

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17131

研究課題名（和文）低下した義歯の吸着を回復させるための唾液分泌機能亢進因子の検索

研究課題名（英文）Search for salivation-enhancing factor to recover reduced denture adsorption

研究代表者

横山 愛（YOKOYAMA, Megumi）

日本大学・松戸歯学部・専任講師

研究者番号：70610252

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では分泌機能が低下した唾液腺に対して、分泌機能を亢進させる因子を同定することを目的として研究を行った。

マウスの片側耳下腺排泄導管を結紮し、片側耳下腺の傷害モデルマウスを作製した。傷害側と非傷害側の耳下腺を用いてDNAマイクロアレイを用いた解析を施行した。コントロールの耳下腺と比較して、傷害側の耳下腺で発現量が2倍以上増加した遺伝子の中から分泌機能亢進因子の候補の抽出を行った。本研究で我々は、細胞の分化や増殖に関わる遺伝子として知られているBmp2を唾液腺機能亢進因子の候補として検討を進め、耳下腺腺房細胞初代培養細胞において、BMP2は細胞増殖を促進させる作用があることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唾液は口腔内環境を健康に保つために重要な役割を果たしている。高齢者は唾液の分泌量が低下することが知られている。本研究では、唾液分泌機能亢進因子としてBMP2を見出し、BMP2は腺房細胞を増殖させる役割があることを明らかにした。高齢化が進み、3人に1人が総義歯を使用する現在の社会において、唾液は義歯吸着にも関与していることから、唾液を産生する腺房細胞を増殖させる因子を見出したことは大変大きな意義がある。唾液の分泌機能を回復させる研究としては、器官再生による再生医療の研究が盛んにおこなわれている中で、高齢者へ侵襲がより少ない方法で唾液腺機能の回復を目指すことは学術的にも大いに意義がある。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to identify factors that enhance secretory function in salivary glands with reduced secretory function. The unilateral parotid gland excretory duct of the mouse was ligated to prepare a mouse model of unilateral parotid gland injury. Analysis using DNA microarray was performed using the injured, non-injured and control parotid glands. Candidates for secretory function-enhancing factors were extracted from genes whose expression levels were more than doubled in the injured parotid gland as compared to the control parotid gland. In this study, we focused on Bmp2, which is involved in cell differentiation and proliferation, as a candidate for enhancing salivary gland secretion function. It was revealed that BMP2 has the effect of promoting cell proliferation of primary cultured cells of parotid gland acinar cells.

研究分野：生理学

キーワード：唾液腺 分泌機能亢進因子 細胞増殖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

社会的背景：我が国の65歳以上の高齢者人口は年々増加し続けている。今後も高齢者人口は増加傾向が続くことが予測され平成29年版高齢社会白書によると、2065年には国民の約2.6人に1人が65歳以上の高齢者となり4人に1人が75歳以上の高齢者となると推計されている。高齢者は、ストレスや薬剤、咀嚼回数の減少や咀嚼力の低下などが原因となり、唾液分泌量が減少するため嚥下困難や口腔乾燥症を引き起こし、口腔内環境を著しく低下させ口腔内のトラブルが多くなる。また、義歯の吸着・接着不良や口腔粘膜炎の発症による義歯装着時の疼痛を引き起こす。歯の喪失状況は以前と比べると改善傾向にあるが、年齢が高くなるほど歯の喪失は進み、後期高齢者の平均残存歯数は約13本で、3人に1人が総義歯を使用しているのが現状である。また、頭頸部癌の罹患数も年々増加しており、総義歯だけでなく手術による欠損部を人工物で補填する顎義歯の需要も増えている。義歯の吸着については、義歯安定剤が販売されているが、一時的に症状を緩和させるために使用するものであり、その成分は消化されることから長時間の効果は期待できない。義歯の吸着には唾液が不可欠であり、低下した唾液分泌機能を回復させることは口腔内環境の改善、さらに義歯の吸着力も向上させることから、義歯使用患者が増加する今、高齢者の生活の質を向上させるためにとても重要である。

