

令和 4 年 6 月 10 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：2020～2021

課題番号：20K23064

研究課題名（和文）ES細胞由来の唾液腺間葉細胞を用いたハイブリッド型唾液腺オルガノイドの開発

研究課題名（英文）Development of hybrid salivary gland organoids using ES cell-derived salivary gland mesenchymal cells

研究代表者

高松 弘貴（Takamatsu, Koki）

昭和大学・歯学部・兼任講師

研究者番号：10878200

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はES細胞、iPS細胞から神経堤細胞を介し唾液腺間葉細胞を誘導することを目標としている。検討の結果、ヒトiPS細胞からは過去の報告に基づき神経堤細胞を誘導することが可能であり、現在FGF-2やBMP4を各種濃度で添加し唾液腺間葉細胞の誘導を検討中である。また、マウスES細胞からの神経堤細胞誘導は培養条件を現在検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唾液腺疾患の代表的なものでは口腔乾燥症（ドライマウス）が挙げられる。口腔乾燥症の潜在的患者数は800万人ともいわれており、その原因には、シェーグレン症候群や唾液腺組織の外科的切除などが挙げられる。現在の口腔乾燥症に対する治療方法には、ピロカルピンによる副交感神経刺激薬などの使用による対症療法が主体であり、根治療法として再生医療を応用した損傷唾液腺の腺組織再生が必要と考えられている。本研究を通して持続的成長可能な唾液腺オルガノイドが作出できると創薬などの強力なツールとなり得る。

研究成果の概要（英文）：The goal of this study is to induce salivary gland mesenchymal cells via neural crest cells from ES and iPS cells. Based on previous reports, neural crest cells can be induced from human iPS cells, and we are currently investigating the induction of salivary gland mesenchymal cells by adding FGF-2 and BMP4 at various concentrations. We are currently investigating the culture conditions for the induction of neural crest cells from mouse ES cells.

研究分野：口腔科学

キーワード：唾液腺 オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

・唾液腺疾患への治療

唾液腺疾患の代表的なものでは口腔乾燥症(ドライマウス)が挙げられる。口腔乾燥症の潜在的患者数は800万人ともいわれており、その原因には、シェーグレン症候群や唾液腺組織の外科的切除などが挙げられる。現在の口腔乾燥症へ対する治療方法には、ピロカルピンによる副交感神経刺激薬などの使用による対症療法が主体であり、根治療法として再生医療を応用した損傷唾液腺の腺組織再生が必要と考えられている。

・唾液腺再生

近年、ES・iPS細胞などの多能性幹細胞から3次元的な組織構築を有するオルガノイドの分化誘導に関する多くの報告がなされている。生体内の臓器発生過程をin vitroで模倣することによって多能性幹細胞から多種の臓器オルガノイド誘導方法が確立され、臓器特有の構造と機能を持つことが証明されてきた。一方、これまで分泌機能を有する唾液腺オルガノイドに関する報告はなかったが、研究代表者らは唾液腺発生に重要な転写因子を応用することによりマウスES細胞より分泌機能を有する唾液腺オルガノイドの作出に成功した(Tanaka J, et al., Nature Communications. 2018)。本技術により誘導した唾液腺オルガノイドは腺房細胞、導管細胞、筋上皮細胞が極性を持って配列し遺伝子発現プロファイルも胎生期唾液腺に極めて類似していた。本技術により唾液腺の誘導は可能となったが、間葉組織を有していないためその遺伝子発現は胎生期唾液腺に類似しており、オルガノイドの成熟には胎生期マウス唾液腺の間葉組織との共培養が必要であった。しかしながら、将来的に臨床応用を視野に当該技術をヒトiPS細胞に応用する場合、当該間葉組織の細胞ソースの問題を解決する事が喫緊の課題であった。

2. 研究の目的

本研究の目的はマウスES細胞から唾液腺間葉細胞の誘導法を確立し、間葉組織を有する成熟した唾液腺オルガノイドを作出することにある。これまで、研究代表者らがマウスES細胞より作出した唾液腺オルガノイドは胎生期マウス唾液腺間葉との器官培養が可能である。本研究により、マウスES細胞より唾液腺間葉細胞の誘導が可能となれば、すべての細胞ソースがES細胞由来の成熟唾液腺を構築することが可能となり、これまでにない極めて独自性に富んだ研究といえよう。

3. 研究の方法

(1) マウスES細胞から神経堤前駆細胞の誘導

過去の報告で唾液腺間葉は神経堤由来である可能性が報告されている(Le Douarin, N. et al. Development; 2004)。研究代表者らはまずES細胞から神経堤前駆細胞の誘導を笹井らの報告した手法(Mizuseki K, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003)で行う。具体的にはマウスES細胞(EB5)を神経分化誘導法の一つであるSDIA法(マウス骨髄由来PA6細胞との共培養)を用いて外胚葉から誘導する。神経堤前駆細胞誘導の確認は神経堤マーカーであるSox9, Sox10やFoxd3を用いる。

