

令和 6 年 10 月 7 日現在

機関番号：32622

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2022～2023

課題番号：21KK0290

研究課題名（和文）次世代胚盤胞補完法と大動物を用いた機能的な唾液腺の創生

研究課題名（英文）Generation of functional salivary glands using conditional blastocyst complementation and large animals

研究代表者

田中 準一（Tanaka, Junichi）

昭和大学・歯学部・准教授

研究者番号：40710166

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,600,000円

渡航期間： 12ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究ではFoxa2細胞系譜特異的にFgfr2を欠損させたマウスでは唾液腺発生が起らないことを見出した。またこの唾液腺欠損を示すマウスの胚盤胞にマウス多能性幹細胞を注入することで、唾液腺欠損の表現型を多能性幹細胞が補完し、多能性幹細胞由来の唾液腺をマウス体内で作出することに成功した。胚盤胞補完を行ったマウスは正常に出生、成長することが可能であり、成獣においても野生型と同等の組織構造を有する多能性幹細胞由来唾液腺を伴っていることが明らかとなった。これらのアプローチは唾液腺再生医療の基盤技術を提供するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔乾燥症（ドライマウス）の潜在的患者数は800万人ともいわれており、齲蝕、口腔感染症および摂食嚥下障害などの罹患率の上昇がみられる。現在根治療法が存在しないため唾液腺再生医療の開発が切望されている。本研究では、胚盤胞補完法を用いてES細胞およびiPS細胞からマウス体内で野生型と同等のサイズおよび組織構造を伴う唾液腺の作出に成功した。これらの成果は、将来的な大動物を用いた胚盤胞補完法によりヒトサイズの唾液腺を作出するための基盤技術となり得る。

研究成果の概要（英文）：Ablation of Fgfr2 within the Foxa2 lineage in mice leads to salivary gland agenesis. We reversed this phenotype by injecting donor pluripotent stem cells into the mouse blastocysts, resulting in mice that survived to adulthood with salivary glands of normal size, comparable to those of their littermate controls. These findings demonstrate that CBC-based salivary gland regeneration serves as a foundational experimental approach for future advanced cell-based therapies.

研究分野：再生医療

キーワード：唾液腺 胚盤胞補完法 多能性幹細胞

1. 研究開始当初の背景

口腔乾燥症（ドライマウス）の潜在的患者数は **800** 万人ともいわれており、齲蝕、口腔感染症および摂食嚥下障害などの罹患率の上昇がみられる。現在の治療法として人工唾液や受容体刺激による唾液分泌促進薬などがあげられる。しかしながら、腺組織障害の著しい症例では必ずしも奏功せず、再生医療による根治療法の開発が切望されている。

これを実現するために、唾液分泌障害マウスを用いた組織幹細胞による治療実験が行われてきた。申請者も、唾液腺 **CD31** 陽性血管内皮様細胞の唾液分泌障害抑制機能(Mishima et al., 2012)や、**CD133** 陽性唾液腺幹前駆細胞の腺組織再生能を報告してきた(Tanaka et al., 2019)。しかし、傷害されたヒト唾液腺組織から、十分な組織幹細胞を単離、増殖するのは極めて困難であるという課題が考えられた。そこで申請者らはこれまでマウス **ES** 細胞およびヒト **iPS** 細胞より3次元的な唾液腺オルガノイドを世界に先駆けて作出してきた(Tanaka et al., 2018, 2022)。

申請者が開発したマウスおよびヒト **PSC** 由来唾液腺オルガノイドは **in vitro** では胎生期唾液腺に類似した性質を持ち、これを唾液腺切除マウスへ移植すると成熟した唾液腺を形成した。さらに、移植マウスからは唾液分泌が検出された。ところが、そのサイズは野生型唾液腺と比べて小さく、唾液分泌量の回復効果は乏しかった。すなわち、オルガノイド移植の系では、臓器サイズが確保できないという新たな課題が残った。

本研究では、唾液腺発生過程におけるシグナルを利用し、ドナー細胞由来の唾液腺臓器をつくる可能性をもつ胚盤胞補完法に着目した。胚盤胞補完法は、臓器無形成マウス発生初期に **PSC** 細胞を注入し臓器無形成の表現型を補完することで、**PSC** 細胞由来の機能的臓器を創生する手法である。この方法の有効性は、マウスやラット、大動物で確認されている。これまでに胚盤胞補完法を用いて腎臓、膵臓、血管などが機能的かつ、臓器サイズが保たれつつ、作出されてきた。本研究では、この胚盤胞補完法を用いて機能的唾液腺の作出に取り組んだ。

