

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K12044

研究課題名(和文) 口腔粘膜上皮-小唾液腺ユニットを標的とした口腔乾燥治療の創薬応用

研究課題名(英文) Drug discovery for xerostomia treatment targeting oral mucosal epithelium-minor salivary gland units

研究代表者

加藤 寛子 (Kato, Hiroko)

大阪大学・薬学研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：70749994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：副交感神経由来のアセチルコリンがムスカリン受容体に作用して唾液分泌は亢進する。現在、口腔乾燥症治療薬の適応はシェーグレン症候群や放射線治療後の口腔乾燥症などの特定の症例に限られているが、口腔乾燥が誘発する感染症等のリスク低減のためにも、広く適応を持つ有効な治療薬が必要である。申請者は口腔粘膜上皮組織には神経組織によらない非神経性コリン作動系のアセチルコリン産生システムが存在し、上皮細胞から分泌されるアセチルコリンが小唾液腺の唾液分泌を促進するという仮説を立て、研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの口腔乾燥症や唾液腺の基礎研究が大唾液腺をターゲットとしている中、小唾液腺をターゲットとした数少ない研究の一つである。口腔粘膜上皮、唾液腺それぞれにおける神経伝達物質の産生、受容体に関する研究はあるが、二つの組織を上皮とその付属器としてとらえ、関連付けた研究はこれが世界初である。

研究成果の概要(英文)：Salivary secretion is enhanced by parasympathetically derived acetylcholine binding to muscarinic receptors. Currently, the indication of drugs for xerostomia is limited to specific cases such as Sjogren's syndrome and xerostomia after radiotherapy, however, an effective treatment with a broad indication is needed to reduce the risk of infections and other diseases caused by xerostomia. We hypothesized that the oral mucosal epithelial tissue contains a non-neurogenic cholinergic acetylcholine-producing system that is independent of neural tissue, and that acetylcholine secreted by the epithelial cells promotes salivary gland secretion of minor salivary glands.

研究分野：細胞生物学

キーワード：口腔粘膜上皮 アセチルコリン 非神経性コリン作動系 小唾液腺 口腔乾燥症

1. 研究開始当初の背景

ドライマウス研究会 (<http://drymouth-society.jp/>) によると、わが国に口腔乾燥症患者は800万人いるという。また、超高齢社会を迎え、医療機関のみならず在宅、施設においても口腔ケアが行われ、口腔乾燥症に対するケアの重要性が浸透しつつある。口腔乾燥を放置すれば、口腔内自浄作用の低下で虫歯や歯周病に罹り易くなり、免疫システムが低下している高齢者では嚥下反射が出にくくなるために、誤嚥による肺炎等の感染症リスクが上がる。

大唾液腺は自律神経由来の神経伝達物質により制御されている。中でもアセチルコリンは直接ムスカリン受容体に作用して唾液分泌を亢進するだけでなく、*in vitro* においてもアセチルコリンは唾液腺の再生に重要であることが報告されている。^{1,2} 従って、唾液腺に作用するアセチルコリンの存在が口腔乾燥を改善するカギとなる。口腔乾燥症治療薬として認可されたムスカリン受容体作動薬は神経-唾液腺をターゲットとし、唾液の主要供給源である大唾液腺の機能亢進を狙ったものであるが、シェーグレン症候群等のごく限られた口腔乾燥症の適応しかない上に、唾液腺以外の臓器への副作用の可能性もある。さらに、現在はムスカリン受容体作動薬の適応とならない患者には漢方薬が用いられるが、体質の見極めや量や期間等、効果的な処方をする上で経験値が必要である。また、口腔保湿剤など他の治療法は対症療法であり、効果が弱い。したがって、副作用が少なく広い適応を持ち、なおかつ効果的なうがい薬・口腔ケア製品等の局所投与できる薬剤の開発が必要である。また、口腔乾燥症のモデルとして唾液腺障害動物が用いられてきたが³、ドライアイ・ドライスキンの *in vitro* モデル^{4,5} が報告されている中、口腔乾燥の *in vitro* モデルが開発されていないことは、上皮の局所病態の理解不足となるだけでなく、ケミカルライブラリー等による薬剤スクリーニングの応用の機会を失うことになり、口腔乾燥症治療法開発の大きな障害となっている。

