

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03827

研究課題名(和文)胎生期唾液腺組織における細胞系譜決定メカニズムの解明

研究課題名(英文)Cell lineage determination of embryonic salivary gland

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) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マルチカラー細胞追跡マウスを用いて胎生期顎下腺組織における幹細胞ヒエラルキーの有無について検証した。結果として、胎生13.5日には2系統への分化を示すbipotent stem cellの存在が、また、生後を含めて胎生16日以降のマウスの顎下腺においては、1系統のみへの限られた分化を示すunipotent stem cellが主体をなすことが明らかとなった。したがって、3系統の唾液腺実質細胞全てを作出するmultipotent stem cellは胎生13.5日以前に存在することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唾液腺は、導管上皮細胞、腺房細胞および筋上皮細胞の3系統の細胞よりなり、これまで介在部導管に存在する多分化能を有する幹細胞により3系統すべての細胞供給がなされていると考えられてきた。しかしながら、成獣マウス唾液腺においては、分化した細胞が個別に細胞を供給していることが明らかとなり多分化能を有する幹細胞は存在しないことが報告された。一方、本研究では、マウス胎生期唾液腺において幹細胞が段階的に多分化能を消失することが示された。本研究により得られた結果は、唾液腺障害に対する細胞治療の移入ソースの開発に極めて有用な情報となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined whether salivary gland stem cells were located at the top of the hierarchy of salivary gland cell lineages. We labeled submandibular gland cells with random color using Rosa26-CreERT2/rainbow mice and pursued cell differentiation. Consequently, bipotent stem cells existed on embryonic day 13.5, while only unipotent stem cells existed after embryonic day 16. Therefore, these results suggest that tripotent stem cells possibly exist in submandibular glands before embryonic day 13.5.

研究分野：口腔病理

キーワード：唾液腺幹細胞 細胞系譜 胎生期

1. 研究開始当初の背景

マウスの顎下腺組織は胎生 11.5 日に口腔粘膜上皮の肥厚として発生し、その後上皮・間葉相互作用により胎生 13.5 日に分枝を開始し、胎生 15.5 日に管腔形成、胎生 17.5 日に終末部（腺房）の形成に至る。出生後、既に分泌能を有する事が確認されているが、生後 90 日まで重量が増加し、定常状態に至る事が知られている。マウス唾液腺の基本的構築は、導管上皮細胞、腺房細胞および筋上皮細胞の 3 系統の細胞よりなり、成獣マウスにおける細胞供給は、介在部導管に存在する唾液腺幹・前駆細胞により行われているとの報告がなされてきた。しかしながら、Ovitt らが、Cre/loxP システムと Rainbow mouse を応用した細胞系譜解析で、成獣マウスにおける腺房細胞は自己複製により恒常性維持がなされているとの報告がなされた (Developmental cell, 2015;33:231-237)。その後も唾液腺組織の恒常性維持における組織幹細胞の関与を積極的に示唆する報告はなされていない。

2. 研究の目的

本研究では、確実に幹細胞が存在する胎生期のマウス顎下腺組織に焦点をあて、細胞系譜解析技術を駆使し、胎生期唾液腺幹細胞の動態を明らかとするとともに成獣唾液腺における多分化能を有する組織幹細胞の有無に関する検証を行うことにある。

3. 研究の方法

全身性に CreERT2 を発現している Rosa26-CreERT2 マウスと Cre リコンビナーゼの存在下で 3 色の細胞標識がランダムに起こる Rosa26-rainbow マウスを交配した。

交配 16 日後の妊娠マウスの腹腔内に 0.2mg/g のタモキシフェン投与により細胞を 4 色の蛍光でランダムに標識した。出生後の遺伝子組換えマウスの唾液腺を経時的に摘出し、蛍光観察した。

Rosa26-CreERT2 マウスと Rosa26-rainbow マウスの交配により作出した遺伝子改変マウス (Rosa26-CreERT2/rainbow) 6 週齢の腹腔内に 0.1mg/g のタモキシフェンを投与し、細胞を標識した後、経時的に唾液腺を摘出し蛍光観察した。

