

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792144

研究課題名(和文)唾液腺幹細胞より再構築した唾液腺移植による再生医療法の開発

研究課題名(英文)Development of regenerative medicine method by salivary gland transplantation reconstructed from salivary gland stem cells

研究代表者

碓 竜也 (IKARI, TATSUYA)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：70380467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：T-box転写因子であるBrachyuryが発生過程における転写制御因子に関与することが明らかになりつつある。本研究ではマウス唾液腺発生におけるBrachyuryの役割について検討した。胎生期マウス顎下腺において発生初期に限局してBrachyury遺伝子の発現増加を認めた。siRNAを用いたノックダウンではcleft形成や分枝形成が抑制された。また、Brachyuryはcleft形成に関与するfibronectin、Btd7の発現も制御していた。さらに、幹細胞に関わるSox2の発現も制御していたことから、Brachyuryがマウス唾液腺発生において中心的な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study demonstrated the involvement of the T-box transcription factor Brachyury in early-stage embryonic mouse salivary gland development. RT-PCR and immunoblotting revealed that the expression of Brachyury increased in the SMG and peaked between E12.5-13.5, concomitant with the early stage of branching morphogenesis. In addition, fibronectin and Btd7 (which is regulated by fibronectin), which are both essential for cleft formation, were expressed strongly during the same period. Furthermore, the Sox2 genes, which regulates cell growth, was also strongly expressed during E12.5-13.5. When Brachyury was knocked down in SMG rudiments in organ culture, cleft formation was suppressed, and branching morphogenesis was inhibited. The expression of Sox2, fibronectin and Btd7 were also suppressed by knockdown of the Brachyury gene, suggesting that Brachyury plays a central role in regulating cell growth and cleft formation in early-stage embryonic mouse salivary gland development.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：唾液腺 幹細胞 再生医療

1. 研究開始当初の背景

唾液腺は、唾液分泌を介した摂食機能、咀嚼機能、嚥下機能、口腔衛生状態の維持、上部消化管としての消化機能などを担う重要な組織である。シェーグレン症候群、頭頸部癌治療に対する放射線治療などによって引き起こされる口腔乾燥症は、齲蝕、細菌感染、咀嚼機能障害、嚥下機能障害や味覚障害など様々な臨床症状を引き起こし、口腔の機能のみならず全身の健康維持にも大きな影響を及ぼす。従来、口腔乾燥症に対しては人工唾液投与や保湿剤の使用などの対症療法が行われてきた。近年、ムスカリン受容体に作用し唾液分泌を誘導するピロカルピン塩酸塩や塩酸セビメリンなどの副交感神経作動薬を用いて、残存した唾液腺の機能を刺激する治療が行われるようになり、一定の効果が得られているが、組織破壊が進行した唾液腺障害に対しては十分な効果が得られていない。このため、唾液腺再生による機能回復が望まれているが、皮膚や軟骨などの再生医療と比

較すると、唾液腺における再生医療の研究は十分に進んでいない。それゆえ、唾液腺機能を回復させることが出来る新たな治療法の開発が望まれている。多くの上皮性器官は、発生の決められた段階における特定の間葉組織との相互作用によって形成され、最終的に器官特異的な構造と機能を獲得する。上皮芽の増殖と分岐として定義される分枝形成は、唾液腺、肺、腎臓、膵臓、乳腺などの発達性上皮性器官における基本的かつ不可欠な発生過程である。器官形成において、増殖因子、サイトカイン、細胞外基質などを介した上皮間葉相互作用が必須であることが多いの研究で示されている。

マウス顎下腺の器官形成は、E11 頃に口腔上皮が間葉に向かって増殖、伸長することにより始まる。最初、間葉組織内で増殖した原基は 1 つの球状の上皮茎を示す。それから最初の分岐点で上皮に深い cleft が生じることで分枝が始まる。3 次元的な枝分れ構造

を作るために、形成期に1つ1つの腺房は cleft と bud を作り続け、上皮の増殖と分枝を繰り返してブドウの房状に分枝した立体構造を獲得する。

これまでに、Brachyury が発生初期の中胚葉形成に必須であることが報告されている。脊椎動物の発生過程において、Brachyury は TGF や Wnt などの下流のシグナル伝達経路を調節するとされる。近年では、ヒト癌細胞における EMT (上皮間葉移行) を引き起こすことについても報告がなされている。当分野では、高転移性で癌幹細胞形質を示す培養ヒト腺様嚢胞癌細胞株を用い、Brachyury をノックダウンする事により、造腫瘍性、転移能の減弱を証明し、これにより癌幹細胞の浸潤抑制が可能であることを示した。

唾液腺の発生には様々な遺伝子が関わっているが、特に cleft 形成やそれに続く分枝形成に関与すると考えられている fibronectin、Btbd7、E-cadherin は重要な因

子である。Wnt は線維芽細胞増殖因子 (FGF) とともに唾液腺の成長を促し、唾液腺の発生に関して影響を与えている。Wnt 系は、Sox2 の下流遺伝子に位置しており、さらに Brachyury は Sox2 を制御することが示唆されている。

2. 研究の目的

本研究では、唾液腺の初期発生における Brachyury の発現動態を解析するとともに、唾液腺の発生に関与する Sox2、fibronectin、Wnt3a、E-cadherin および fibronectin によって誘導され E-cadherin の発現を制御する Btbd7 に着目して、唾液腺初期発生における Brachyury の関与について検討を行った。