(2) 神経堤前駆細胞から唾液腺間葉細胞の誘導

神経堤からの神経組織などへの分化にはWntやBMPシグナルなどが関わっている。そこで、唾液腺間葉細胞の誘導は、神経堤前駆細胞へBMP4やTGF- β などを各種濃度で添加することで行う。誘導した神経堤由来唾液腺間葉細胞の遺伝子発現プロファイルをマウス胎生期唾液腺間葉（既に保有）、唾液腺上皮（既に保有）、マウス骨髄間葉系幹細胞の遺伝子発現プロファイルと比較する。加えて、胎生期顎下腺間葉で高発現を認めたマーカーとして報告のあるNr5a2, Negr1, Klf14, Satb2などのマーカーを用いて唾液腺間葉への分化を検証する（Sekiguchi R, et al. J Dent Res. 2020）。

(3) 誘導した唾液腺間葉細胞の機能解析

誘導した唾液腺間葉細胞は唾液腺オルガノイドあるいは胎生期唾液腺上皮との再構成器官培養を行う。器官培養後の評価としては分枝形態形成の有無、唾液腺マーカー（AQP5, K-18, K-5, α -SMA, Amylase など）を用いた組織学的解析や RT-qPCR による遺伝子発現解析にて行う。この際、ES 細胞から誘導したマウス骨髄間葉系幹細胞やさらに分化した神経細胞との比較も行う。また、再構成器官培養した唾液腺オルガノイドをコラーゲン包埋し耳下腺を切除したマウスへ同所移植する。移植後 30 日で移植片を組織学的解析に加えピロカルピン刺激による唾液分泌能の解析をする。

(4) ヒト iPS 細胞からの唾液腺間葉細胞の誘導の検討

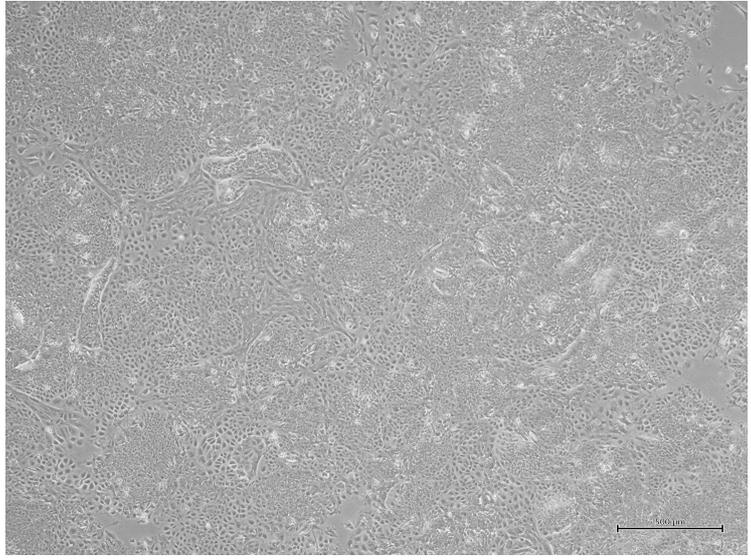
これまでの報告でヒト iPS 細胞から神経堤細胞への誘導は多く報告されている。したがって、マウス ES 細胞から唾液腺間葉細胞の誘導の方法に従って誘導することとした。神経堤細胞までの誘導は具体的にヒト iPS 細胞(201B7)をマトリゲルコーティングしたディッシュ上に播種（10,000 cells per cm²）し、N2, B27, ROCK-inhibitor を添加した基礎培地で培養する。翌日、N2, CHIR99021 を添加した培地へ変更し 6 日間培養する。その後、神経堤マーカーである p75, HNK-1 で抗体染色し、FACS を用いて単離する。単離した細胞に対し、BMP-4, FGF-2 等を各種濃度で添加し唾液腺間葉細胞への誘導を目指す。