胎生 16 日齢よりも早期の組換えマウス唾液腺における細胞系譜追跡を行う目的で、Rosa26-CreERT2 マウスと Rosa26-rainbow マウスを交配後 13 日に妊娠マウスの腹腔内にタモキシフェン投与を行った。しかしながら、当該妊娠マウスでは子宮内胎仔死亡が観察されたため唾液腺組織の経時的な観察を行うことができなかった。このことから、胎生 13.5 日の組換えマウスの唾液腺解析は、当該胎仔マウス唾液腺の器官培養下で実施した。

4. 研究成果

4 週齢の Rosa26-CreERT2/rainbow マウスをタモキシフェン腹腔投与 3 日後に唾液腺を摘出し蛍光観察した。その結果、唾液腺細胞が 4 色の蛍光（赤、緑、青、黄）でランダムに標識されていることが明らかとなった（図 1）。一方、当該マウスをタモキシフェン投与後 4 週（図 2）、8 週（図 3）24 週（図 4）と蛍光観察した結果、経時的に同色細胞集団の領域拡大が確認されたが、いずれの蛍光も導管ないし腺房に局限したもので異なる細胞系譜間の移行像は認められなかった。

胎生 16 日齢 Rosa26-CreERT2/rainbow マウスをタモキシフェン処理した 4 週後に唾液腺を蛍光観察した結果においても同色蛍光の細胞系譜間における移行像は観察されなかった（図 5）。

一方、胎生 13.5 日齢の Rosa26-CreERT2/rainbow マウスより唾液腺を採取し、器官培養下において 24 時間タモキシフェン刺激をした唾液腺においては、タモキシフェン刺激 6 日後の唾液腺において、一部の同色細胞において導管と腺房との移行像が確認できた（図 6）。

