

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05013

研究課題名(和文) 唾液腺由来筋上皮細胞の幹細胞性とその腫瘍原性の解析

研究課題名(英文) Stemness and tumorigenesis of salivary gland myoepithelial cells

研究代表者

美島 健二 (Mishima, Kenji)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：50275343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、乳腺や汗腺由来の筋上皮細胞に幹細胞としての性質が報告されたが、単離が困難であるため詳細な機能解析は未だ行われていなかった。本研究結果から、マウス顎下腺より筋上皮細胞の単離が可能となり、遺伝子発現プロファイルの作成ができた。また、*in vitro*において唾液腺由来筋上皮細胞が幹細胞様の性質を有することが確認され、さらに筋上皮細胞が幹細胞の機能を制御する主要なシグナル伝達経路を介して唾液腺再生や唾液腺腫瘍の発生に関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We attempted to identify stem/progenitor cells in salivary gland. Localization of BrdU label-retaining cells were found specifically in myoepithelial cells located between luminal and stroma cells after 30 weeks, suggesting that myoepithelial cells were expected to be one of putative stem cells. The data from RNA-seq showed CD49^{high} subset contained positive cells for both of SMA and Myh11, a marker of myoepithelial cells, demonstrating that CD49^{high} subset consisted of myoepithelial cell-enriched population. The selection of a CD49^{high} subset showed high ability of sphere formation and was differentiated into ductal lineage *in vitro*. These data suggest that the enriched myoepithelial cell compartment may contain stem/progenitor cells in salivary glands since the cells enriched in CD49^{high} subset showed multipotent properties by sphere formation.

研究分野：口腔病理

キーワード：唾液腺 再生 筋上皮細胞 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

1) 唾液腺組織恒常性の維持に唾液腺組織由来幹細胞が関与する

シェーグレン症候群や頭頸部腫瘍の放射線治療に伴う唾液腺障害や唾液量の減少は様々な口腔疾患や誤嚥性肺炎などの疾患の誘因となる。唾液腺の修復や再生など、組織恒常性の維持に唾液腺組織由来幹細胞の関与が示唆されている。間質に存在する血管内皮細胞や Lin⁻CD24⁺c-kit⁺Sca1⁺細胞が放射線照射による唾液分泌障害に奏功し、組織保護に働くこと、また、CD133⁺唾液腺上皮細胞に腺組織再構築が認められたことから、いずれも組織幹細胞である可能性が示唆されているが、詳細な解析には至らず、唾液腺の組織幹細胞の由来や性質については未だ不明な点が多い。

2) 筋上皮細胞に幹細胞性が示唆されている

筋上皮細胞は唾液腺以外にも乳腺、涙腺、汗腺などの外分泌腺に存在する。筋上皮細胞の役割は、その収縮による分泌促進機能であると考えられてきたが、Laminin-1 などの接着分子を介して導管細胞の極性制御や bFGF などの成長因子を介して導管形成にも関与することが報告された。さらに、最近、乳腺や汗腺由来の筋上皮細胞に多分化能を有する幹細胞としての性質が報告された。これらの知見より唾液腺由来筋上皮細胞に乳腺同様の幹細胞性を有する分画である可能性が考えられる。また、唾液腺腫瘍の多くに筋上皮細胞の増殖がみられる事から、以前より腫瘍原性が想定されてきたが、筋上皮細胞は細胞表面マーカーが乏しく、単離が困難であるため詳細な機能解析は未だ行われていない。

2. 研究の目的

本研究では、唾液腺組織由来の筋上皮細胞に着目し、その単離方法を確立すると共に幹細胞性を含めた性質解析を行うことを目的とした。また、筋上皮幹細胞が腫瘍原性に関わっている可能性を検証する。

3. 研究の方法

1) 筋上皮細胞の単離・解析

マウス顎下腺をコラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ処理し分散化した唾液腺細胞の細胞表面を EpCAM および CD49f で染色後フローサイトメーター (FACS) にて解析した。

