

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10129

研究課題名（和文）唾液腺幹細胞を用いた新規器官再生法の確立と臨床応用

研究課題名（英文）Establishment and clinical application of a novel organ regeneration method using salivary gland stem cells

研究代表者

平木 昭光（Hiraki, Akimitsu）

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：60404034

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：生体マウスから2つの手法を用いて唾液腺幹細胞A、Bを分離、培養することができた。これらの細胞は唾液腺分化マーカーであるアミラーゼやAQ5の発現上昇や、2、3次元的に唾液腺管様配列の誘導が可能であった。この分化誘導にはCa濃度やHGF、IV型コラーゲンが関与する可能性が示唆された。また、唾液腺再生にはさらなる分化誘導が必須であり、新たな条件や刺激因子が必要と考えられた。予備実験にてマウス胎仔唾液腺原基から分離した細胞は間葉組織との共培養でGalanin、R-spondin3の強発現が認められた。この因子は唾液腺分化誘導において重要な可能性があり、新たな刺激因子として実験を計画している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唾液腺の再生研究は唾液腺原基の幹細胞や多能性幹細胞（iPS細胞/ES細胞）を用いた、器官再生（オルガノイド）による再生医療が盛んに行われ、その成果が報告されている。一方で、臨床応用を目指した生体への移植において、唾液腺機能の獲得や安全面、倫理面での多くの課題が残されている。本研究は成体マウスから唾液腺幹細胞を樹立し、これを幹細胞のソースとして、器官再生や幹細胞移入による生体の唾液腺再生法の構築と臨床応用を目指すものである。このように唾液腺再生研究の課題を解決することで、理想的な再生医療が可能となる。

研究成果の概要（英文）：Salivary gland stem cells A and B could be isolated and cultured from living mice using two techniques. These cells were able to induce increased expression of salivary gland differentiation markers amylase and AQ5, as well as salivary gland duct-like arrangements in two and three dimensions. It was suggested that calcium concentration, HGF, and type IV collagen may be involved in this differentiation induction. Further induction of differentiation is essential for salivary gland regeneration, and new conditions and stimulating factors may be necessary. In preliminary experiments, cells isolated from mouse fetal salivary gland primordia showed strong expression of Galanin and R-spondin3 when co-cultured with mesenchymal tissue. This factor may be important in the induction of salivary gland differentiation, and we are planning to test it as a new stimulating factor.

研究分野：口腔外科学

キーワード：唾液腺 再生 分化

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

唾液腺は加齢や薬剤によって機能低下を来たしやすく、QOL を極度に低下させる。現在でも、有効な治療法は確立されておらず、新たな治療法が期待されている。

最近、iPS 細胞による各種臓器の再生研究が急速に進み、臨床試験が開始されている。

唾液腺においては、多彩な細胞より構成されている組織学的特異性や幹細胞の同定が困難なため、大きな進展がなかった。しかし近年、唾液腺原基から幹細胞を分離し、損傷した唾液腺組織に移入することで、腺房細胞の修復と唾液分泌量の改善を認めと報告された(Int J Biochem Cell Biol 2011)。また、唾液腺原基から分離した幹細胞や多能性幹細胞 (iPS 細胞/ES 細胞) からオルガノイドを作成し、損傷した唾液腺を丸ごと置き換える器官再生が試みられている (Nature commun 2018)。

申請者は以前より、低 Ca 無血清培地を作成し、成体マウスの唾液腺組織から未分化で均一な唾液腺幹細胞様細胞を分離・培養できることを確認した。この細胞は高 Ca 濃度環境下や EGF などの成長因子によって 2 次元的に腺管様配列を呈し、さらに IV 型コラーゲンを主とする細胞外器質によって促進された。機能的には分化マーカーであるアミラーゼのタンパクおよび遺伝子の発現増加が認められ、形態学的には電顕にて超微構造の成熟変化が確認されている。この細胞は形態的、機能的に分化能を有し、唾液腺幹細胞の性質を持つ可能性が示唆され、これを用いて唾液腺の修復や再生が可能であると考えられた。

2. 研究の目的

成体マウスの唾液腺から形態や機能を獲得できる分化誘導が可能な幹細胞を樹立し、これを幹細胞のソースとして唾液腺の器官再生法を確立する。さらに、再生器官の移植や幹細胞移入による、生体の唾液腺再生法の構築を目的とする

