

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06150・19K21263

研究課題名(和文) 唾液腺オルガノイドを用いた唾液腺腫瘍関連遺伝子の機能の解明

研究課題名(英文) Investigation of the functions of salivary gland tumor-related genes using salivary gland organoids

研究代表者

鯨岡 聡子(Kujiraoka, Satoko)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：90824673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は申請者の所属研究室で開発したマウスES細胞由来の唾液腺オルガノイド(唾液腺同様の形態・機能を有するミニ臓器)に唾液腺腫瘍関連遺伝子(唾液腺腫瘍で発現している特徴的な遺伝子変異)を導入し、当該遺伝子の機能を解析することにある。2018年度は唾液腺オルガノイド分化誘導方法の技術を習得し、効率よく唾液腺オルガノイドを分化誘導することを可能とした。2019年度は遺伝子操作可能な多能性幹細胞株を樹立し、更に唾液腺オルガノイドを成熟させる培養法の開発を試みた。現時点で成熟に関するタンパクは同定出来ていないが、今後遺伝子発現調整可能な唾液腺オルガノイドを用いて腫瘍関連遺伝子の機能を解析する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、唾液腺腫瘍において腫瘍関連遺伝子が複数報告されているが、当該遺伝子の腫瘍発生における役割を直接的に示した報告は未だない。その理由として、これまでの唾液腺腫瘍関連遺伝子に関する報告は、患者から採取した腫瘍検体を用いた解析が主流であることが挙げられる。本研究は、申請者の所属研究室が近年開発した唾液腺オルガノイドを用いる。標的とする遺伝子を改変したマウスES細胞から作出した唾液腺オルガノイドの形態的变化を比較することで、腫瘍発生における遺伝子の役割を直接的に示すことが可能となる。本研究の結果は、新規診断マーカーや治療標的因子開発の一助となると考えられ、今後も研究を継続する。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to clarify the functions of salivary gland tumor-related genes using 3D organoid system that our lab has developed. The 3D organoids were genetically modified.

In the first year of this research, it has become possible to stably induce differentiation of the organoids. In the second year, I established a gene-modified pluripotent stem cell line with drug-inducible system. Moreover, I have tried to develop the culture method which can induce maturation of salivary gland organoid. I am still investigating the role of tumor-related genes using these organoids.

研究分野：口腔病理

キーワード：オルガノイド 唾液腺腫瘍 腫瘍関連遺伝子 機能解析 ES細胞

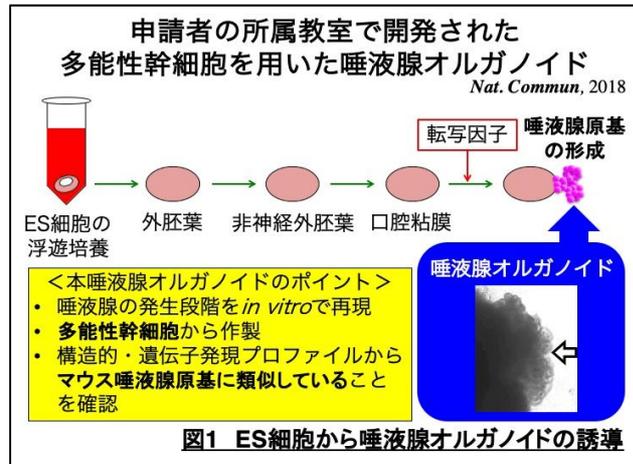
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

近年、一部の唾液腺腫瘍において特徴的な遺伝子変異(以下、腫瘍関連遺伝子)の存在が報告されている。しかしながら、当該遺伝子の腫瘍発生における役割を直接的に示した報告は未だない。その理由として、これまでの腫瘍関連遺伝子に関する報告は、ヒト検体を用いた解析が主流であることが挙げられる。このことから、申請者の所属研究室で報告した唾液腺オルガノイド(Nat Commun., 2018、図1)を用いて、唾液腺腫瘍関連遺伝子の腫瘍発生における機能の解明を目的とする研究の着想に至った。

