

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03852

研究課題名(和文) 遺伝子データベースとドラッグリポジショニングを活用した唾液腺再生の新戦略

研究課題名(英文) A new strategy for salivary gland regeneration using genetic database and drug repurposing

研究代表者

阪井 丘芳 (Sakai, Takayoshi)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：90379082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：唾液腺再生時にp63遺伝子の発現が上昇し、FGF7によって誘導されることを明らかにした。p53ファミリーの構成要素であるp63は、上皮組織の発生、恒常性、および再生において重要な役割を果たしている。唾液腺の導管結紮および放射線照射によって誘導されるp63の唾液腺再生における発現とその分子機構を解析した。p63アイソフォームであるNp63の発現が増加すると、筋上皮細胞においてケラチン5陽性細胞にp63が共局在した。Np63発現は、FGF7刺激によってp38 MAPKリン酸化を介して誘導され、唾液腺形成に影響を与えた。Np63は唾液腺再生の新しい候補分子になる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唾液腺再生時にp63遺伝子が発現すること、p63アイソフォームであるNp63がFGF7によって制御されることを見出した。さらに、p38 MAPKリン酸化を介したFGF7刺激によってNp63が調節され、唾液腺の形態形成に影響を与えることを明らかにした。すなわち、p38 MAPKのリン酸やFGF7刺激が誘導するNp63を制御できる薬剤を見出せば、唾液腺の再生を誘導できるかもしれない。薬剤を用いた臓器再生を誘導できる候補薬剤を見出す突破口になればと考えて、研究を継続している。

研究成果の概要(英文)：We found that the p63 gene is expressed during salivary gland regeneration and is regulated by FGF7. The transcription factor p63, a component of the p53 family, has important functions in the development, homeostasis, and regeneration of epithelial tissues. However, the role of p63 in the regeneration of exocrine glands, including the salivary glands (SGs), has not been fully investigated. We investigated p63 expression in SG regeneration induced by duct ligation and irradiation. The expression of Np63, a p63 isoform, increased and was colocalized with keratin 5 positive cells were myoepithelial cells. Furthermore, Np63 expression was regulated by FGF7 stimulation via p38 MAPK phosphorylation and affected SG morphogenesis. These results suggest that Np63 is essential for SG regeneration and may be a new target for regenerative treatment.

研究分野：外科系歯学

キーワード：唾液腺

1. 研究開始当初の背景

頭頸部がんの放射線治療後やシェーグレン症候群のドライマウスに対する治療法は確立されておらず、唾液分泌刺激薬や人工唾液を投与する対症療法に留まっているのが現状である。応募者は、大阪大学歯学部附属病院に口腔乾燥症(ドライマウス)専門外来を設立し、積極的に治療に取り組んできたが、画期的な治療法の構築が期待されている。損傷した唾液腺を再生する画期的な治療法の開発が期待されているが、複雑な組織構造を有する臓器を発生過程と同じように作製し、機能的に回復させるにはいくつもの障壁が存在する。

多くの臓器(唾液腺・肺・腎臓・乳腺・涙腺など)は、胎生期において上皮の塊が生じ立体的な分枝(枝分かれ)を繰り返し形成される。唾液腺の発生では、間葉組織に包まれた上皮細胞が増殖を繰り返し電球状になり分枝を開始する。腺房に cleft(切れ目)が生じて分枝が始まり、腺房 bud(先端部)の伸張(増殖)と cleft の形成を繰り返し、ブドウの房状の構造を形成する。なぜ特定部位に cleft を形成し、bud を伸張し、臓器形成を進めるのかは不明であり、臓器の形成機構を再生に応用できるのではないかと考えている。臓器形成を誘導する遺伝子を見出し、薬剤等で遺伝子発現を高めることができれば、臨床現場において直ちに臓器再生に貢献できるかもしれない。本課題の核心となる学術的な背景である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、唾液腺の発生機構に注目して唾液腺形成や再生に重要な遺伝子を発見し、臓器再生に役立つ薬剤を見出すことである。研究方法として、唾液腺の形成に関する重要な遺伝子を発見し、その遺伝子発現を誘導できるような薬剤を探索する。唾液腺障害モデルを用いてその薬剤を再生医療に応用する。将来的には、唾液腺で得られた知見を活用し、肺・腎臓・乳腺・涙腺などの臓器の再生医療に発展させることを目標としている。応募者が開発した T7-SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) 法を用いて、2015 年度: 基盤研究(A)「唾液腺をモデルとした 3 次元的臓器再生技術の開発」において、cleft(切れ目)と bud(先端部)の唾液腺上皮に発現する遺伝子群を同定した(NCBI Gene Expression Omnibus (GEO)に GSM555989 と GSM555990 として登録)。本計画はそのデータベースを応用した発展研究として遺伝子情報を元に再生医療への実現を目指している。