FACS により得られた各細胞分画の発現遺伝子を次世代シーケンサーにより網羅的に解析した。

EpCAM および CD49f で分画した細胞を培養し、3 次元的な sphere 形成能を比較した。

培養細胞を透過型電子顕微鏡にて細胞構造の解析を行った。

唾液腺障害モデルマウスを作製し、EpCAM および CD49f で分画した細胞をマトリゲルに懸濁移入し、再生への影響を解析した。

2) BrdU を用いた唾液腺内の幹細胞の検出

組織幹細胞を同定する為に、その性質の 1

つである分裂サイクルが他の細胞に比べて極めて遅い slow-cycling cells の検出を行う。C56BL/6 新生仔マウスに BrdU を 1 日 2 回 3 日間腹腔内投与し、10 週から 30 週経過後に顎下腺組織における長期ラベル保持細胞 (LRCs) の局在を免疫組織学的に解析する。

3) Myh11 マウスの作出

筋上皮細胞のマーカーであるアクチンプロモーターの制御下で Cre リコンビナーゼを発現する Myh11-Cre/ERT2 マウスと Cre の存在下で蛍光物質の Tomato を発現する。

ROSAtdTomato flox マウスを交配する。

4 週齢および 8 週齢マウスにタモキシフェン (1mg) を投与し、経時的 (直後, 4 週, 8 週, 12 週) に Myh11 陽性細胞の細胞系譜を解析する。

顎下腺被膜下の小葉を部分的に切除し作製した欠損部にマトリゲルを注入し、腺組織の再生を誘導する。マトリゲルを注入後 2 週、4 週で顎下腺を摘出し、その組織切片上で Tomato 陽性細胞の局在を同定し、筋上皮細胞の lineage tracing を行う。

4. 研究成果

1) 唾液腺筋上皮細胞が唾液腺組織における幹/前駆細胞としての性質を有する

顎下腺組織における BrdU 長期ラベル保持細胞 (LRCs) の局在を免疫組織学的に解析した。10 週後の LRCs は導管上皮細胞の一部や、導管周囲の紡錘形細胞、腺房細胞の一部に認められたが、30 週後では導管上皮細胞の一部や、導管周囲の紡錘形細胞に限局していた。このことから、唾液腺における LRCs の局在は、介在部導管、排出導管のみならず腺房や筋上皮の一部にもみられ、LRCs の一部が筋上皮細胞であることが確認された。

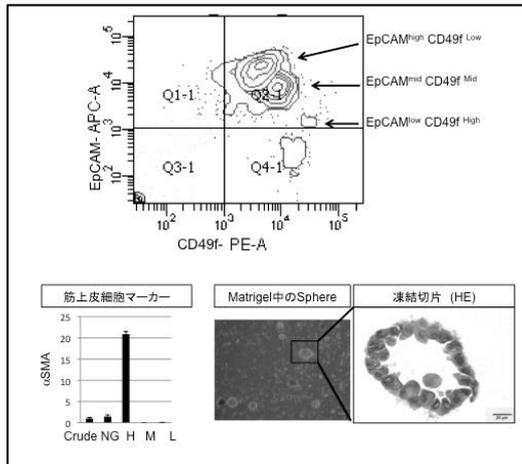
マウス顎下腺より分散化した細胞を上皮マーカーである EpCAM および幹細胞マーカーとされる CD49f で染色後フローサイトメーター (FACS) にて分画すると、EpCAM^{low}CD49f^{high}, EpCAM^{mid}CD49f^{mid}, EpCAM^{high}CD49f^{low} の 3 つの上皮細胞の分画を認めた。

EpCAM^{low}CD49f^{high} では SMA や Myh11 が特異的に高く、本分画が筋上皮細胞の濃縮されている分画であることが明らかとなった。また、RNA-sequence による網羅的な遺伝子発現解析から、本分画では一部の SOX 遺伝子ファミリーの高い発現がみられた。