オルガノイドは臓器様の構造体とされ、生体内における発生・再生過程を *in vitro* で再現することで形成される。ES細胞やiPS細胞といった多能性幹細胞から作製されるオルガノイドは、2008年に笹井らによる大脳皮質オルガノイドをはじめ、下垂体、内耳、甲状腺、膵臓、腎臓、肝臓、腸管など多岐にわたる。また、組織幹細胞から作製された腸管オルガノイド(Clevers H, et al., Nature, 2009)は、大腸癌の発癌解

析に応用がなされている(Matano M et al., Nat Med., 2015)。このことから、唾液腺オルガノイドは唾液腺腫瘍の解析に強力なツールと成り得ることが考えられる。申請者の所属研究室において開発された唾液腺オルガノイドは、理化学研究所の笹井らのSFEBq法(Suga H et al. Nature, 2011)を応用し、唾液腺の発生段階を *in vitro* で再現することで作製された。作製された唾液腺オルガノイドは構造的かつ機能的な3次元オルガノイドであり、遺伝子発現プロファイルからも、極めてマウス唾液腺原基に類似したものであることが確認されている。以上より、この唾液腺オルガノイドは他臓器で作製されたオルガノイド同様、唾液腺腫瘍発生の解析など多くの当該領域の研究に対して強力な技術基盤に成り得ると考えられた。



## 2. 研究の目的

本研究は、マウス ES 細胞より誘導した唾液腺オルガノイド培養システムを応用することにより、唾液腺腫瘍の発症メカニズムの詳細や、唾液腺腫瘍発生における唾液腺腫瘍関連遺伝子の役割について解明することを目的に実施された。

## 3. 研究の方法

### (1) ES 細胞の維持培養と唾液腺オルガノイド分化誘導法の習得

マウス ES 細胞から効率よく唾液腺オルガノイドを誘導できることを確認した。分化誘導方法として SFEBq 法を用い、マウス ES 細胞を 96 well U bottom プレートに 3000 cells/well で播種し、凝集塊を形成させた。誘導 1 日後には培地にマトリゲルを添加し、3 日後に BMP4 と SB を添加し、5 日後に FGF2 と LDN を添加した。8 日後に凝集塊外周に分化誘導された非神経系外胚葉に対してアデノウイルスを用いて、Sox9 と Foxc1 を過剰発現させた。2 種の転写因子を過剰発現した外周の組織を単離後に FGF7 と FGF10 を添加した培地で浮遊培養を続けた。

分化誘導 20~28 日目に ES 細胞の凝集塊から唾液腺様の分枝構造を持つ組織が発生することが確認され、各種免疫染色にて胎生期唾液腺様の組織が分化誘導されていることを確認した。

### (2) 唾液腺オルガノイドへの唾液腺腫瘍関連遺伝子の導入

唾液腺オルガノイドの遺伝子発現操作を行うため、dCas9-KRAB を用いた薬剤誘導性の発現調節細胞株の樹立に取り組んだ。多能性幹細胞にドキシサイクリン誘導性に dCas9-KRAB を発現するコンストラクトを、TALEN を用いてエレクトロポレーションで挿入した。挿入された細胞に対して G418 を用いて薬剤セクションを行い、コロニーをピックアップし dCas9 挿入細胞株を樹立した。樹立された dCas9-KRAB 挿入株に gRNA 発現コンストラクトをエレクトロポ

レーションにて遺伝子導入した。その後、ブラストサイジンを用いて薬剤セレクションを行い、gRNA 発現細胞株を樹立した。

### (3) 唾液腺オルガノイドを成熟させる培養法の開発

唾液腺オルガノイドは胎生期唾液腺に類似しており、腫瘍形成の有無の解析にはオルガノイドの成熟が必要であると考え、唾液腺オルガノイドの成熟方法の開発にも取り組んだ。ES 細胞から分化誘導した唾液腺オルガノイドに、唾液腺成熟に関与すると報告のある各種成長因子を培地に添加し、唾液腺オルガノイドにおける唾液貯留の有無について解析した。