3. 研究の方法

マウス胎仔の唾液腺 cleft と bud に強く発現する遺伝子・分子に着目し、その発現を誘導する薬剤を見出す。放射線照射と導管結紮モデルにて、障害抑制効果・回復効果を検証する。

(1) データベースの中から cleft 形成と bud 伸張に関与する遺伝子の探索

応募者が自ら確立し NCBI に登録したデータベース(NCBI GEO: GSM555989, GSM555990)を元に研究を進める。cleft や bud に発現する遺伝子や分子を in situ hybridization や免疫染色(抗体が存在する場合)で局在を明らかにする。

(2) 候補遺伝子・分子の発現を誘導する薬剤の探索

特許切れ既存薬だけの化合物ライブラリー Prestwick Chemical Library (PCL) (Drug Discov Today 11:160-4, 2006) を活用する。これらの化合物は米国 FDA や欧州など世界で認可された既存薬で、常に最新情報がアップデートされており、特許が切れているために制約なく使用できる。総数は 1280 種類であり、日本への輸入が困難な麻薬類を除いた 1269 種類の化合物ライブラリーを用いる。既存薬ライブラリー-PCL を添加した 96 穴プレート 14 枚を用いて、マウス唾液腺上皮細胞(SCA 9)とヒノキ腎臓上皮細胞(MDCK) 胎生 13 日目の唾液腺を培養する。培養後、細胞や組織を採取し、total RNA を抽出後、定量的 real-time PCR を用いて、候補の遺伝子発現を上昇させる薬剤を選択する。

(3) 選択薬剤の増殖・アポトーシスに対する活性の確認

前のステップと同様に細胞や組織を採取し、細胞周期に関係する CyclinD1 の活性化、細胞増殖(EdU)、アポトーシス(TUNEL)を解析する。分化に関する ERK1/2、AKT のリン酸化、阻害剤を用いてシグナル伝達機構を解析し、薬剤の作用メカニズムを明らかにし、候補薬剤を絞り込む。

(4) 放射線照射に対する薬剤の障害抑制効果の判定 ~ 胎仔唾液腺 ~

放射線照射装置(MX-80 Labo, MediXtech 社)を用いて、器官培養中の胎仔唾液腺に放射線 4Gy を照射する。照射 2 日後に腺房が強い障害を受け、細胞増殖が抑制され、腺房上皮細胞間の空隙が大きくなる。器官培養前に選択薬剤を添加し、障害抑制効果を形態学的に検証する。

(5) 放射線照射に対する薬剤の障害抑制効果の判定～成体唾液腺～

6週齢成体マウス顎下腺に放射線 9Gy を照射する。照射2週間後、6週間後に腺房が強い障害を受けて細胞増殖が抑制され、腺房上皮細胞間の空隙が大きくなる。前段階で候補となった選択薬剤をマウス腹腔内に前投与し、障害抑制効果を組織学的に判定する。

(6) 導管結紮による損傷モデルを用いた薬剤の障害抑制効果の判定

6週齢成体マウス耳下腺主導管を絹糸で結紮すると、7日目に耳下腺の重量が低下し、組織学的にも腺房萎縮と細胞間隙の増加を認める。絹糸を解放すると、約14日目には耳下腺の組織学的な修復を観察できる。導管結紮・解放実験は、放射線照射とは異なり、短期間での可逆反応を観察するのに有効であり、予備実験は成功している。前段階で候補となった選択薬剤を局所投与し、器械的な障害に対する短期間での回復効果を組織学的に検証する。