EpCAM^{low}CD49f^{high} 細胞は細胞培養系において高い sphere 形成能を持ち、形態学的にも大きな sphere を形成した。

Sphere 内部には 2 相性を示す導管様構造の構築がみられ、免疫組織化学的にも導管への分化が確認された。また、透過型電子顕微鏡においても極性を示す腺腔構造であることが明らかとなった。このことより、筋上皮細胞が *in vitro* における特殊な条件下で筋上皮細胞が多分化能を獲得することが示唆された (図 1)。

(図1)



2) 筋上皮細胞可視化マウスを用いた唾液腺由来筋上皮細胞の lineage tracing 法の確立

3週齢のMyh11-Cre/ERT2:tdTomatoマウスにタモキシフェン(TM)を投与し、Myh11発現細胞の顎下腺内での局在と割合を検討したところ、Myh11陽性細胞は血管平滑筋と一部の導管や腺房の基底側に局在した。

FACSではMyh11陽性細胞は全体の約3%程度で、その大部分はEpCAM^{low}CD49f^{high}として認められた。

8週齢よりTMを投与したマウスでも同様の傾向が認められ、Myh11陽性細胞はほぼ一定の割合で維持されており、顎下腺被膜下の小葉を部分的に切除し作製した唾液腺障害モデルマウスを作製すると、再生結節中にMyh11陽性細胞が高い割合で検出され、これらの細胞は高いki-67陽性率を有していた。

今後単離された筋上皮細胞を用いて、唾液腺腫瘍形成への関与についてさらに詳細な検討を進める予定である

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17件)

1. Seki T, Aizawa R, Tanaka J, Yajima-Himuro S, Kato M, Tanaka K, Mishima K, Yamamoto M. Establishment of mouse gingival junctional epithelial cell line using a bioengineered tooth system. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018. in press, 査読有り
2. Bin B, Bhin J, Takaishia M, Toyoshima K, Kawamata S, Ito K, Hara T, Watanabe T, Irie T, Takagishi T, Lee SH, Jung HS, Rho S, Seo J, Choi DH, Hwang D, Koseki H, Ohara O, Sano S, Tsuji T, Mishima K, Fukada T. Requirement of zinc transporter ZIP10 for epidermal development: implication of the ZIP10-p63 axis in epithelial homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017, 114(46):201710726, 査読有り
3. Bin B, Bhin J, Seo J, Kim SY, Lee E, Park K, Choi DH, Takagishi T, Hara T, Hwang D, Koseki H, Asada Y, Shimoda S, Mishima K, Fukada T. Requirement of zinc transporter SLC39A7/ZIP7 for dermal development to fine-tune endoplasmic reticulum function by regulating protein disulfide isomerase. *J Invest Dermatol*. 2017, 137(8):1682-1691, 査読有り
4. Takebe Y, Tatehara S, Fukushima T, Tokuyama-Toda R, Yasuhara R, Mishima K, Satomura K. Novel Cryopreservation Method for the Effective Collection of Dental Pulp Stem Cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2017, 23(5):251-261. 査読有り
5. Funato S, Yasuhara R, Yoshimura K, Miyamoto Y, Kaneko K, Suzawa T, Chikazu D, Mishima K, Baba K, Kamijo R. Extracellular matrix loss in chondrocytes after exposure to interleukin-1 in NADPH oxidase-dependent manner. *Cell Tissue Res*. 2017 Apr;368(1):135-144. 査読有り
6. Hoashi Y, Okamoto S, Abe Y, Matsumoto T, Tanaka J, Yoshida Y, Imaizumi K, Mishima K, Akamatsu W, Okano H, Baba K. Generation of neural cells using iPSCs from sleep bruxism patients with 5-HT2A polymorphism. *J Prosthodont Res*. 2016 Dec 1. pii: S1883-1958(16)30106-2. 査読有り
7. Inoue H, Kishimoto A, Nakayama RU, Hasaka A, Takahashi A, Ryo A, Muramatsu T, Ide F, Mishima K, Saito I. Resveratrol improves salivary dysfunction in a non-obese diabetic (NOD) mouse model of Sjogren's syndrome. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition (in press)* 査読有り
8. Ohashi W, Kimura S, Iwanaga T, Furusawa Y, Irie T, Izumi H, Watanabe T, Hijikata A, Hara T, Ohara O, Koseki H, Sato T, Robine S, Mori H, Hattori Y, Watarai H, Mishima K, Ohno H, Hase K, Fukada T. Zinc transporter SLC39A7/ZIP7 promotes intestinal epithelial self-renewal by resolving ER stress. *PLoS Genetics* 2016,12(10): e1006349 査読有り
9. Nagahama R, Yamada A, Tanaka J, Aizawa R, Suzuki D, Kassai H, Yamamoto M, Mishima K, Aiba A, Maki K, Kamijo R. Rho GTPase protein Cdc42 is critical for postnatal cartilage development. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;470:813-817. 査読有り
10. Yasuhara R, Irie T, Suzuki K, Sawada T, Miwa N, Sasaki A, Tsunoda Y, Nakamura S, Mishima K. The beta-catenin signaling