3. 研究の方法

実験には ICR 系妊娠マウスを用いた。器官培養法、Western blotting、リアルタイム PCR、siRNA によるノックダウン法を用いて以下の研究を行った。

4. 研究成果

(1) 各胎齢における *Brachyury* 発現量の比較

E12.5-16.5 の胎仔マウス顎下腺原基における *Brachyury* mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法を用いて解析した。E12.5-13.5 の段階で *Brachyury* の高発現を認め、E14.5 以降は *Brachyury* の発現量の低下が認められた。また、E12.5-16.5 の顎下腺原基における *Brachyury* 発現量を Western blotting 法により解析した。RT-PCR の結果と同様、E12.5-13.5 の段階で *Brachyury* の高発現を認め、E14.5 以降の発現量は低値を示した。

(2) 顎下腺原基発育における *Brachyury*

siRNA によるノックダウンの効果

E12.5-15.5 の胎仔マウスから顎下腺原基を分離し、*Brachyury* siRNA を 24 時間作用させてノックダウンを行い、その後 24 時間通常の器官培養を行った。通常の 48 時間器官培養を行った コントロールと比較

して、発生初期の E12.5-13.5 で cleft 形成や分枝形成が抑制されていることが確認された。特に、E12.5 での効果が顕著で、成長できずに萎縮していく原基が多く認められた。また、E13.5 では培養 24 時間後までは cleft 形成や分枝形成が進行する様子が観察されたが、*Brachyury* siRNA の導入後 48 時間を経過するころには、cleft 形成や分枝形成が有意に抑制された。一方、E14.5-15.5 では siRNA 導入後の cleft 形成や分枝形成は通常の器官培養と比較して有意差を認めなかった。培養した原基の中から 5 個選び小葉数を数え、平均を比較した。選択は原基分離時と培養時で観察して周囲から逸脱しているものは除外した。*Brachyury* ノックダウンで E12.5-13.5 での小葉数がコントロールと比較して明らかに減少していた。

Transfection の比較実験としては、E12.5-15.5 の胎仔マウスから分離した顎下

腺原基を通常の器官培養群、siRNA を添加せず遺伝子導入試薬のみを添加した群、Negative control siRNA と遺伝子導入試薬を添加した群を用い、分離後 0、24、48 時間経過後の顎下腺原基を観察した。それぞれで、導入による発生の違いは認めなかった。

siRNA 導入による標的遺伝子の発現を Western blotting で解析した。E12.5 の胎仔マウスから分離した顎下腺原基に *Brachyury* siRNA を導入し、24、36 時間作用させた。ノックダウンにより *Brachyury* 発現が制御され、試薬作用時間による相違がないことを確認した。また、siRNA や試薬の有無によるコントロール実験では、特異的な *Brachyury* siRNA を導入した群のみにおいて *Brachyury* の発現が抑制された。

(3) 胎生期唾液腺組織における初期発生関連因子発現量の解析

Fibronectin は cleft 周囲に特異的に集積する細胞外基質で、細胞接着因子である

E-cadherin を制御することで cleft 形成を促進することが知られている。その fibronectin により誘導される *Btbd7* は、*Snail2* の発現を誘導し E-cadherin の発現を抑制していることが報告されている。また、*Sox2* は Wnt シグナルを介して発生期における細胞増殖や幹細胞性の維持に関与し、*Brachyury* との関連性も示唆されている。そこで、これらの因子が細胞接着、細胞増殖、cleft 形成、分枝形成に関わっていることが知られているため、胎生期顎下腺原基におけるその発現を Western blotting で解析した。結果、*Brachyury* と同様に E13.5 を中心とした発生初期に fibronectin、*Btbd7*、*Sox2* および *Wnt3a* の強い発現を認めた。一方、fibronectin や *Btbd7* によって制御される E-cadherin は E12.5-13.5 でその発現が抑制されていた。

(4) *Btbd7*, *Sox2*, *fibronectin* siRNA によるノックダウンの効果

Brachyury と同様に Btbd7、Sox2、
fibronectin も発生初期に強発現している
ことが確認できたため、E12.5-16.5 の胎仔マ
ウスから顎下腺原基を分離し、Btbd7、Sox2、
fibronectin siRNA ノックダウンによる効果
を観察した。Brachyury ノックダウンと同様
に、いずれも導入後の顎下腺原基の cleft
形成や分枝形成が有意に抑制された。

(5) siRNA ノックダウンによる関連因子発

現解析

Brachyury、Btbd7、Sox2、fibronectin い
ずれのノックダウンにおいても cleft 形成や
分枝形成が抑制されたため、唾液腺の初期発
生における制御機構を明らかにする目的で
siRNA ノックダウンによる関連因子発現を
Western blotting で解析した。その結果、
Brachyury のノックダウンにより Btbd7、
Sox2 および fibronectin の発現が抑制され
た。一方、Btbd7、Sox2 および fibronectin
のノックダウンでは Brachyury の発現に影

響を与えなかった。

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 件)

[学会発表](計 件)

[図書](計 件)

[産業財産権]
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
碓 竜也 (IKARI, Tatsuya)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：70380467