4. 研究成果

研究方法1)の遺伝子探索に時間を費やしたが、Bud上皮に、既知の遺伝子であるp63を見出した。P63は、P53ファミリーの構成要素の転写因子の1つであり、上皮組織の発生、恒常性、および再生において重要な機能を有している。そのため計画を円滑に遂行するために、まずp63の唾液腺再生における機能解析を先行した。

p63遺伝子が唾液腺再生時に発現すること、FGF7によって発現が誘導されることを見出した。p63が唾液腺の導管結紮および放射線照射によって誘導されることから、唾液腺再生におけるP63発現分布と分子機構を解析した。p63アイソフォームであるNp63の発現が増加し、筋上皮細胞に存在するケラチン5陽性細胞と共局在化した。Np63発現は、FGF7刺激によって発現が誘導され、p38 MAPKリン酸化を介して、唾液腺の形態形成に関与していることが明らかになった。以上の結果から、Np63は唾液腺の再生にとって不可欠であり、再生治療の新しい候補分子になること、薬剤探索時の重要な指標となることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計22件（うち査読付論文 21件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 15件）

1. 著者名 Sarper SE, Inubushi T, Kurosaka H, Ono Minagi H, Murata Y, Kuremoto KI, Sakai T, Taniuchi I, Yamashiro T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Anterior cleft palate due to Cbfb deficiency and its rescue by folic acid.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dis Model Mech.	6. 最初と最後の頁 dmm038851
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dmm.038851	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Sakai M, Fukumoto M, Ikai K, Ono Minagi H, Inagaki S, Kogo M, Sakai T.	4. 巻 286
2. 論文標題 Role of the mTOR signalling pathway in salivary gland development.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS J.	6. 最初と最後の頁 3701 ~ 3717
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.14937	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka N, Nohara K, Ueda A, Katayama T, Ushio M, Fujii N, Sakai T.	4. 巻 19
2. 論文標題 Effect of aspiration on the lungs in children: a comparison using chest computed tomography findings.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Pediatr.	6. 最初と最後の頁 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12887-019-1531-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ono Minagi H, Yamanaka Y, Sakai T	4. 巻 47
2. 論文標題 Evaluation of the Saxon test for patients with hyposalivation without Sjogren's syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Rehabilitation	6. 最初と最後の頁 1550 ~ 1556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/joor.13093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ikai K, Sakai M, Ono Minagi H, Gojo N, Sakai T	4. 巻 594
2. 論文標題 Np63 is upregulated during salivary gland regeneration following duct ligation and irradiation in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 3216 ~ 3226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13896	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohki S, Oka K, Ogata K, Okuhara S, Rikitake M, Toda-Nakamura M, Tamura S, Ozaki M, Iseki S, Sakai T	4. 巻 11
2. 論文標題 Transforming growth factor-beta and sonic hedgehog signaling in palatal epithelium regulate Tenascin-C expression in palatal mesenchyme during soft palate development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2020.00532	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsumura E, Nohara K, Tanaka N, Fujii N, Sakai T	4. 巻 62
2. 論文標題 A survey on medications received by elderly persons with dysphagia living at home or in a nursing home	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 239 ~ 241
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnusd.19-0370	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uchida Y, Nohara K, Tanaka N, Fujii N, Fukatsu H, Kaneko N, Mitsuyama M, Sakai T	4. 巻 34
2. 論文標題 Comparison of saccharin time in nursing home residents with and without pneumonia: a preliminary study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 845 ~ 848
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.11847	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ono Minagi H, Usami Y, Sakai M, Sakai T	4. 巻 229
2. 論文標題 Morphological differences between regenerating salivary glands after salivary gland duct ligation and embryonic salivary glands	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Anatomy	6. 最初と最後の頁 151482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aanat.2020.151482	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Usami Y, Hirose K, Okumura M, Toyosawa S, Sakai T	4. 巻 18
2. 論文標題 Brief communication: Immunohistochemical detection of ACE2 in human salivary gland	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oral Science International	6. 最初と最後の頁 101 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/osi2.1085	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fukatsu H, Nohara K, Tanaka N, Fujii N, Sakai T.	4. 巻 14
2. 論文標題 The impact of different medical complications on the feasibility of removing the feeding tube from infants with dysphagia.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Pediatr Rehabil Med	6. 最初と最後の頁 371 ~ 377