## 4. 研究成果

### (1) ES 細胞の維持培養と唾液腺オルガノイド分化誘導法の習得

ES 細胞から分化誘導 28 日目に胎生期唾液腺様の分枝構造を持つ組織が分化誘導されていることを確認した(図2)。唾液腺オルガノイドには AQP5 陽性細胞、K18 陽性細胞が極性を持って配列していることを確認した。

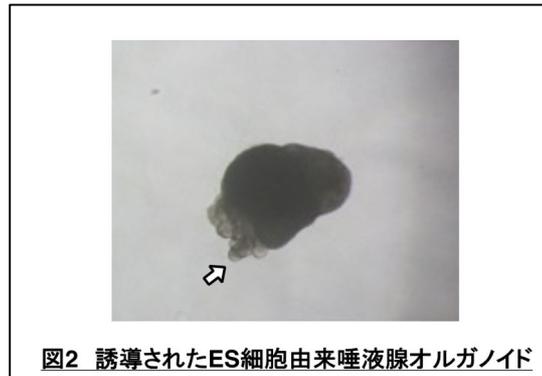


図2 誘導されたES細胞由来唾液腺オルガノイド

### (2) 唾液腺オルガノイドへの唾液腺腫瘍関連遺伝子の導入

TALEN を用いて、dCAS9 を挿入した細胞株を 3 株樹立することができた。PCR の結果、樹立細胞株中 2 株は hetero での挿入が確認され、1 株は homo での挿入が確認された。その後、gRNA 挿入細胞株については多能性幹細胞で発現している Sox2 をポジティブコントロールとしてドキシサイクリンによる遺伝子発現抑制が起こるかを qPCR で確認し、Sox2 遺伝子の発現抑制が確認された。

### (3) 唾液腺オルガノイドを成熟させる培養法の開発

唾液腺オルガノイドを成熟させる培養法の開発として、まず胎生期の唾液腺間葉組織との共培養を行った(図3)。その結果、唾液腺オルガノイドと胎生期唾液腺間葉組織の共培養においてオルガノイドの成熟とともに唾液様液状物の貯留が確認された(図4)。

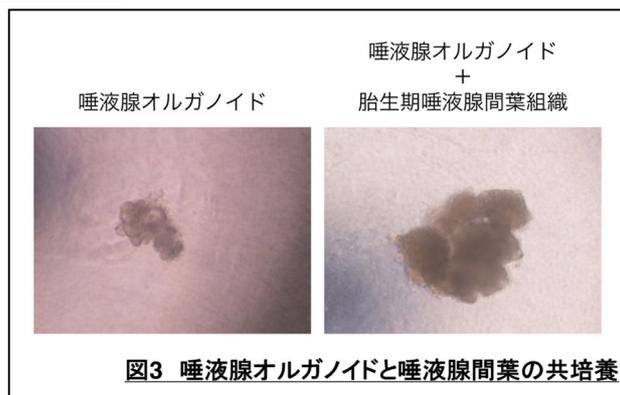


図3 唾液腺オルガノイドと唾液腺間葉の共培養

加えて、各種成長因子の添加により唾液腺オルガノイドへ液状物の貯留が起こるか否かについて解析を行った。唾液腺の成熟に関する VIP などの因子の添加を行ったが、現在のところ成熟因子の同定には至っていない。今後も成熟に関与する因子の検索を継続する。