3. 研究の方法

I. 唾液腺幹細胞の分離・培養と細胞特性の解析

(1) 唾液腺幹細胞 A の分離・培養

8 週齢の C57BL/6J マウスから顎下腺を摘出した後に細切した。抗菌薬入り生理食塩水で洗浄し、プラスチックディッシュ上に付着させた後に低 Ca (0.2mM) 無血清 MCDB153/DMEM 培地を加えて培養し、顎下腺細切片周囲に増殖した唾液腺幹細胞を分離した。

(2) 唾液腺幹細胞 A の解析

この細胞の起源や特性を明らかにするために 2 種類の条件下 (Ca 濃度 0.2mM と 1.0mM) で以下の唾液腺関連マーカーについて免疫染色を行った。

上皮細胞 (Pan-CK、E-cadherin)、導管細胞 (CK-18、CK-19)、腺房細胞 (AQ5、Amylase)、筋上皮細胞 (-SMA)、細胞増殖 (Ki-67)

(3) 唾液腺幹細胞 B の分離・培養

8 週齢の C57BL/6J マウスから顎下腺を摘出し、1mm 以下に細切した後にコラゲナーゼ typeII とヒアルロニダーゼが入った MEM で 2 時間処理を行った。回収した細胞を Matrigel™-growth factor reduced で被覆したプラスチックプレート上で DMEM/F12 に EGF や FGF10 などの因子を加えた培養液にて培養し、オルガノイドの周囲に発生した細胞を分離した。

(4) 唾液腺幹細胞 B の解析

この細胞の起源や特性を明らかにするために Ca 濃度 0.2mM 下での唾液腺関連マーカーについて免疫染色を行った。

基底細胞 (p63)、筋上皮細胞 (-SMA)、腺房細胞 (AQ5、Amylase)

II. 唾液腺幹細胞の 2 次元分化誘導

細胞外基質 (フィブロネクチン、ラミニン、IV 型コラーゲン) をコーティングしたディッシュ上で唾液腺幹細胞 A、B の細胞培養を行い、HGF の刺激によって唾液腺関連マーカー (Amylase、AQ5) の免疫染色を行った。

III. 唾液腺幹細胞を用いた 3 次元誘導

105 個の唾液腺幹細胞 A と B をそれぞれ 3 種類の細胞外基質 (フィブロネクチン、ラミニン、IV 型コラーゲン) を含んだゲルに埋入して培養し、HGF 刺激を行って形態的变化を観察した。

4. 研究成果

I. 唾液腺幹細胞の分離・培養と細胞特性の解析

(1) 唾液腺幹細胞 A

唾液腺関連マーカーの発現（免疫染色）：すべての細胞において Pan-CK と E-cadherin が陽性を示し、上皮細胞であることが確認できた。また、導管細胞のマーカーである CK-18、CK-19 は陽性で、腺房細胞のマーカーである AQ5 と Amylase はほとんど染色性を示さなかった。筋上皮細胞のマーカーである -SMA は陰性であった。また、ほぼすべての細胞において Ki-67 の弱い染色性を示した。次に、培地の Ca 濃度を 0.2mM から 1mM に上昇させると、個々の細胞は大きくなり、やや長細くなった後に直線上に配列し、腺管様配列を形成した。その細胞は CK-18、CK-19、-SMA の発現に変化はなかったが、AQ5 と Amylase の発現が上昇した。また、すべての細胞において Ki-67 は発現しなかった。

このことより、マウス顎下腺から分離培養した細胞は唾液腺の導管上皮細胞の性格を持ち、未分化なものであることが示唆された。Ca 濃度を上昇させることにより、形態的に唾液腺用の配列を示し、AQ5 と Amylase の発現が見られるなど唾液腺固有の機能が確認され、唾液腺幹細胞の性質を持ち得る可能性が示唆された。

	抗体	0.2mM	1.0mM
上皮細胞	Pan-CK	+	+
	E-cadherin	+	+
導管細胞	CK-18	+	+
	CK-19	+	+
腺房細胞	AQ5	-	+
	Amylase	-	+
筋上皮細胞	-SMA	-	-
細胞増殖	Ki-67	+/-	-