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3233/PRM-200786	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kimura T, Sakai M, Gojo N, Watanabe M, Uzawa N, Sakai T.	4. 巻 631
2. 論文標題 HIF-1 regulates mTOR signaling pathway during salivary gland development.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 130 ~ 137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.09.078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Arikawa E, Kaneko N, Nohara K, Tanaka N, Mitsuyama M, Sakai T.	4. 巻 64
2. 論文標題 Influence of gustatory and olfactory functions on appetite and nutritional status in older persons.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Oral Sci	6. 最初と最後の頁 319 ~ 321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnugd.22-0064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakai M, Sakai T.	4. 巻 2
2. 論文標題 Establishment of a Mouse Submandibular Salivary Gland Organ Culture.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Curr Protoc	6. 最初と最後の頁 e543
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cpz1.543	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka N, Nohara K, Uota C, Fujii N, Obana A, Tanaka K, Sakai T.	4. 巻 22
2. 論文標題 Relationship between daily swallowing frequency and pneumonia in patients with severe cerebral palsy.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Pediatr	6. 最初と最後の頁 485
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12887-022-03547-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Noguchi T, Tachibana K, Inoue T, Sakai T, Tsujikawa K, Fujio Y, Yamagishi Y, Hamaguchi S, Kutsuna S, Kondoh M.	4. 巻 477
2. 論文標題 Safety evaluation of MA-T after ingestion in mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Toxicology	6. 最初と最後の頁 153254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tox.2022.153254	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Urakawa R, Shibata T, Sogou M, Takamori K, Inoue T, Konishi K, Sakai T.	4. 巻 45
2. 論文標題 The Bactericidal Effect of MA-T for Factitiously Contaminated and Used Masks.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull	6. 最初と最後の頁 757 ~ 762
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kimura T, Sakai M, Gojo N, Watanabe M, Uzawa N, Sakai T.	4. 巻 12
2. 論文標題 The HIF-1 pathway plays a critical role in salivary gland development in ex vivo organ cultures.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 460 ~ 469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13351	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Minagi HO, Yamanaka Y, Nohara K, Ikai K, Sakai T.	4. 巻 26
2. 論文標題 Analysis of medication-induced xerostomia in elderly Japanese patients.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clin Oral Investig	6. 最初と最後の頁 2021-2029
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00784-021-04182-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ono-Minagi H, Gojo N, Nohno T, Inoue T, Ohuchi H, Sakai T.	4. 巻 23
2. 論文標題 Evaluation of oral care using MA-T gel for high-risk patients: a pilot study.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Oral Health	6. 最初と最後の頁 108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12903-023-02779-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kano F, Hashimoto N, Liu Y, Xia L, Nishihara T, Oki W, Kawarabayashi K, Mizusawa N, Aota K, Sakai T, Azuma M, Hibi H, Iwasaki T, Iwamoto T, Horimai N, Yamamoto A.	4. 巻 13
2. 論文標題 Therapeutic benefits of factors derived from stem cells from human exfoliated deciduous teeth for radiation-induced mouse xerostomia.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 2706
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-29176-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka J, Senpuku H, Ogawa M, Yasuhara R, Ohnuma S, Takamatsu K, Watanabe T, Mabuchi Y, Nakamura S, Ishida S, Sadaoka T, Takaki T, Shirota T, Shimane T, Inoue T, Sakai T, Mori M, Tsuji T, Saito I, Mishima K.	4. 巻 24
2. 論文標題 Human induced pluripotent stem cell-derived salivary gland organoids model SARS-CoV-2 infection and replication.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nat Cell Biol	6. 最初と最後の頁 1595 ~ 1605
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-022-01007-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔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	野原 幹司 (Nohara Kanji) (20346167)	大阪大学・大学院歯学研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	福本 敏 (Fukumoto Satoshi) (30264253)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	

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