そこで申請者は口腔粘膜上皮の付属器として存在する小唾液腺に局所的にアプローチする方法に着目した。小唾液腺は広く口腔内に分布し、全唾液分泌量に対する割合は多くないが粘液性であるため水分保持力は強い。大唾液腺と異なり、小唾液腺の唾液分泌に関する神経性制御については不明である。申請者は非神経性コリン作動系と呼ばれる、皮膚を含む多くの上皮細胞や、心臓、免疫系など神経系以外の組織が自らアセチルコリンを産生、分泌、分解し、オートクライン・パラクライン作用によって、細胞自身と周囲の細胞に対して、各組織特異的な生物学的機能を発揮するシステム⁶ が、口腔粘膜上皮にも存在していることをこれまでの研究で確認した。そこで、口腔粘膜上皮が小唾液腺の唾液分泌に必要なアセチルコリンの供給源となりうると考えた。口腔粘膜上皮の非神経性コリン作動系は上皮細胞の増殖、接着、細胞移動に関与していることが報告されているが、小唾液腺を含む周囲組織にアセチルコリンを実際に供給しているかは不明である。⁷ したがって、口腔粘膜上皮により産生された神経伝達物質の周囲組織への影響の解明は、小唾液腺をターゲットとした口腔乾燥症治療に貢献すると考えた。

2. 研究の目的

副交感神経由来のアセチルコリンがムスカリン受容体に作用して唾液分泌は亢進する。現在、口腔乾燥症治療薬の適応は特定の症例に限られているが、口腔乾燥が誘発する感染症等のリスク低減のためにも、広く適応を持つ有効な治療薬が必要である。申請者は培養口腔粘膜上皮細胞にコリン作動系マーカーの発現を確認したことから、口腔粘膜上皮組織には神経組織によらない非神経性コリン作動系のアセチルコリン産生システムが存在し、上皮細胞から分泌されるアセチルコリンが小唾液腺の唾液分泌を促進するという仮説を立てた。本研究では、(1)口腔乾燥 *in vitro* モデルの開発 (2)口腔粘膜-小唾液腺共培養系の開発(3)口腔粘膜組織における非神経性コリン作動系の解析を行うことを目的に研究をすすめた。この結果は全体を標的とした局所投与システムの利用による口腔乾燥症治療の創薬応用へ貢献する。

3. 研究の方法

実験に用いる細胞は、新潟大学医歯学総合病院口腔外科外来で、本研究の実施協力の依頼に対して同意を得た患者から小手術時に得られた正常口腔粘膜組織片を使用した。口腔粘膜組織から上皮細胞を酵素処理により単離し、フィーダー細胞、ウシ下垂体抽出物、ウシ血清を含まない培地である Epilife(Thermo Fisher Scientific)を用いて培養を行った。継代数 P1-3 を用いた。

(1)口腔乾燥 *in vitro* モデル(以下、乾燥モデルと略)の開発

Kato et al. 2015⁸の方法に準じてヒト培養口腔粘膜上皮細胞を Alloderm (LifeCell)に播種後、11日間培養し培養口腔粘膜 (D11E)を作成した。乾燥モデルは D11E を湿度 40% で更に 7日間培養し作成し、対照は湿度 90% で培養した。

(2)共培養による上皮-小唾液腺ユニットの作成

口腔乾燥モデルにもちいた Alloderm はヒト真皮からなり、硬いために唾液腺の移植が難しい。そこで小唾液腺の共培養が容易なコラーゲンゲルを用いた三次元培養システム(コラーゲンゲル