2. 研究の目的

唾液腺再生医療の究極の目標は、患者由来細胞から唾液腺を創生し移植することである。しかし、真に機能的で形態が複雑な唾液腺を作出している例はいまだない。胚盤胞補完法を用いて、機能的唾液腺の作出、種間による唾液腺臓器サイズ制御メカニズムの解明、および大型動物での唾液腺形成メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 唾液腺特異的なプロモーターを用いた Fgfr2 ノックアウト唾液腺欠損マウスの作成

胚盤胞補完による唾液腺作出のドナーモデルマウスとして唾液腺欠損の表現型をもつモデルマウスが必要となるコンディショナル KO を用いて胚盤胞補完による唾液腺作出のドナーマウスを作出した。

(2) 唾液腺欠損マウスへのマウス iPS 細胞による胚盤胞補完

作出した唾液腺欠損マウスの胚盤胞にマウス iPS 細胞を注入し、唾液腺発生を iPS 細胞が補完するか、キメラマウスは正常発生するか、について検証した。

(3) ブタ唾液腺形成メカニズムの解析

将来的な大動物を用いた胚盤胞補完による唾液腺発生に向けて、ブタ唾液腺の発生について組織学的な解析を行った。

4. 研究成果

(1) 唾液腺特異的なプロモーターを用いた Fgfr2 ノックアウト唾液腺欠損マウス作成

唾液腺特異的 Fgfr2 conditional KO マウスの作成に向けて、唾液腺の発生母組織である胎生期口腔粘膜に特異的な遺伝子を抽出した。具体的には、Pitx2 および Shh が胎生期口腔粘膜に発現することを見出した。そこで、口腔粘膜に発現を示す Pitx2 および Shh の Cre マウスと Fgfr2 flox マウス、Rosa-lox-stop-lox-tdTomato マウスを掛け合わせコンディショナル KO マウスを作出した。しかしながら予想に反して Shh および Pitx2 のコンディショナル KO マウスは胎生 18.5 日で野生型と同等の組織構造を持つ唾液腺組織が形成されていた(図1)。さらに tdTomato による系譜追跡では大部分の唾液腺上皮が標識されており Cre でのリコンビネーションは起こっているにもかかわらず、唾液腺組織が形成されていることが明らかとなった。この原因については同定できていないが、リコンビネ

Shh-Cre; Fgfr2^{flox/flox}; tdTomato E18.5 Pitx2-Cre; Fgfr2^{flox/flox}; tdTomato E18.5

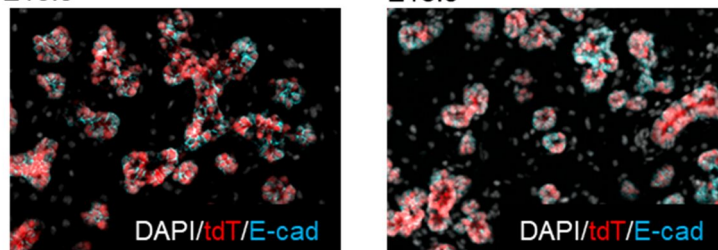


図1. Shh Pitx2を用いたFgfr2コンディショナルKOマウス唾液腺

図1. Shh Pitx2を用いたFgfr2コンディショナルKOマウス唾液腺

ーションの時期が唾液腺発生より遅れている可能性、Fgfr2 領域の組み換え効率が低い可能性などが考えられる。

次に新たな候補となる遺伝子として Foxa2 に着目した。Foxa2 は内胚葉系譜マーカーとしてよく知られている遺伝子の一つであるが、scRNA-seq のデータより口腔粘膜の一部に発生初期より Foxa2 が発現していることを見出した。Foxa2 細胞系譜を tdTomato により追跡すると、唾液腺発生前の胎生 10.5 日の口腔粘膜上皮はすべて tdTomato で標識され、胎生 14.5 日の唾液腺上皮では大部分の上皮細胞が標識されていることが明らかとなった(図2)。この Foxa2 細胞系譜において Fgfr2 を KO するマウスを作製し胎生 18.5 日で解析を行うと、コンディショナル KO マウスでは唾液腺が完全に欠損していることが明らかとなった(図3)。