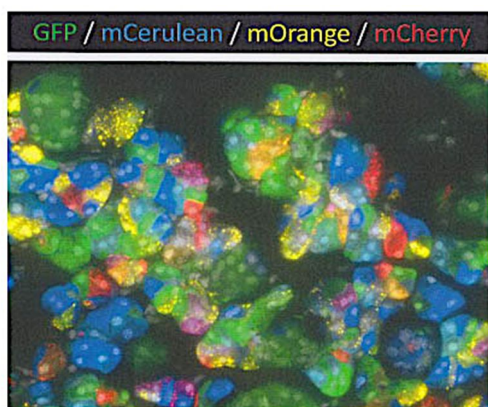


図1 4週齢マウス唾液腺をタモキシフェン刺激3日後

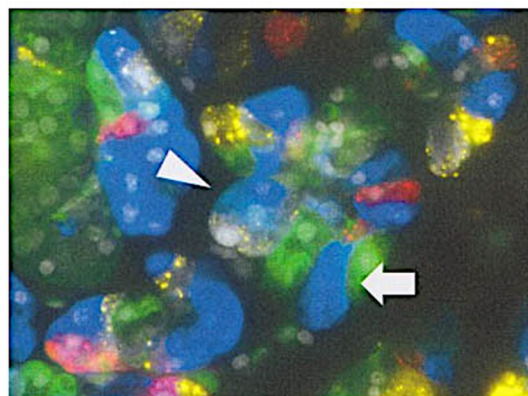


図2 4週齢マウス唾液腺をタモキシフェン刺激4週後

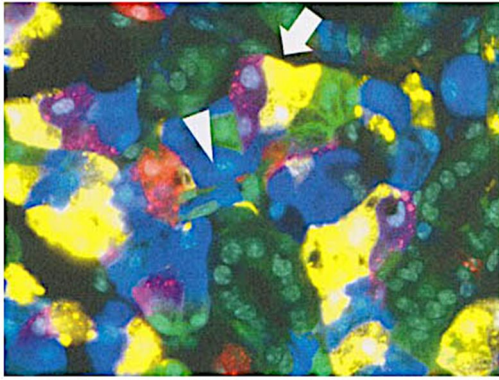


図3 4週齢マウス唾液腺をタモキシフェン刺激8週後

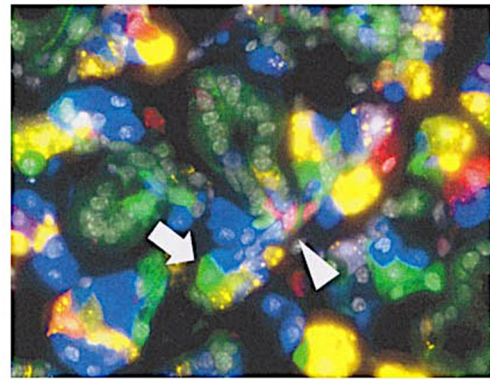


図4 4週齢マウス唾液腺をタモキシフェン刺激24週後

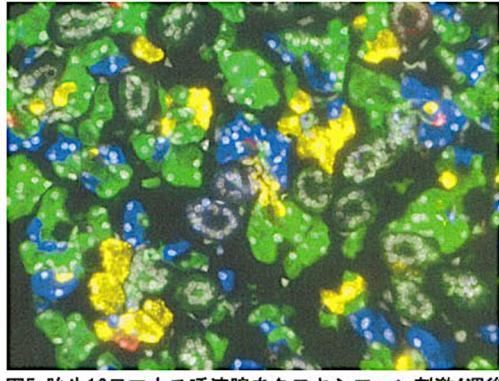


図5 胎生16日マウス唾液腺をタモキシフェン刺激4週後

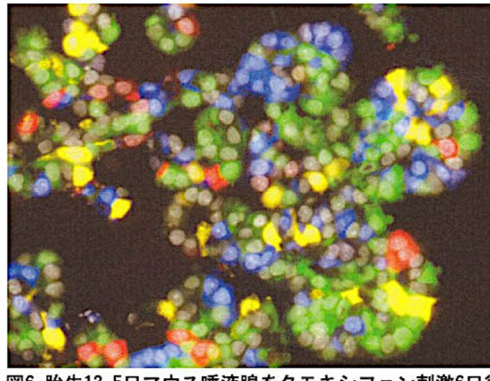


図6 胎生13.5日マウス唾液腺をタモキシフェン刺激6日後(器管培養)

以上の結果より、胎生13.5日マウス唾液腺においては、bipotentの多分化能を有する幹細胞が存在し、胎生16日以降の唾液腺組織では、unipotentな分化能を有する細胞集団より構成されていることが明らかとなった(図7)。

