

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月12日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390534

研究課題名（和文） 遺伝子データベースを利用した唾液腺再生治療の試み

研究課題名（英文） Trial of regeneration therapy for salivary gland using gene expression database

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

研究成果の概要（和文）：本研究は、口腔乾燥症（ドライマウス）の新しい治療法を開発するために、唾液腺再生をめざして、臓器形態形成機構を解明することを目的としている。具体的には、胎生期マウスの唾液腺の分枝部位(cleft)と非分枝部位(bud)から、上皮組織を摘出し、遺伝子発現のデータベースを作製し、分枝形態形成に寄与する新規遺伝子群を探索した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this research is to clarify the molecular mechanism of organ formation for the new treatment of dry mouth. Global database of gene expression in salivary gland epithelia from cleft and bud were profiled, and new genes that could be important for branching morphogenesis were explored.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：臓器、再生、唾液腺、分枝、形態形成、口腔乾燥症

## 1. 研究開始当初の背景

病気や事故などで失われた臓器や組織を修復する再生医療は、さまざまな難病の治療に使えると期待されている。申請者はシェーグレン症候群や口腔癌術後、加齢に由来する口腔乾燥症（ドライマウス）の臨床治療に取り組んできた。ドライマウスの治療法は対症療法が主体であり、腺組織を再生させる等の画期的な治療法の開発が期待されている。現在のところ、皮膚や骨に関しては、再生医療研究が進み、臨床応用が期待されているが、細胞から複雑な臓器を形成し、機能回復に至る

までは進んでおらず、2次元的な細胞の集合から3次元的な臓器の完成には大きな障壁が存在する。

## 2. 研究の目的

胎生期において、多くの臓器（肺、唾液腺、腎臓、前立腺など）は、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。分枝はこれらの臓器形成にとり、必須の現象であり、臓器再生の鍵を握っていると考えられる。本研究では、形態観察しやすいマウス胎仔唾液腺を分枝のモデルとして用い、

形態形成に寄与する新規遺伝子群を明らかにすることを目的としている。将来的には、これらの基礎データをもとに、機能的に低下した腺組織と再生した唾液腺とを置換する組織再生療法を試みることを目標としている。

### 3. 研究の方法

胎生期唾液腺の cleft (切れ目) と bud (先端部) の上皮の遺伝子発現を比較し、既知の遺伝子、新規遺伝子も含めて、分枝に対する遺伝子群を明らかにする。分枝を制御している遺伝子をスクリーニングするために、連続的遺伝子発現解析法: SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) 法を用いる (www.sagenet.org)。申請者自身が T7-based RNA amplification 法を組み合わせた T7-SAGE 法を開発した。本研究では T7-SAGE 法を用いて、臓器、特にマウス胚の唾液腺の分枝部位と非分枝部位の遺伝子群のデータベースを構築する。そして、その情報をもとに、それぞれの遺伝子の分枝形態形成における機能を解析する。

### 4. 研究成果

#### (1) 唾液腺の分枝形態形成に関わる遺伝子のスクリーニング

cleft と bud 領域の上皮組織から T7-SAGE ライブラリーを作製し、それぞれの領域に発現する遺伝子群を同定した。cleft/bud として比較し、cleft に強く発現する遺伝子に着目した。

#### (2) cleft 上皮に特異的に発現する遺伝子の発現量・発現分布確認

定量的 real-time PCR と in situ hybridization 法を用いて、同定した遺伝子の中に Btbd7 が存在し、cleft に強く発現していることを確認した。