4 . 研究成果

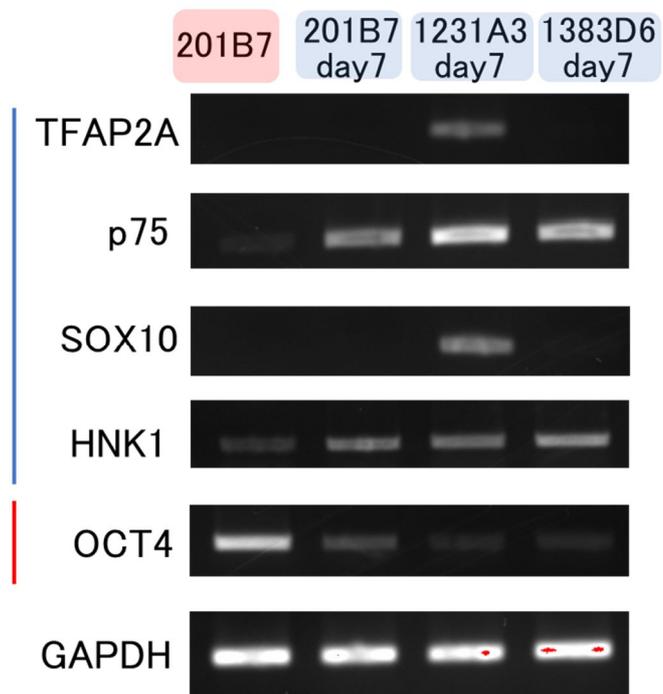
・ iPS 細胞から神経堤細胞の誘導

ヒト iPS 細胞からの神経堤細胞誘導結果を示す。

当初は 201B7 を用いて神経堤細胞の誘導を目指したが、神経堤マーカーの発現を認めず、1231A3, 1383D6 の細胞株も加えて検討を行った。RT-PCR で用いたマーカーは神経堤マーカーである TFAP2A, P75, SOX10, HNK1 未分化マーカーである OCT4 である。以下に培養開始 7 日目の RT-PCR 結果と培養像を示す。

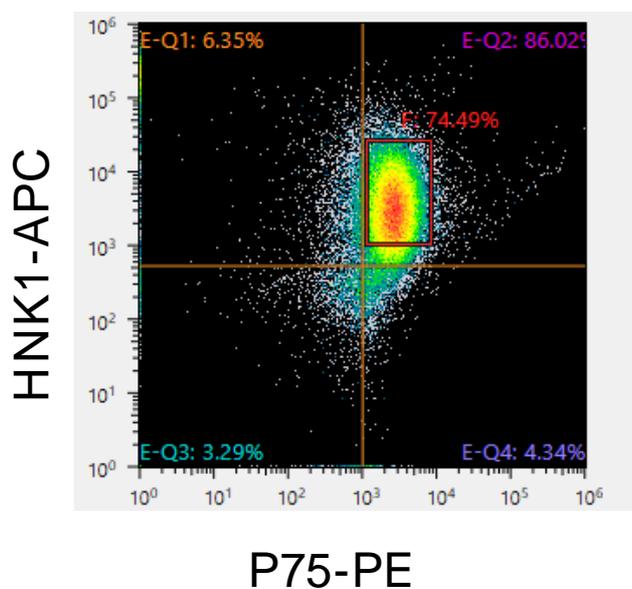


1231A3 培養像



これらの結果から 1231A3 の細胞株で神経堤細胞への分化を認める結果となった。

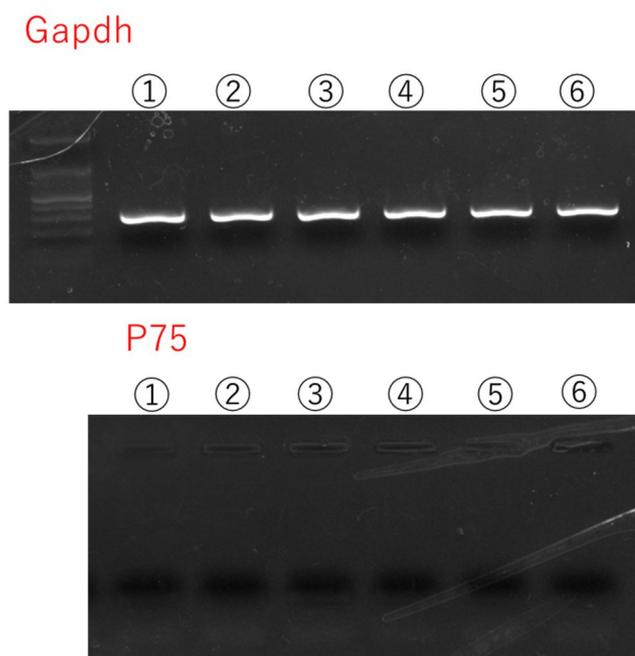
また誘導した神経堤細胞を FACS で用いて解析を行った結果を示す。



FACS の結果、74,49%の細胞が神経堤細胞に誘導されたことが分かった。
今後は FGF-2 等をこれらの細胞へ添加することで、唾液腺間葉細胞の誘導を目指す。

・マウス ES 細胞からの神経堤細胞の誘導

マウス ES 細胞と PA6 細胞を共培養し RT-PCR を行った結果を示す。(n=6)



RT-PCR の結果、神経堤細胞への分化は認めなかった。この結果から、培養条件の更なる検討が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

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

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