- pathway induces aggressive potential in breast cancer by up-regulating the chemokine CCL5. *Exp Cell Res.* 2015;338:22-31. 査読有り
11. Tanaka J, Irie T, Yamamoto G, Yasuhara R, Isobe T, Hokazono C, Tachikawa T, Kohno Y, Mishima K. ANGPTL4 regulates the metastatic potential of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2015;44:126-133. 査読有り
 12. Takahashi A, Inoue H, Mishima K, Ide F, Nakayama R, Hasaka A, Ryo K, Ito Y, Sakurai T, Hasegawa Y, Saito I. Evaluation of the effects of quercetin on damaged salivary secretion. *PLoS One.* 2015;10:e0116008. 査読有り
 13. Saito Y, Yamada A, Suzuki D, Tanaka J, Nagahama R, Kurosawa T, Maki K, Mishima K, Shiota T, Kamijo R. Association of aging with gene expression profiling in mouse submandibular glands. *Genom Data.* 2015;5:115-119. 査読有り
 14. Ono M, Suzawa T, Takami M, Yamamoto G, Hosono T, Yamada A, Suzuki D, Yoshimura K, Watahiki J, Hayashi R, Arata S, Mishima K, Nishida K, Osumi N, Maki K, Kamijo R. Localization and osteoblastic differentiation potential of neural crest-derived cells in oral tissues of adult mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;464:1209-1214. 査読有り
 15. Okada S, Irie T, Tanaka J, Yasuhara R, Yamamoto G, Isobe T, Hokazono C, Tachikawa T, Kohno Y, Mishima K. Potential role of hematopoietic pre-B-cell leukemia transcription factor-interacting protein in oral carcinogenesis. *J Oral Pathol Med.* 2015;44:115-125. 査読有り
 16. Matsunaga A, Takami M, Irie T, Mishima K, Inagaki K, Kamijo R. Microscopic study on resorption of beta-tricalcium phosphate materials by osteoclasts. *Cytotechnology.* 2015;67:727-732. 査読有り
 17. Ichikawa Y, Watahiki J, Nampo T, Nose K, Yamamoto G, Irie T, Mishima K, Maki K. Differences in the developmental origins of the periosteum may influence bone healing. *J Periodontal Res.* 2015;50:468-478. 査読有り
- [学会発表](計26件)