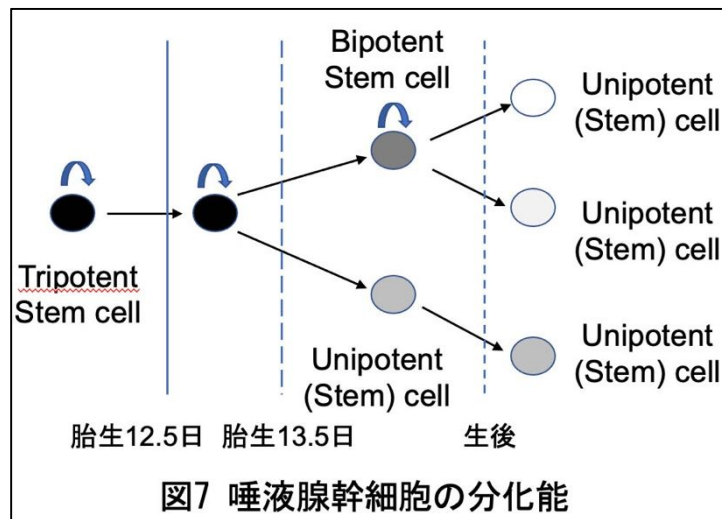


図7 唾液腺幹細胞の分化能

今後、さらに早期の胎生期唾液腺についても同様な検討を進めるとともに、scRNAseq解析も継続的に進めていく予定である。これまでの研究結果から、epithelial mesenchymal transition(EMT)関連因子やNotchシグナル関連因子が細胞系譜の方向性を制御する因子であることもわかりつつある。加えて、細胞系譜を制御する可能性のある転写因子に関して複数の候補が明らかとなってきた。これらの候補遺伝子を改変した唾液腺オルガノイドを用いて、当該遺伝子の機能の詳細について検討し、唾液腺再生医療への応用や唾液腺腫瘍発生メカニズムの解明に役立てたいと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Goto Yuriko, Ibi Miho, Sato Hiroataka, Tanaka Junichi, Yasuhara Rika, Aota Keiko, Azuma Masayuki, Fukada Toshiyuki, Mishima Kenji, Irie Tarou	4. 巻 62
2. 論文標題 PLAG1 enhances the stemness profiles of acinar cells in normal human salivary glands in a cell type-specific manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 99 ~ 106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2020.01.002	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 Kawashima Akihiro, Yasuhara Rika, Akino Ryosuke, Mishima Kenji, Nasu Michiko, Sekizawa Akihiko	4. 巻 6
2. 論文標題 Engraftment potential of maternal adipose-derived stem cells for fetal transplantation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e03409 ~ e03409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2020.e03409	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 Junichi, Mishima Kenji	4. 巻 70
2. 論文標題 In vitro three dimensional culture systems of salivary glands	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 493 ~ 501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12947	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 Junichi, Takamatsu Koki, Yukimori Akane, Kujiraoka Satoko, Ishida Shoko, Takakura Ikuko, Yasuhara Rika, Mishima Kenji	4. 巻 63
2. 論文標題 Sox9 function in salivary gland development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 8 ~ 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2021.01.005	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 Junichi, Mabuchi Yo, Hata Kenji, Yasuhara Rika, Takamatsu Koki, Kujiraoka Satoko, Yukimori Akane, Takakura Ikuko, Sumimoto Hidetoshi, Fukada Toshiyuki, Azuma Masayuki, Akiyama Haruhiko, Nishimura Riko, Shimane Toshikazu, Mishima Kenji	4. 巻 382
2. 論文標題 Sox9 regulates the luminal stem/progenitor cell properties of salivary glands	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 111449 ~ 111449
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2019.05.030	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 Kato Mayu, Tanaka Junichi, Aizawa Ryo, Yajima-Himuro Sara, Seki Tatsuaki, Tanaka Keisuke, Yamada Atsushi, Ogawa Miho, Kamiyo Ryutaro, Tsuji Takashi, Mishima Kenji, Yamamoto Matsuo	4. 巻 9
2. 論文標題 Visualization of junctional epithelial cell replacement by oral gingival epithelial cells over a life time and after gingivectomy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7640 - 7640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-44065-x	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5件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 美島健二
2. 発表標題 3次元的唾液腺組織の作出とその応用
3. 学会等名 第62回 歯科基礎医学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 美島健二
2. 発表標題 マウスES細胞誘導による唾液腺原基オルガノイド形成と再生医療に向けた基礎研究
3. 学会等名 第109回 日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 美島健二
2. 発表標題 唾液腺再生
3. 学会等名 第74回 日本口腔科学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 美島健二
2. 発表標題 唾液分泌障害への再生医療の応用
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 美島健二
2. 発表標題 唾液腺疾患解明を目指した唾液腺オルガノイドの開発
3. 学会等名 第65 回日本病理学会秋期特別総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 草間 薫、永山元彦、美島健二、久山佳代、入江太郎	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学情報社	5. 総ページ数 154
3. 書名 要説病理学総論	

1. 著者名 田中準一、美島健二	4. 発行年 2019年
2. 出版社 ニューサイエンス	5. 総ページ数 52
3. 書名 オルガノイドによる消化器研究 同所移植可能なマウス多能性幹細胞由来唾液腺オルガノイドの誘導	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>昭和大学歯学部 口腔病態診断科学講座 口腔病理学部門 ホームページ http://www10.showa-u.ac.jp/%7Eoralpath/index.html</p>

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	安原 理佳 (Yasuhara Rika) (20453649)	昭和大学・歯学部・講師 (32622)	
研究分担者	大庭 伸介 (Ohba Shinsuke) (20466733)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授 (17301)	
研究分担者	田中 準一 (Tanaka Junichi) (40710166)	昭和大学・歯学部・講師 (32622)	

6. 研究組織（つづき）

	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	辻 孝 (Tsuji Takashi) (50339131)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー (82401)	
研究分担者	渡辺 貴志 (Watanabe Takashi) (50406815)	国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・技師 (82401)	
研究分担者	馬淵 洋 (Mabuchi Yo) (50424172)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・特任准教授 (32620)	
研究分担者	上野 博夫 (Ueno Hiroo) (60332368)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・客員研究員 (84404)	
研究分担者	行森 茜 (Yukimori Akane) (60813748)	昭和大学・歯学部・助教 (32622)	
研究分担者	阪井 丘芳 (Sakai Takayoshi) (90379082)	大阪大学・歯学研究科・教授 (14401)	
研究分担者	鯨岡 聡子 (Kujiraoka Satoko) (90824673)	昭和大学・歯学部・助教 (32622)	

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