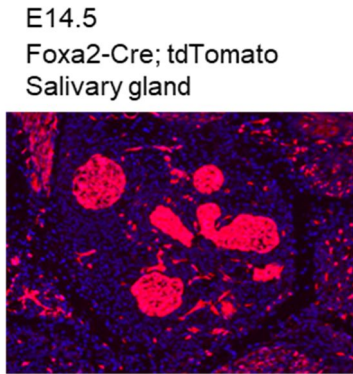
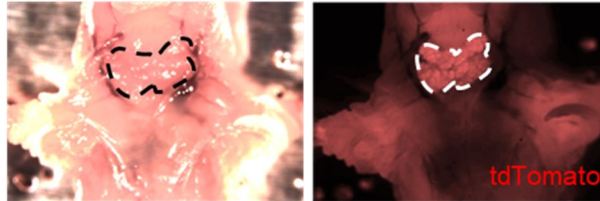


図2. Foxa2細胞系譜追跡

Foxa2-Cre; Fgfr2^{fl/+}; tdTomato E18.5



Foxa2-Cre; Fgfr2^{fl/fl}; tdTomato E18.5

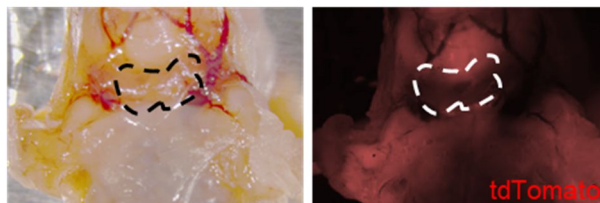


図3. Foxa2細胞系譜特異的Fgfr2-KOマウスの唾液腺欠損

(2) 唾液腺欠損マウスへのマウス iPS 細胞による胚盤胞補完

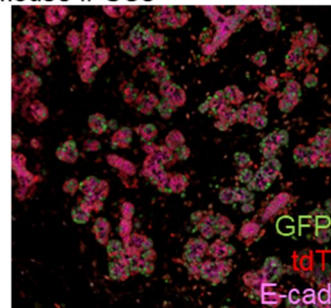
唾液腺無形成モデル Fgfr2 conditional KO マウスの胚盤胞に GFP 陽性マウス iPS 細胞を注入し、仮親へ移植した。胎生 17.5 日の解析ではコントロールのヘテロマウスではドナーの GFP 陽性細胞と tdTomato 陽性のホストの細胞が唾液腺上皮においてキメラを形成していた。それに対し Fgfr2 コンディショナル KO マウスでは唾液腺上皮はドナーの GFP 陽性細胞のみから形成されていた。免疫染色の結果、補完された唾液腺は組織学的に野生型と同等の発生過程を示していることが明らかとなった(図4)。

さらに胚盤胞補完法を行った Fgfr2 コンディショナル KO マウスは出生後も生存する事が可能で、4 週齢の解析でも野生型と同等のサイズおよび組織構造を有する唾液腺が形成されていることが明らかとなった。

(3) ブタ唾液腺形成メカニズムの解析

将来的な大動物を用いた胚盤胞補完による唾液腺発生に向けて、ブタ唾液腺の発生について組織学的な解析を行った。胎生期ブタの唾液腺発生時期は不明なため、唾液腺発生時期の探索を行った。胎生 24 日目の顎下部に唾液腺様の組織の発生が確認されたが、詳細についてはさらなる検討が必要であった。

Foxa2-Cre; Fgfr2^{fl/+}; tdTomato E18.5
+ mouse iPSCs



Foxa2-Cre; Fgfr2^{fl/fl}; tdTomato E18.5
+ mouse iPSCs

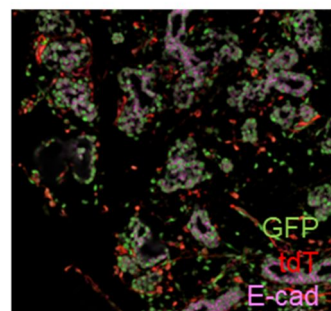


図4. 唾液腺の胚盤胞補完

本研究結果は論文として発表した(Tanaka et al., 2024)。

< 引用文献 >

Mishima, K., Inoue, H., Nishiyama, T., Mabuchi, Y., Amano, Y., Ide, F., Matsui, M., Yamada, H., Yamamoto, G., Tanaka, J., Yasuhara, R., Sakurai, T., Lee, M. C. I., Chiba, K., Sumimoto, H., Kawakami, Y., Matsuzaki,