1. 美島健二: 唾液腺機能障害における再生医療研究の現状. 『唾液腺機能回復の展望』メインシンポジウム B. 第59回歯科基礎医学会学術大会、松本、9/16 -18, 2017.
 2. 田中準一、大庭伸介、馬淵 洋、安原理佳、入江太朗、福島美和子、河野葉子、美島健二. 唾液腺初期発生における Sox9 の機能解析第16回日本再生医療学会総会, 仙台, 3/7-9, 2017.
 3. 安原理佳、田中準一、川嶋章弘、福島美和子、入江太朗、関沢明彦、美島健二. 脂肪幹細胞を活用した唾液腺再生メカニズムの解析. 第106回日本病理学会総会, 東京 4/27-29, 2017.
 4. 田中準一、大庭伸介、北條宏徳、馬淵 洋、安原理佳、入江太朗、福島美和子、河野葉子、美島健二. 唾液腺初期発生における転写因子の機能解析 Functional analysis of transcription factors in salivary gland development 第106回日本病理学会総会, 東京 4/27-29, 2017.
 5. 田中準一、大庭伸介、北條宏徳、馬淵 洋、安原理佳、入江太朗、福島美和子、河野葉子、美島健二. 唾液腺発生における転写因子の機能解析. 第17回抗加齢医学会総会 東京 6/2-4, 2017.
 6. Rika Yasuhara, Junichi Tanaka, Miwako Fukushima, Tarou Irie, Kenji Mishima. Mouse salivary gland-derived myoepithelial cells shows stem/progenitor cell properties in vitro. International Society for Stem Cell Research Boston, MA, 6/14-17, 2017.
 7. Junichi Tanaka, Shinsuke Ohba, Hironori Hojo, Yo Mabuchi, Rika Yasuhara, Tarou Irie, Miwako Fukushima, Yohko Kohno, and Kenji Mishima. SOX9 IS A KEY TRANSCRIPTION FACTOR OF SALIVARY GLAND DEVELOPMENT. International Society for Stem Cell Research Boston, MA, 6/14-17, 2017.
 8. 安原理佳、田中準一、入江太朗、美島健二. 筋上皮細胞可視化マウスを用いた唾液腺由来筋上皮細胞の単離と局在解析. 第28回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会埼玉 8/23-25, 2017.
 9. 田中準一、大庭伸介、北條宏徳、馬淵 洋、安原理佳、入江太朗、美島健二. 唾液腺発生における機能的転写因子の同定 Identification of functional transcription factors in salivary gland development. 第28回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会埼玉 8/23-25, 2017.
 10. Rika Yasuhara, Junichi Tanaka, Tarou Irie, Kenji Mishima. Myoepithelial cells are one of stem/progenitor cells in mouse salivary gland. Japanese Association for Dental Research(JADR), Tokyo, 11/18-19, 2017.
 11. Junichi Tanaka, Shinsuke Ohba, Hironori Hojo, Yo Mabuchi, Rika Yasuhara, Tarou Irie, and Kenji Mishima. Identification of transcription factors to induce the salivary gland from the primitive oral epithelium.