学術的背景：唾液腺は代償作用を有する臓器である。実験動物の唾液腺への放射線照射や排泄導管の結紮は唾液腺傷害モデルとしてよく用いられている。唾液腺に傷害が起こると、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機能が低下する。その傷害が片側の場合、反対側の唾液腺が唾液分泌量を増加させ傷害側の低下した唾液腺の機能を代償する。しかし、代償作用の分子メカニズムは明らかになっていない。我々はこれまでに、唾液腺の前駆細胞マーカーを検索する研究において、耳下腺の片側に傷害を加えると唾液腺において stem cell maker と言われる cytokeratin 5 のタンパク質発現量が傷害側で増加するが、続いて非傷害側の耳下腺でもその発現量が増加するという結果を得た。また、我々が唾液腺の幹細胞マーカーとして使用することが可能ではないかと予測している神経幹細胞マーカーの nestin についても同様の結果を報告している。また、片側耳下腺に傷害を加えると傷害側で細胞増殖能が増加するが、非傷害側でも偽手術マウスの耳下腺(コントロール)と比較して有意に細胞増殖能が増加することを確認している。顎顔面領域に左右に対で存在する主たる唾液腺である大唾液腺は神経支配も異なり、それぞれが独立したものであるにも関わらず、これらの結果が得られたことは、お互いの唾液腺が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大変興味深い。これまでに唾液腺の代償作用についての報告はそのほとんどが臨床報告であり、この現象のメカニズムを述べた研究はない。口腔乾燥症に対する唾液腺研究分野では唾液腺幹細胞の移入や残存する唾液腺幹細胞を活性化することで再生しようとする研究が行われているが、未だ幹細胞は同定されていない。唾液腺の再生について、新たな根治的治療として唾液腺原基を生体外で培養し唾液腺を作製し移植するという試みがなされている。現在進められている唾液腺を移植する方法では外科手術を施すことは必須である。高齢者への手術の侵襲は身体に与える影響が大きくリスクが高いと考える。このリスクを回避するために、外科手術を施すことなく唾液機能亢進因子を注射により移入させることで機能の回復を目指すことが望まれる。

2. 研究の目的

分泌機能が低下した唾液腺に対して分泌機能を亢進させる因子を同定することで、低下した唾液腺の機能を回復させ唾液分泌量を増加させることで義歯の吸着向上を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究開始前に、既に7週齢のマウスの片側耳下腺排泄導管を7日間マイクロクリップにて結紮を施した耳下腺のサンプル、同マウスの非結紮側の耳下腺のサンプル、コントロールとして擬似手術を行ったマウスから摘出した耳下腺のサンプルを用いたマイクロアレイの結果は得ていたため、本研究では結果の解析から研究を進めた。

まず、Gene Spring を用いて主成分分析、および階層的クラスタリング解析を行い、結紮側、非結紮側、コントロールの3種類のサンプルについての特徴を検索した。その後、唾液分泌機能亢進因子の候補を決定するために、結紮側でコントロールと比較して遺伝子発現量が2倍以上増加した遺伝子を検索した。結紮側で唾液分泌機能亢進因子の候補となった遺伝子および、非結紮側でその遺伝子のレセプターの発現をサンプルからRNA抽出後、Real-time PCRで検索した。続いて、唾液分泌機能を亢進させる候補因子の作用を検索するために、5週齢のマウスから耳下腺を摘出し、コラゲナーゼおよびヒアルロニダーゼによる細胞単離処理を行い、耳下腺腺房細胞の初代培養細胞を作製した。初代培養細胞に作用させる候補タンパク質の至適濃度の検討を行い、その後、候補タンパク質の効果を初代培養細胞に作用させ、細胞増殖アッセイキットで検討した。また、培養期間中に初代培養細胞が上皮系の機能を維持していることを確認するために、48時間培養後に上皮系マーカーである E-cadherin と、間葉系マーカーである vimentin タンパク質の発現をウェスタンブロット法で確認した。最後に、BMP2 が細胞増殖能を亢進させること

