亦正幸 “マウス胎児顎下腺原基上皮細胞の無血清培地による単層化培養の試み”, 第 90 回 日本組織培養学会, 岡山, 2017 年 6 月

関亦正幸, 伊関憲, 関亦明子, “STARR-seq 法で同定したエンハンサーと転写因子 Runx1 によるエピジェネティックな IL-22 遺伝子発現調節機構”, 第 39 回 日本分子生物学会年会, 横浜, 2016 年 12 月

関亦明子, 野川宏幸, 関亦正幸, “唾液腺保護ケアの開発を目指したマウス胎児唾液腺単層化培養の試み”, 第 4 回 看護理工学会学術集会, 岩手, 2016 年 10 月

関亦明子, 早坂勇人, 野川宏幸, 関亦正幸, “マウス胎児顎下腺上皮組織の体外培養における neuregulin 1 と fibroblast growth factor 1 の細胞分化への作用”, 第 89 回 日本組織培養学会大会, 大阪, 2016 年 5 月

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

関亦 明子 (SEKIMATA, Akiko)  
山形大学医学部・准教授  
研究者番号: 50321823

### (2) 研究分担者

関亦 正幸 (SEKIMATA, Masayuki)  
福島県立医科大学医学部・准教授  
研究者番号: 80250190

### (2) 研究協力者

野川宏幸 (NOGAWA, Hiroyuki)  
井上直和 (INOUE, Naokazu)  
吉田大貴 (YOSHIDA, Daiki)  
早坂勇人 (HAYASAKA, Yuto)  
推名祐美 (SUINA, Yumi)