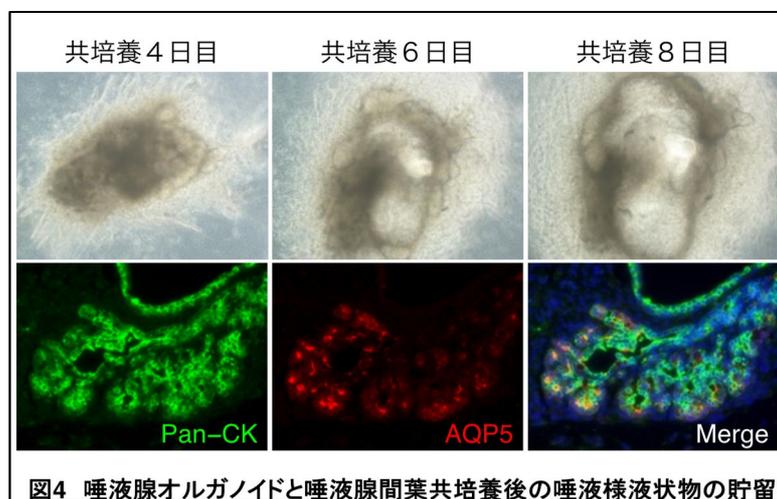


図4 唾液腺オルガノイドと唾液腺間葉共培養後の唾液様液状物の貯留

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Tanaka J, Mabuchi Y, Hata K, Yasuhara R, Takamatsu K, Kujiraoka S, Yukimori A, Takakura I, Sumimoto H, Fukada T, Azuma M, Akiyama H, Nishimura R, Shimane T, Mishima K.	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 Exp Cell Res.	6. 最初と最後の頁 11149
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野口智世、安原理佳、行森茜、田中準一、鯨岡聡子、美島健二
2. 発表標題 多形腺腫由来癌におけるPleomorphic adenoma gene 1の免疫組織学的検討
3. 学会等名 第29回日本臨床口腔病理学会総会・第11回日本口腔検査学会総会共催学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高松弘貴、田中準一、安原理佳、鯨岡聡子、行森茜、鎌谷宇明、代田達夫、美島健二
2. 発表標題 マウス唾液腺老化における唾液腺幹細胞の機能解析
3. 学会等名 昭和大学歯学部文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業平成30年度シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鯨岡聡子、安原理佳、行森茜、高松弘貴、田中準一、美島健二
2. 発表標題 軟口蓋部に発生したSialolipomaの一例
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 行森茜、田中準一、安原理佳、鯨岡聡子、高松弘貴、美島健二
2. 発表標題 Foxc1を介した唾液腺発生メカニズムの解析
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中準一、北條宏徳、安原理佳、鯨岡聡子、行森茜、大庭伸介、美島健二
2. 発表標題 唾液腺発生におけるSox6の転写制御ネットワーク機構
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鯨岡聡子、高倉育子、安原理佳、行森茜、田中準一、美島健二
2. 発表標題 唾液腺腫瘍における腫瘍性筋上皮マーカーの検討
3. 学会等名 第38回分子病理学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鯨岡聡子、安原理佳、矢持淑子、齊藤芳郎、行森茜、田中準一、嶋根俊和、瀧本雅文、美島健二
2. 発表標題 頬粘膜腫瘍の一例
3. 学会等名 第30回日本臨床口腔病理学会・第12回日本口腔検査学会・第29回日本口腔内科学会・第32回日本口腔診断学会合同学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中準一、北條宏徳、安原理佳、行森茜、鯨岡聡子、大庭伸介、美島健二
2. 発表標題 マウス唾液腺初期発生におけるSox9の遺伝子制御機構
3. 学会等名 第30回日本臨床口腔病理学会・第12回日本口腔検査学会・第29回日本口腔内科学会・第32回日本口腔診断学会合同学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 行森茜、田中準一、鯨岡聡子、高松弘貴、安原理佳、美島健二
2. 発表標題 Foxc1を介した唾液腺発生メカニズムの解析
3. 学会等名 第30回日本臨床口腔病理学会・第12回日本口腔検査学会・第29回日本口腔内科学会・第32回日本口腔診断学会合同学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 姜世野、安原理佳、田中準一、鯨岡聡子、行森茜、船津敬弘、美島健二
2. 発表標題 脂肪由来幹細胞は液性因子を介して唾液腺再生を促す
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----