（2）唾液腺幹細胞 B

この細胞の多くが p63 に陽性を示し、SMA 陽性細胞が散見され、AQ5 はほとんどが陰性を示した。このことより、この分離細胞群には多くの幹細胞や一部は筋上皮細胞に分化した細胞が含まれている可能性が示唆された。

	抗体	0.2mM
基底細胞	p63	+
腺房細胞	AQ5	+/-
	Amylase	+/-
筋上皮細胞	SMA	-

II. 唾液腺幹細胞の 2 次元分化誘導

分離細胞 A、B の分化誘導に際し、細胞外基質（フィブロネクチン、ラミニン、IV 型コラーゲン）と HGF がどのような影響を及ぼすかを検討した。分離細胞 A は IV 型コラーゲン及び HGF の刺激によって Amylase の増加が確認された。AQ5 は明らかな増加は確認できなかった。分離細胞 B では HGF 刺激で Amylase の増加が確認され、細胞外基質の影響は明確ではなかった。

刺激因子	唾液腺幹細胞 A		唾液腺幹細胞 B	
	Amylase	AQ5	Amylase	AQ5
FN	変化なし	変化なし	変化なし	変化なし
LN	変化なし	変化なし	変化なし	変化なし
IV コラーゲン	上昇	変化なし	変化なし	変化なし
HGF	上昇	変化なし	上昇	変化なし

III. 唾液腺幹細胞を用いた 3 次元誘導

分離細胞 A は IV 型コラーゲンで培養し、HGF 刺激を加えることで細胞配列が導管様に変化した。また、分離細胞 B は HGF 刺激を行うと細胞間距離がやや開いたが、導管様の配列は認めなかった。細胞外基質間の差はなかった。

これらは 2 次元的な実験結果と概ね一致する結果であった。

刺激因子	分離細胞 A	分離細胞 B
FN	変化なし	変化なし
LN	変化なし	変化なし
IV コラーゲン	導管様配列	変化なし
HGF	導管様配列	細胞間距離が開大

IV. 研究結果のまとめと今後の展望

唾液腺幹細胞 A、B を用いてアミラーゼや A05 の発現上昇に加え、2、3 次元的に唾液腺管様配列の誘導を示唆する結果を得ることができた。しかしながら、唾液腺再生のためにはさらなる分化誘導が必要である。

予備実験にてマウス胎仔唾液腺原基から分離した細胞と共培養した周囲間葉組織、共培養していない周囲間葉組織をそれぞれ DNA マイクロアレイ解析にて比較したところ、Galantin (共培養により 18 倍に増加)、R-spondin3 (共培養により 2.4 倍に増加) の発現に差異が認められた。その再現性の確認実験を行う予定である。また、それらの実験で抽出された因子は唾液腺分化誘導において重要な役割をなす可能性があり、新たな刺激因子として分化誘導の実験を計画している。

Gene_Symbol	Gene_Description	compare1_Zscore	compare1_ratio	E_signal	M_signal
Rian	RNA imprinted and accumula	13.959861	149.73119	4207.0697	28.097483
Gal	galantin	8.7298057	18.003693	2578.8283	143.23885
Rspo3	R-spondin 3	3.0546446	2.4801889	7359.4896	2967.3101

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kawahara Kenta, Hiraki Akimitsu, Arita Hidetaka, Takeshita Hisashi, Hirotsue Akiyuki, Matsuoka Yuichiro, Sakata Junki, Obayashi Yuko, Nakashima Hikaru, Hirayama Mayumi, Nagata Masashi, Yoshida Ryoji, Shinohara Masanori, Nakayama Hideki	4. 巻 27(6)
2. 論文標題 Role of serum amylase and salivary cytokines in oral complications during chemoradiotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oral Diseases	6. 最初と最後の頁 1564-1571
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/odi.13686.	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 Yoshimoto S, Yoshizumi J, Anzai H, Hiraki A, Hashimoto S.	4. 巻 13(9)
2. 論文標題 Inhibition of Alk signaling promotes the induction of human salivary-gland-derived organoids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Disease models & mechanisms	6. 最初と最後の頁 dmm045054
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dmm.045054.	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	吉本 尚平 (Yoshimoto Shohei) (70780188)	福岡歯科大学・口腔歯学部・講師 (37114)	

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