#### (3) 器官培養を用いた RNA 干渉 (siRNA, small interfering RNA) 法による阻害実験

Btbd7 の siRNA を作製し、器官培養中の唾液腺に導入したところ、分枝形態形成が阻害され、分枝形態形成に関与する可能性が示唆された。

#### (4) 器官培養を用いた遺伝子導入実験

アデノウイルス等を用いて、唾液腺に Btbd7 を強制発現させたところ、分枝形成が誘導された。哺乳類の臓器への遺伝子導入は安定した結果が得られず、過去の研究においても成功例が少ないのが現状である。技術的に改良を加え、人工唾液腺臓器モデルの開発へと研究を発展させる予定である。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Tanaka N, Nohara K, Okuno K, Kotani Y, Okazaki H, Matsumura M, Sakai T, Development of a swallowing frequency meter using a laryngeal microphone. Journal of Oral Rehabilitation, in press (査読有)
- ② Miyajima H, Matsumoto T, Sakai T, Yamaguchi S, An SH, Abe M, Wakisaka S, Lee KY, Egusa H, Imazato S, Hydrogel-based biomimetic environment for in vitro modulation of branching morphogenesis. Biomaterials 32, 6754-6763, 2011 (査読有)
- ③ Onodera T, Sakai T, Hsu JC, Matsumoto K, Chiorini JA, Yamada KM. Btbd7 Regulates Epithelial Cell Dynamics and Branching Morphogenesis. Science 329, 562-565, 2010, Sakai T: corresponding author and equally contributed first author (査読有)
- ④ Nohara K, Kotani Y, Sasao Y, Ojima M, Tachimura T, Sakai T. Effect of a Speech Aid Prosthesis on Reducing Muscle Fatigue. Journal of Dental Research 89, 478-481, 2010 (査読有)
- ⑤ Sakai T, Onodera T, Yamada KM. Cleft Formation and Branching morphogenesis of Salivary Gland: Exploration of New Functional Genes. Interface Oral Health Science 2009, 13-19, 2010 (査読無)
- ⑥ 田中信和、野原幹司、小谷泰子、岡崎浩也、松村雅史、阪井丘芳、喉頭マイクروفオンを用いた嚥下回数測定デバイスの開発、日本摂食・嚥下リハビリテーション学会誌 14(3)、229-237、2010 (査読有)
- ⑦ 奥野健太郎、野原幹司、佐々生康宏、阪井丘芳、下顎に装着する嚥下補助装置が有効であった舌悪性腫瘍術後の 3 症例、日本摂食・嚥下リハビリテーション学会誌 14(3)、279-287、2010 (査読有)