モデル)を用いて検討を行った。また、ヒト小唾液腺を摘出する手術が少なく、入手が困難であったためマウスの小唾液腺を用いて検討を行った。

コラーゲンゲルモデルを用いた三次元培養システムは以下の手順で作製した。9 × 10⁵ の正常皮膚ファイブプラストを、1.8ml の4mg/ml ウシ真皮由来ネイティブコラーゲン溶液 (KOKEN CO. Ltd.) , 1 × DMEM (Thermo Fisher Scientific) , 10 mM HEPES (Dojindo, Kumamoto, Japan) , 10 mM NaHCO₃ (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) , 1% penicillin/Streptomycin (Thermo Fisher Scientific) と 5% FBS (Thermo Fisher Scientific) と混合した 1 × DMEM に懸濁し、高密度半透明膜細胞培養インサート (0.4 μm 孔径) (Corning, NY, USA) に 6 ウェルプレートの細胞をプレートすることで細胞を培養した。コラーゲン溶液の固化後、3.7 × 10⁶ のファイブプラストを含む 0.6 ml のコラーゲン溶液混合物を線維芽細胞の第一層の上にプレATINGした。真皮等価物はスナップウェル培養インサート (Corning) で固定した。正常皮膚ケラチノサイトを 1.1 × 10⁶ の密度で固定した真皮等価物に播種し、37 °C、5%CO₂、12.5%O₂ の加湿雰囲気下で 4 日間浸漬培養を行った。水中培養の維持後、皮膚等価物を 5%CO₂、37 °C の加湿雰囲気下で気液界面に曝した。皮膚等化物を培養する培地は、10% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 5 μg ml⁻¹ insulin (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation), 1 mM magnesium ascorbyl phosphate (MAP, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation), 10 ng/ml の bFGF および 1 μM hydrocortisone (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) 添加 DMEM からなり、48 ~ 72 時間ごとに新しい培地に置き換え、7 日間培養を行った。

コラーゲンゲルモデルの表皮を MANI Ophthalmic Knife 25G で切開し、真皮層に 5-8 週齢の C57BL/6 の軟口蓋から切除した小唾液腺を移植し、再び 5%CO₂、37 °C の加湿雰囲気下でインキュベートを行い、唾液分泌能の確認のため、Pilocarpine (10 μg/mL) を添加し、唾液分泌を確認した。その後 4%PFA で固定し、パラフィン切片作成後、組織学的評価を行った。

(3) 口腔ケラチノサイトのコリン作動系の解析

非神経性アセチルコリンの運搬と分泌に関わる Solute Carrier Family 22 Member 1-3 (SLC22A1-3) とアセチルコリンの合成に関わる choline acetyl transferase の発現を 10%FBS 添加 DMEM で培養した口腔ファイブプラストと 0.06mM Ca⁺⁺ (Low Calcium) または 1.2mM Ca⁺⁺ (High Calcium) を添加した Epilife (Thermo Fisher Scientific) で 2 日間培養した口腔ケラチノサイトにおける遺伝子発現を RT-qPCR で解析した。TRI Reagent (Molecular Research Center, Inc) を用いて全 RNA を抽出した。RNA 抽出液にクロロホルムを加え RNA を含む水層を回収した。これにイソプロパノールを加え RNA を沈殿させた。次に 70% エタノールによって RNA を洗浄し RNase free water に溶解して RNA サンプルを得た。この RNA サンプルから逆転写酵素 (QIAGEN) を用いて cDNA を合成した。SYBR Green mix (TOYOBO) を用いて遺伝子配列を特異的に増幅した。検出時は 18s RNA を内在性コントロールとして使用した。PCR 反応は、ViiA 7 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用い、95 °C 15 秒、55 °C 10 秒間、72 °C 30 秒間で 40 サイクルを行った。

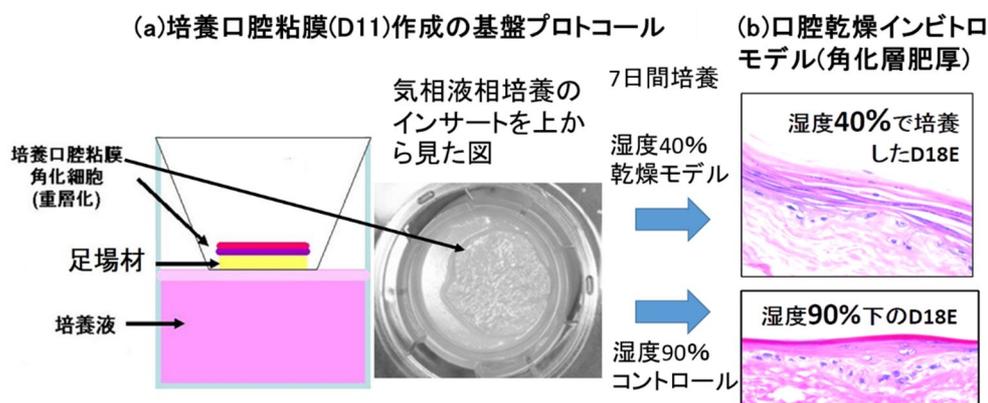
また、培地に放出されたアセチルコリンの量を Amplitude Fluorimetric Acetylcholine Assay Kit Red Fluorescence (AAT Bioquest) で測定した。