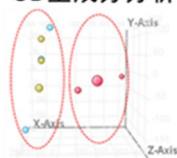
を検討するために、片側耳下腺排泄導管結紮を7日間行った耳下腺を用いてKi67抗体による組織染色で陽性細胞率を算出した。

4. 研究成果

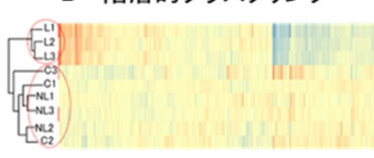
(1) マイクロアレイ解析

主成分分析および階層的クラスタリングの結果

A 3D主成分分析



B 階層的クラスタリング



■ 結紮側 (L) ■ 非結紮側 (NL) ■ コントロール (C)

主成分分析(図A)では、結紮側のサンプルは右側に、非結紮側とコントロールのサンプルは左側に分かっていた。階層的クラスタリング(図B)では、コントロールと非結紮側は枝が近いところに配置され、結紮側は枝が分かれて配置していた。これらのことから結紮側の唾液腺は非結紮側および

コントロールと比較すると明らかに成分に違いがあることが認められた。

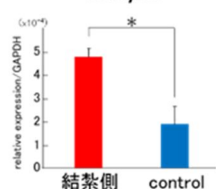
遺伝子発現量変化の検索

結紮側でコントロールと比較して、遺伝子発現量が2倍以上増加したのは、4,821 遺伝子あり、非結紮側でコントロールと比較して、遺伝子発現量が2倍以上増加したのは、1,040 遺伝子あり、その中で共通している遺伝子は473 遺伝子であった。研究計画調書では、結紮側耳下腺で目的遺伝子、非結紮側耳下腺で目的遺伝子に対するレセプターのどちらの遺伝子発現も増加しているものをターゲットとすることを計画していた。しかし、遺伝子およびそのレセプターの両方が2倍以上増加している候補を探すことが困難であった。従って、結紮側で遺伝子発現量が増加したのものの中から、今回は細胞分化や増殖因子としての働きがある fibroblast growth factor 2 (Fgf2、コントロールと比較した倍率変化 3.54 倍)と Bone Morphogenetic Protein2 (BMP2、コントロールと比較した倍率変化 3.33 倍)を唾液腺分泌機能亢進因子の候補として更に検討を進めることとした。

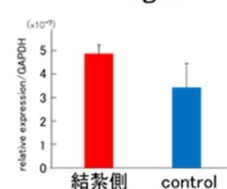
(2) 候補因子における遺伝子発現およびタンパク質発現

結紮側耳下腺における変化

C *Bmp2*



D *Fgf2*

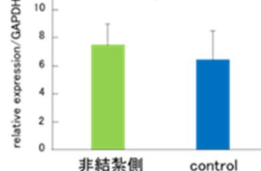


結紮側の *Bmp2*(図C)および *Fgf2*(図D)の遺伝子発現検索結果を示す。結紮側の *Bmp2* の遺伝子発現量は、コントロールと比較すると有意に増加した。しかし、*Fgf2* では有意差が認められなかった。*Bmp2* の発現で有意差が認められたため、BMP2 のタンパク質発現についても検索したが、遺伝子発現量は増加していたものの、タンパク質発現はコントロールと比較して増加傾向があるものの、有意差はなかった。この結果から