- Japanese Association for Dental Research(JADR), Tokyo, 11/18-19, 2017.
12. 田中準一、中村史郎、安原理佳、井上富雄、美島健二: 自己組織化技術を用いたマウスES細胞由来3次元唾液腺組織の誘導. Self-formation of salivary gland tissue from mouse embryonic stem cells 第62回日本唾液腺学会学術集会東京 11/25, 2017.
 13. 安原理佳、田中準一、美島健二: 筋上皮細胞可視化マウスを用いた唾液腺由来筋上皮細胞の単離と局在解析. 「口腔機能維持・回復のための集学的研究開発拠点の形成」東京 2018 3.17
 14. 美島健二(座長および企画): 口腔からアプローチする全身の病態制御, 第16回日本抗加齢医学会総会シンポジウム, 大阪 2016年6月
 15. 安原理佳、田中準一、福島美和子、入江太朗、河野葉子、美島健二: 脂肪幹細胞による唾液腺再生メカニズムの解析, 文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業平成27年度シンポジウム抄録集(次世代型顎口腔組織再生医療の研究開発拠点形成, 東京、2016年3月)
 16. 田中準一、馬淵 洋、安原理佳、入江太朗、福島美和子、河野葉子、美島健二: 唾液腺発生における Sox9 の機能解析: Sox9 regulates development of salivary glands. 第15回日本再生医療学会総会, 2016年3月18日, 大阪
 17. Rika Yasuhara, Junichi Tanaka, Miwako Fukushima, Tarou Irie, Yohko Kohno, Kenji Mishima: 唾液腺由来筋上皮細胞の単離と性質解析 Characterization of myoepithelial cells in salivary glands. 第105回日本病理学会総会, 2016年5月12-14日, 仙台
 18. 田中準一、馬淵 洋、安原理佳、入江太朗、福島美和子、河野葉子、美島健二: Sox9 を介したマウス唾液腺組織幹細胞の機能解析 Sox9 is involved in the ability to self-renew of stem-like cells in murine salivary gland. 第105回日本病理学会総会, 2016年5月12-14日, 仙台
 19. 安原理佳、田中準一、福島美和子、入江太朗、河野葉子、美島健二: Isolation and characterization of myoepithelial cells in salivary glands. 第39回日本分子生物学会年会, 2016年11月30-12月2日, 横浜.
 20. 田中準一、大庭 伸介、馬淵 洋、安原理佳、入江太朗、福島美和子、河野葉子、美島健二: 唾液腺発生における Sox9 の機能解析 Sox9 regulates development of salivary glands. 第39回日本分子生物学会年会, 2016年12月2日, 横浜.
 21. 安原理佳、田中準一、福島美和子、入江太朗、河野葉子、美島健二: 唾液腺由来筋上皮細胞の単離と性質解析 Isolation and characterization of myoepithelial cells in salivary glands. 第61回日本唾液腺学会学術集会, 2016年12月3日
 22. 田中準一、馬淵 洋、安原理佳、入江太朗、福島美和子、河野葉子、美島健二: マウス唾液腺における幹細胞の同定とそのcharacterization. 第14回日本再生医療学会, 2015年3月19-21日, 横浜
 23. Tanaka J, Mabuchi Y, Yasuhara R, Irie T, Fukushima M, Fukada T, Yohko K, Mishima K: Identification and characterization of tissue-specific stem cells from murine salivary gland. International Society for Stem Cell Research, June 24-27th, 2015, Stockholm, Sweden
 24. 田中準一、馬淵 洋、安原理佳、入江太朗、福島美和子、河野葉子、美島健二: マウス唾液腺における幹細胞の同定とその機能解析. 第104回日本病理学会, 2015年4月30日-5月2日, 名古屋
 25. Tanaka J, Mabuchi Y, Yasuhara R, Irie T, Fukushima M, Fukada T, Yohko K, Mishima K: Characterization of tissue-specific stem cells from murine salivary gland. 第63回 国際歯科研究学会 (IADR) 日本部会総会 (JADR)・学術大会, 2015年10月30-31日, 福岡
 26. 安原理佳、田中準一、福島美和子、入江太朗、河野葉子、美島健二: 唾液腺由来筋上皮細胞の性質解析 Characterization of myoepithelial cells in salivary glands. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学学会大会, 2015年12月1-4日, 神戸.
- 〔図書〕(計 1件)
美島健二: 病理学総論にもとづく口腔病理学 (分担) 永末書店 京都 24-34 頁, 2016
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計 0 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 0 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

<http://www10.showa-u.ac.jp/~oralpath/in>

6．研究組織

(1)研究代表者

美島 健二 (MISHIMA Kenji)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：50275343

(2)研究分担者

入江 太郎 (IRIE Tarou)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：00317570

安原 理佳 (YASUHARA Rika)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：20453649

田中 準一 (TANAKA Junichi)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：40710166

馬淵 洋 (MABUCHI Yo)

東京医科歯科大学・大学院保健衛生学研究
科・助教

研究者番号：50424172

斎藤 一郎 (SAITO Ichiro)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：60147634

桐田 忠昭 (Tadaaki Kirita)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：70201465

阪井 丘芳 (Takayoshi Sakai)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：90379082

福島 美和子 (FUKUSHIMA Miwako)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：90548273