4. 研究成果

(1) 口腔乾燥 in vitro model の開発

ヒト培養口腔粘膜の作成プロトコルを図 1 (a) に、乾燥モデルとコントロールの組織像を図 1 (b) に示す。コントロールに比べ、乾燥モデルにおいては角化層の肥厚が認められた。

図 1



(2) 共培養による上皮-小唾液腺ユニットの作成

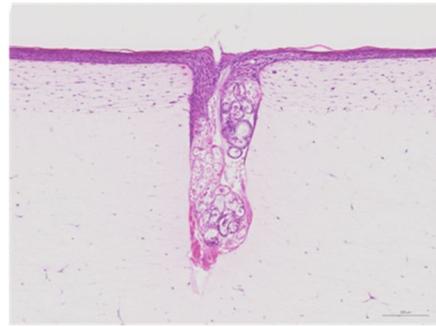
コラーゲンゲルモデルに小唾液腺を移植し、24 時間培養を行った。24 時間後のゲルモデル表面のマクロ写真と HE 染色像を示す。小唾液腺が上皮細胞と接続していることが確認された (図 2(a)-(b))。また、ピロカルピンで刺激を行うと粘性をもった唾液が分泌された (図 2(c))。

図 2

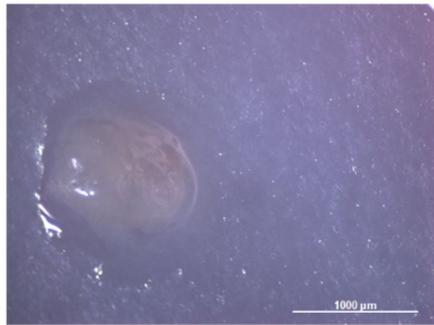
(a)



(b)



(c)



(a)コラーゲンモデルを表皮側から見た写真(b)小唾液腺移植後 24 時間の HE 写真(c)ピロカルピン刺激による唾液分泌

(3)口腔粘膜組織における非神経性コリン作動系の解析

非神経性アセチルコリンの運搬と分泌に関わる SLC22A1-3 の遺伝子発現は、口腔ファイibroプラストでは全て検出された(図 3(a)-(c))。口腔ケラチノサイトでは細胞分化により SLC22A ファミリーの発現が変化し、分化した細胞では SLC22A2 の発現はみられなかった(図 3(a)-(c))。アセチルコリンの合成に関わる choline acetyl transferase の遺伝子発現とアセチルコリンの分泌は口腔ファイibroプラスト、ケラチノサイトともに検出された(図 3(d)-(e))。

これらの結果から、口腔粘膜組織には非神経性コリン作動系が存在していることが示唆された。今後、アセチルコリンの合成、分泌を促進する条件と、それをもとに小唾液腺との共培養における口腔乾燥モデルにおいて口腔乾燥の改善に有効な条件を検討していきたい。