BMP2 は分泌されていることが推察され、その為にタンパク質発現に差が認められなかったのではないかと考えた。

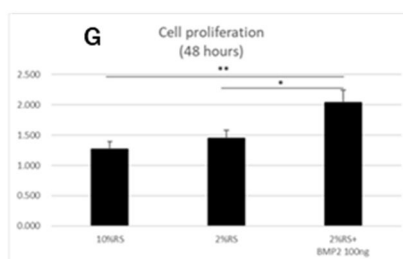
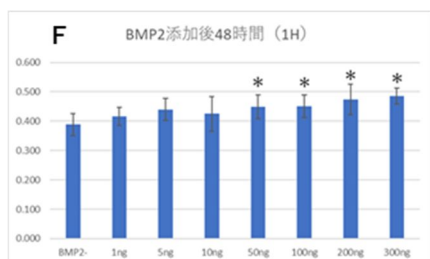
非結紮側耳下腺における変化

E *Bmpr1a*



非結紮側の耳下腺で BMP2 に対するレセプターである *Bmpr1a* の遺伝子発現を検討した(図E)。非結紮側での遺伝子発現量はコントロールと比較すると有意な差は無かったが増加傾向にあった。この結果から非結紮側では、*Bmpr1a* の遺伝子発現量は増加傾向にあるものの、コントロールと比較して有意差が認められなかったため、受容体の数は変化しないことが示唆された。

(3) 耳下腺腺房細胞初代培養細胞における BMP2 の至適濃度および作用時間の検討



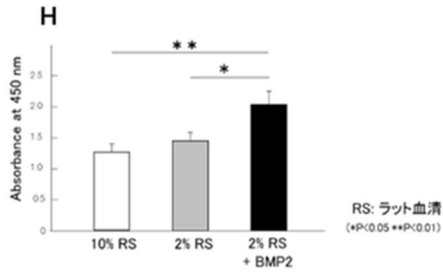
耳下腺腺房細胞初代培養細胞を作製した翌日に BMP2 タンパク質濃度を図 F に示したように 1ng/ml ~ 300ng/ml の濃度で作用させると、

50ng/ml 以上で細胞増殖における効果が確認できた。従って、至適濃度は操作性も考慮し 100ng/ml で進めて行くことを決定した。また、作用時間(図G)については、24 時間ではコントロール(10%RS、2%RS)と比較して差は無かったが、48 時間作用させると有意差が

認められたことから、48 時間で実験を進めていくことを決定した。これらのことから、初めて耳下腺腺房細胞初代培養細胞における BMP2 の至適濃度と作用時間が明らかとなった。

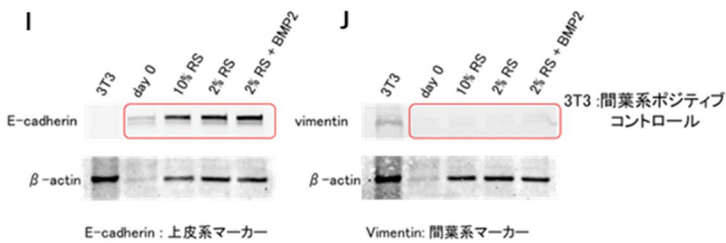
(4) 耳下腺腺房細胞初代培養細胞における BMP2 の効果

BMP2 を作用させ 48 時間後の細胞増殖能の結果を図 H に示す。コントロール群と比較して、BMP2 を添加した培養細胞では有意に細胞増殖能が増加した。



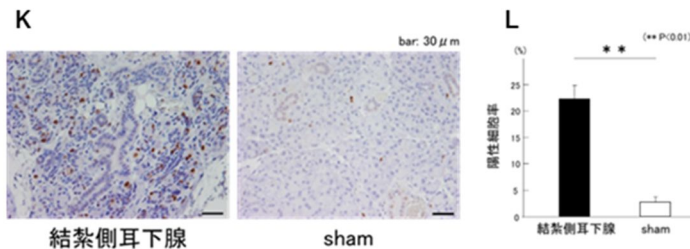
(5) 耳下腺腺房細胞初代培養細胞における E-cadherin および vimentin の検索