- ⑧ 河合利彦、館村卓、外山義雄、阪井丘芳、非ニュートン性液状食品の嚥下時の口蓋帆挙筋活動、日本摂食・嚥下リハビリテーション学会誌 14(3)、265-270、2010 (査読有)
- ⑨ 深津ひかり、野原幹司、佐々生康宏、尾島麻希、小谷泰子、阪井丘芳、内視鏡を用いた嚥下直前の食塊の観察、日本摂食・嚥下リハビリテーション学会誌 14(1)、27-32、2010 (査読有)
- ⑩ Sakai T. Epithelial Branching Morphogenesis of Salivary Gland: Exploration of New Functional Regulators. Journal of Medical Investigation 56, 234-238, 2009 (査読無)
- ⑪ 尾島麻希、長野有美、野原幹司、阪井丘芳、ドライマウス患者における黒豆エキスシロップの有用性について、FFI ジャーナル 214(4)、498-502、2009 (査読有)
- ⑫ 尾島麻希、野原幹司、阪井丘芳、啼泣時や会話時に顔面非対称を呈し歯科を受診した4例、障害者歯科 30(2)、116-119、2009 (査読有)
- ⑬ 河合利彦、館村卓、外山義雄、阪井丘芳、低粘性液状食品の粘性の相違が嚥下時の口蓋帆挙筋活動におよぼす影響、日本摂食・嚥下リハビリテーション学会誌 13(2)、128-134、2009 (査読有)
- ⑭ 佐々生康宏、奥野健太郎、野原幹司、阪井丘芳、睡眠時無呼吸症候群治療における歯科の役割第2回—口腔内装置の治療効果予測—、睡眠医療 3(1)、97-102、2009 (査読有)
- [学会発表] (計 28 件)
- ① 田中信和、野原幹司、辻聡、小谷泰子、尾島麻希、阪井丘芳、唾液量および嚥下頻度とGERD自覚症状の強さとの関係、第28回日本障害者歯科学会総会および学術大会、福岡、2011年11月4日
- ② 若杉葉子、野原幹司、小谷泰子、尾島麻希、奥野健太郎、阪井丘芳、誤嚥の有無と炎症反応—VE、VFとCRPの比較—、第28回日本障害者歯科学会総会および学術大会、福岡、2011年11月4日
- ③ 美馬淳子、越野綾、内田仁司、野原幹司、古郷幹彦、檜枝洋紀、阪井丘芳、口蓋突起癒合時における葉酸摂取とCEACAM1の関係、第56回日本口腔外科学会総会・学術大会、大阪、2011年10月22日 (優秀口演賞受賞演題)
- ④ 奥野健太郎、野原幹司、佐々生康宏、阪井丘芳、下顎に装着する嚥下補助装置が有効であった舌悪性腫瘍術後の3症例、第56回日本口腔外科学会総会・学術大会、大阪、2011年10月22日
- ⑤ 中村祐己、佐々生康宏、奥野健太郎、野原幹司、阪井丘芳、閉塞型睡眠時無呼吸症候群における内視鏡を用いた気道形態の動的評価、第56回日本口腔外科学会総会・学術大会、大阪、2011年10月22日
- ⑥ 松野頌平、深津ひかり、野原幹司、佐々生康宏、阪井丘芳、内視鏡を用いて評価した口腔腫瘍術後患者の食塊形成機能、第56回日本口腔外科学会総会・学術大会、大阪、2011年10月22日
- ⑦ 高井英月子、野原幹司、佐藤耕一、古郷幹彦、阪井丘芳、VFによる発音時の軟口蓋の速さ解析・健常成人および口蓋裂症例について、第56回日本口腔外科学会総会・学術大会、大阪、2011年10月22日
- ⑧ 佐藤耕一、高井英月子、野原幹司、山西整、石浜孝二、阪井丘芳、古郷幹彦、Furlow法またはPush-back法による口蓋裂術後の軟口蓋の形態的検討、第56回日本口腔外科学会総会・学術大会、大阪、2011年10月22日
- ⑨ 奥野健太郎、佐々生康宏、中村祐己、野原幹司、阪井丘芳、口腔内装置装着によりCPAP至適圧が減少した1例、日本睡眠学会第36回定期学術集会、京都、2011年10月15日
- ⑩ 辻 聡、野原幹司、田中信和、小谷泰子、尾島麻希、阪井丘芳、唾液量および嚥下頻度とGERD自覚症状の強さとの関係、第22回日本老年歯科医学会学術大会、東京、2011年6月16日
- ⑪ 小谷泰子、野原幹司、尾島麻希、佐々生