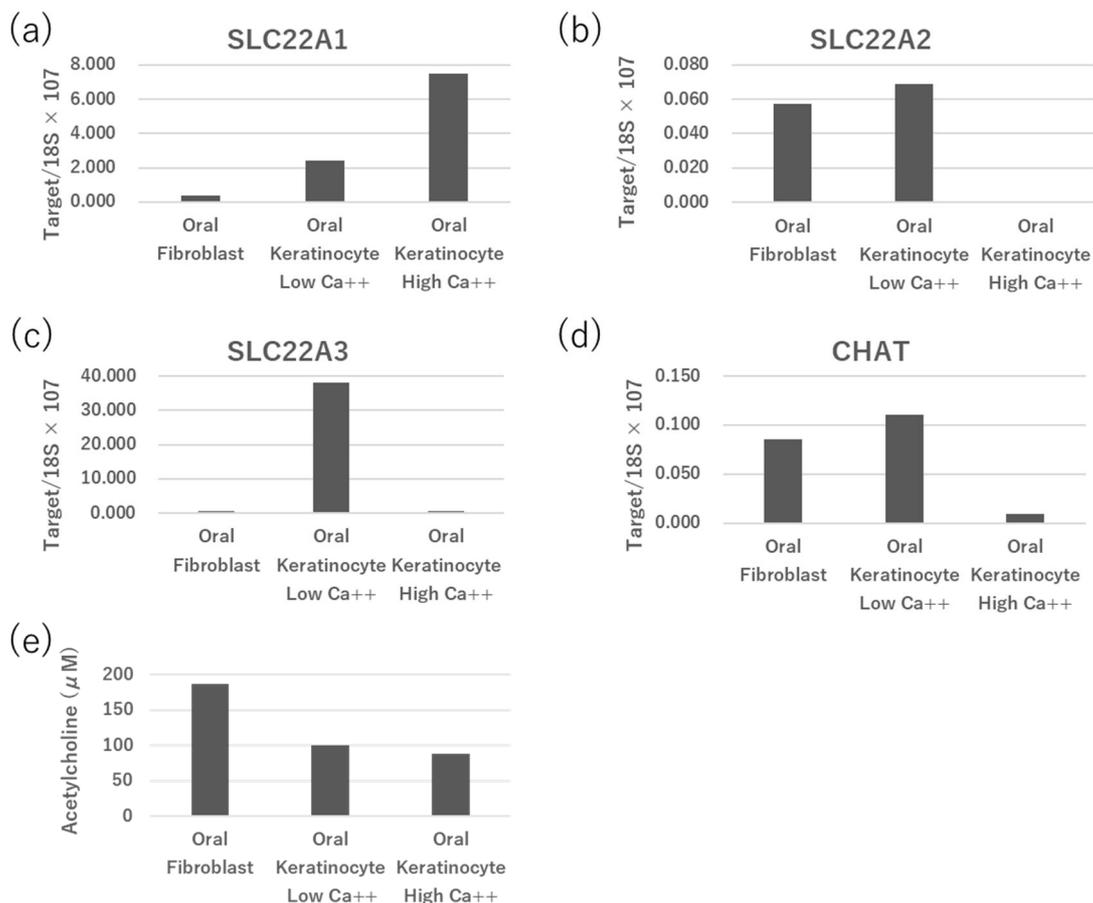


図 3(a)SLC22A1、(b)SLC22A2、(c)SLC22A3、(d)CHAT の遺伝子発現。アセチルコリンの分泌量(e)。

<参考文献>

1. Knox SM, Lombaert IM, Reed X, Vitale-Cross L, Gutkind JS, Hoffman MP. Parasympathetic innervation maintains epithelial progenitor cells during salivary organogenesis. *Science*. 2010 Sep 24;329(5999):1645-7.
2. Knox SM, Lombaert IM, Haddox CL, Abrams SR, Cotrim A, Wilson AJ, Hoffman MP. Parasympathetic stimulation improves epithelial organ regeneration. *Nat Commun*. 2013;4:1494.
3. Lin CY, Chang FH, Chen CY, Huang CY, Hu FC, Huang WK, Ju SS, Chen MH. Cell therapy for salivary gland regeneration. *J Dent Res*. 2011 Mar;90(3):341-6.
4. Meloni M, De Servi B, Marasco D, Del Prete S. Molecular mechanism of ocular surface damage: application to an in vitro dry eye model on human corneal epithelium. *Mol Vis*. 2011 Jan 12;17:113-26.
5. Rawlings AV, Matts PJ. Stratum corneum moisturization at the molecular level: an update in relation to the dry skin cycle. *J Invest Dermatol*. 2005 Jun;124(6):1099-110.
6. Takahashi, T. Non-neuronal functions of acetylcholine via muscarinic receptor subtypes: cellular proliferation and differentiation in mammals. *Neurotransmitter*, 2015, 2.
7. Nguyen VT, Hall LL, Gallacher G, Ndoye A, Jolkovsky DL, Webber RJ, Buchli R, Grando SA. Choline acetyltransferase, acetylcholinesterase, and nicotinic acetylcholine receptors of human gingival and esophageal epithelia. *J Dent Res*. 2000 Apr;79(4):939-49.
8. Kato H, Marcelo CL, Washington JB, Bingham EL, Feinberg SE. Fabrication of Large Size Ex Vivo-Produced Oral Mucosal Equivalents for Clinical Application. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015 Sep;21(9):872-80.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	照沼 美穂 (Terunuma Miho) (50615739)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究 分 担 者	泉 健次 (Izumi Kenji) (80242436)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関