E-cadherin タンパク質発現 (図 I) は全ての培養細胞で検出され、一方で、vimentin タンパク質 (図 J) はどの培養細胞においても検出されなかった。このことから、細胞培養中も唾液腺の性質が維持されていることが証明された。



(6) 導管結紮における耳下腺の細胞陽性率の検索

導管結紮 7 日目の耳下腺の Ki67 染色の結果 (図 K) および陽性細胞率 (図 L) を示す。陽性細胞はコントロール (sham) の耳下腺と比較して、導管結紮を行った耳下腺で明らかに多く観察され、導管結紮を行った耳下腺で有意に陽性細胞率が増加した。



以上のことから、BMP2 は機能が低下した耳下腺で発現することが明らかとなり、その作用として耳下腺腺房細胞の増殖を誘導することが証明された。BMP2 は TGF- β スーパーファミリーに属している。TGF- β は様々な臓器の線維化の病態に関与することがよく知られている。しかし、興味深いことに BMP2 は TGF- β とは対照的に腎臓、肺、肝臓、膵臓では抗線維化作用がある。唾液腺においても、導管結紮による唾液腺の線維化で TGF- β が発現する。従って、導管結紮によって誘導される BMP2 は唾液腺の線維化に対抗しつつ、導管結紮による傷害からも唾液腺の機能を保持すべく、細胞増殖を促進させているのではないかと考えられる。

今後、唾液腺に対する BMP2 の更なる詳細な検討は必要であるが、本研究により唾液腺における BMP2 の作用が腺房細胞の増加を促進させるということが初めて明らかとなった。BMP2 が腺房細胞の増殖を促し、腺房細胞が増えることで唾液分泌機能の低下を改善させる可能性があると考えられる。

引用文献

Yang YL, Ju HZ, Liu SF, et al. BMP-2 suppresses renal interstitial fibrosis by regulating epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biochem* 2011; 112(9):2558-2565.
Shlyonsky V, Soussia IB, Naeije R, Mies F. Opposing effects of bone morphogenetic protein-2 and endothelin-1 on lung fibroblast chloride currents. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011; 45(6):1154-1160

Chung YH, Huang YH, Chu TH, et al. BMP-2 restoration aids in recovery from liver fibrosis by attenuating TGF- β 1 signaling. *Lab Invest* 2018: 98(8):999-1013.

Rastellini C, Han S, Bhatia V, et al. Induction of chronic pancreatitis by pancreatic duct ligation activates BMP2, apelin, and PTHrP expression in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2015: 309(7):G554-565.

Woods LT, Camden JM, El-Sayed FG, et al. Increased Expression of TGF- β Signaling Components in a Mouse Model of Fibrosis Induced by Submandibular Gland Duct Ligation. *PLoS One* 2015: 10(5):e0123641.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横山 愛, 加藤 治, 吉垣純子
2. 発表標題 唾液腺の分泌機能を亢進する因子の検索
3. 学会等名 第62回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Megumi Yokoyama, Osamu Katsumata-Kato, Junko Fujita-Yoshigaki
2. 発表標題 Search for salivary gland function-promoting factor in microarray analysis
3. 学会等名 IADR/AADR/CADR General Session & exhibition
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山 愛, 加藤 治, 吉垣純子
2. 発表標題 耳下腺傷害により増加するシグナル分子の検索
3. 学会等名 日本大学口腔科学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山 愛, 加藤 治, 吉垣純子
2. 発表標題 傷害を受けた唾液腺の代償作用を担う因子の検索
3. 学会等名 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山 愛、加藤 治、吉垣純子
2. 発表標題 網羅的遺伝子発現解析による唾液分泌機能亢進因子の検索
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 横山 愛、加藤 治、吉垣純子
2. 発表標題 マウス唾液腺における傷害に対する代償作用に関わる因子の検索
3. 学会等名 第63回日本唾液腺学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------