Y., Tsubota, K., & Saito, I. (2012). Transplantation of side population cells restores the function of damaged exocrine glands through clusterin. *Stem Cells*, 30(9), 1925–1937.

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. (2019). Sox9 regulates the luminal stem/progenitor cell properties of salivary glands. *Experimental Cell Research*, 382(1), 111449.

Tanaka, J., Miura, A., Shimamura, Y., Hwang, Y., Shimizu, D., Kondo, Y., Sawada, A., Sarmah, H., Ninish, Z., Mishima, K., & Mori, M. (2024). Generation of salivary glands derived from pluripotent stem cells via conditional blastocyst complementation. *Cell Reports*, 43(6), 114340.

Tanaka, J., Ogawa, M., Hojo, H., Kawashima, Y., Mabuchi, Y., Hata, K., Nakamura, S., Yasuhara, R., Takamatsu, K., Irié, T., Fukada, T., Sakai, T., Inoue, T., Nishimura, R., Ohara, O., Saito, I., Ohba, S., Tsuji, T., & Mishima, K. (2018). Generation of orthotopically functional salivary gland from embryonic stem cells. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-018-06469-7>

Tanaka, J., Senpuku, H., Ogawa, M., Yasuhara, R., Ohnuma, S., Takamatsu, K., Watanabe, T., Mabuchi, Y., Nakamura, S., Ishida, S., Sadaoka, T., Takaki, T., Shirota, T., Shimane, T., Inoue, T., Sakai, T., Mori, M., Tsuji, T., Saito, I., & Mishima, K. (2022). Human induced pluripotent stem cell-derived salivary gland organoids model SARS-CoV-2 infection and replication. *Nature Cell Biology*, 24(11), 1595–1605.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sarmah Hemanta, Sawada Anri, Hwang Youngmin, Miura Akihiro, Shimamura Yuko, Tanaka Junichi, Yamada Kazuhiko, Mori Munemasa	4. 巻 11
2. 論文標題 Towards human organ generation using interspecies blastocyst complementation: Challenges and perspectives for therapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2023.1070560	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 該当する
1. 著者名 Shimamura Yuko, Tanaka Junichi, Kakiuchi Miwako, Sarmah Hemanta, Miura Akihiro, Hwang Youngmin, Sawada Anri, Ninish Zurab, Yamada Kazuhiko, Cai James J., Mori Munemasa	4. 巻 -
2. 論文標題 A developmental program that regulates mammalian organ size offsets evolutionary distance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2022.10.19.512107	査読の有無 無
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 該当する
1. 著者名 Miura Akihiro, Sarmah Hemanta, Tanaka Junichi, Hwang Youngmin, Sawada Anri, Shimamura Yuko, Otoshi Takehiro, Kondo Yuri, Fang Yinshan, Shimizu Dai, Ninish Zurab, Suer Jake Le, Dubois Nicole C, Davis Jennifer, Toyooka Shinichi, Wu Jun, Que Jianwen, Hawkins Finn J, Lin Chyuan-Sheng, Mori Munemasa	4. 巻 12
2. 論文標題 Conditional blastocyst complementation of a defective Foxa2 lineage efficiently promotes the generation of the whole lung	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.86105	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 該当する
1. 著者名 Tanaka Junichi, Miura Akihiro, Shimamura Yuko, Hwang Youngmin, Shimizu Dai, Kondo Yuri, Sawada Anri, Sarmah Hemanta, Ninish Zurab, Mishima Kenji, Mori Munemasa	4. 巻 43
2. 論文標題 Generation of salivary glands derived from pluripotent stem cells via conditional blastocyst complementation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 114340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2024.114340	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 該当する

〔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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	森 宗昌 (Mori Munemasa)	コロンビア大学・Irving Medical Center・Assistant Professor	

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		
米国	Columbia University		