- 康宏、阪井丘芳、在宅における嚥下内視鏡検査の普及を目指して NPO法人における卒後研修、第22回日本老年歯科医学会学術大会、東京、2011年6月16日
- ⑫ 松野頌平、深津ひかり、野原幹司、佐々生康宏、阪井丘芳、内視鏡を用いて評価した高齢者の食塊形成機能、日本老年歯科医学会第22回学術大会、東京、2011年6月16日
- ⑬ 美馬淳子、古郷幹彦、吉岡秀郎、野原幹司、檜枝洋記、阪井丘芳、口蓋突起癒合時における葉酸摂取とCEACAM 1 の関係、第35回日本口蓋裂学会総会・学術集会、新潟、2011年5月25日
- ⑭ 日景朱美、野原幹司、杉山千尋、宮本勝行、越野綾、阪井丘芳、口蓋化構音を認めた成人機能性構音障害の訓練経過、第35回日本口蓋裂学会総会・学術集会、新潟、2011年5月25日
- ⑮ 越野綾、野原幹司、小谷泰子、杉山千尋、高井英月子、阪井丘芳、大阪大学歯学部附属病院顎口腔機能治療部における唇顎口蓋裂初診患者の臨床統計、第35回日本口蓋裂学会総会・学術集会、新潟、2011年5月25日
- ⑯ 高井英月子、野原幹司、佐藤耕一、越野綾、阪井丘芳、VFにおける発音時の軟口蓋の速度解析-健常成人および口蓋裂症例について-、第35回日本口蓋裂学会総会・学術集会、新潟、2011年5月25日
- ⑰ 杉山千尋、野原幹司、越野綾、宮成典、山西 整、古郷幹彦、阪井丘芳、Furlow法とpushback法による口蓋形成術後のnasalance scoreの比較、第35回日本口蓋裂学会総会・学術集会、新潟、2011年5月25日
- ⑱ Mima J, Kogo M, Nohara K, Hieda Y, Sakai T. The Relationship Between Folic Acid and Palatal Fusion. The 68th Annual Meeting of American Cleft Palate-craniofacial Association, Puerto Rico, USA, April 4, 2011
- ⑲ 上田菜美、野原幹司、小谷泰子、阪井丘芳、Videofluorographyにおける嚥下時の舌骨の運動速さ、第22回NPO法人日本口腔科学会近畿地方部会、大阪、2010年11月27日
- ⑳ 田中信和、野原幹司、小谷泰子、阪井丘芳、高齢者の日常生活における嚥下頻度、第22回NPO法人日本口腔科学会近畿地方部会、大阪、2010年11月27日
- ㉑ 杉岡奈緒、尾島麻希、野原幹司、辻聡、阪井丘芳：ドライマウス外来患者の唾液量と適切な保湿剤選択に関する検討 第27回障害者歯科学会学術大会、東京、2010年10月24日
- ㉒ 河合利彦、山内義之、館村卓、阪井丘芳、寝たきり高齢者への口腔ケアが循環動態に及ぼす影響、第27回日本障害者歯科学会学術大会、東京、2010年10月24日、東京
- ㉓ 美馬淳子、古郷幹彦、野原幹司、檜枝洋記、阪井丘芳、マウス口蓋形成における細胞接着因子CEACAM 1 の機能解析、第34回日本口蓋裂学会総会・学術集会、東京、2010年5月27日
- ㉔ Mima J, Kogo M, Nohara K, Tanaka S, Hieda Y, Sakai T. CEACAM1 Requirement in Mouse Embryonic Palatal Fusion. The 67th Annual Meeting of American Cleft Palate-craniofacial Association, Texas, USA, March 15, 2010
- ㉕ Mima J, Kogo M, Nohara K, Tanaka S, Hieda Y, Sakai T. Microanalysis of Global Gene Expression in Mouse Embryonic Tissue of Palatal Fusion. The 11th International Confederation for Cleft Lip and Palate and Related Craniofacial Anomalies. Brazil, September 10, 2009
- ㉖ Miyajima H, Matsumoto T, SangHyun A, Sakai T, Soumura T. Effect of Substrate Stiffness on Branching Morphogenesis of Mouse Submandibular Gland. The 2nd TERMIS Congress in conjunction with 2009 Seoul Cell Symposium, Seoul, Korea, August 31, 2009
- ㉗ 美馬淳子、古郷幹彦、野原幹司、檜枝洋

記、阪井丘芳、マウス胎生期口蓋癒合過程におけるCEACAM1の役割、第33回日本口蓋裂学会総会・学術集会、東京、2009年5月28日

- ⑳ Mima J, Kogo M, Nohara K, Hieda Y, Sakai T. The Role of CEACAM1 in Mouse Embryonic Palatal Fusion. The 66th Annual Meeting of American Cleft Palate-craniofacial Association, Arizona, USA, April 20, 2009

〔図書〕（計 1 件）

- ① 阪井丘芳、Btbd7 は上皮細胞の動態と分枝形態形成を制御する、サイエンス誌に載った日本人研究者 2010, 50, 2011

〔その他〕

ホームページ等

- ① The Impossible Will Take A Little While -Defining A Key Developmental Pathway in the Salivary Gland-, Interviews with Oral Health Researchers, National Institutes of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health, October 26, 2010, <http://www.nidcr.nih.gov/Research/ResearchResults/InterviewsOHR/Clefting.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

野原 幹司 (NOHARA KANJI)  
大阪大学・歯学部附属病院・助教  
研究者番号：20346167

### (3) 連携研究者

福本 敏 (FUKUMOTO SATOSHI)  
東北大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：30264253  
(H22 まで研究分担者、H23 から連携研究者として参画)