

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592718

研究課題名(和文) iPS細胞を用いた唾液腺細胞分化誘導法の確立

研究課題名(英文) Differentiation of iPS cells into salivary glands

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) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はiPS細胞を用いた細胞治療を唾液分泌障害の新規治療法として確立する事を目的に施行された。具体的には、LCA (large-cell aggregate)-SFEBq法を用いて口腔粘膜上皮まで分化誘導したiPS細胞を、胎仔マウス顎下線(E11.5とE13.5)から樹立した間質細胞上で培養し、唾液腺細胞への分化誘導の可能性を検証した。その結果、本法により分化誘導されたiPS細胞において、唾液腺に高い発現を示すAqp5, M3AChR, および β -2AdR遺伝子の発現上昇が認められた。したがって、本法がiPS細胞から唾液腺細胞の分化誘導法として有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Salivary gland hypofunction causes not only various oral diseases but also a decrease in quality of life by systemic diseases, such as aspiration pneumonia. However, to date, there is no efficient method to treat the patients with severe symptoms. The purpose of this study is to apply a regenerative medicine using induced pluripotent (iPS) cells for these patients. We established stromal cells from salivary glands of mice at embryonic day 11.5 and 13.5, respectively. iPS cells were differentiated into oral epithelium using LCA (large-cell aggregate)-SFEBq method. These iPS cells were cultured on the established feeder cells and specific gene expressions for salivary glands were detected by RT-PCR. Consequently, gene expressions of Aqp5, M3AChR, and beta2AdR, which are highly expressed in salivary glands, were increased in these iPS cells. Therefore, these results suggested that the present method could be applied for the differentiation of iPS cells into salivary gland cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯学

キーワード：唾液分泌障害 再生医療 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

重篤な唾液分泌障害は、様々な口腔病変や摂食嚥下障害による誤嚥性肺炎などの一因となることが知られている。これらの対処法の現状は、人工唾液の使用や残存する腺房細胞の分泌を促進するムスカリン性アセチルコリン受容体アゴニストなどの服用があげられが、唾液腺組織の損傷が著しく症状が重篤な症例では、より効果的な治療法として幹細胞を用いた再生医療の応用が考えられている。これまで、再生医療で利用される幹細胞のソースとしては、胚性幹 (embryonic stem: ES) 細胞や臓器固有に存在する組織幹細胞が代表的であったが、2007年に京都大学の山中博士により樹立された人工多能性幹 (iPS) 細胞は、これらの幹細胞の欠点を補う極めて有用な幹細胞ソースの一つと考えられる。すなわち、iPS細胞は、ES細胞様の多分化能および増殖能を有する上に、患者本人から樹立可能であることから、ES細胞の使用に伴う移植時の拒絶反応や受精卵の利用といった倫理的問題を回避することが可能である。また、外分泌腺などの組織幹細胞は、*in vitro*で大量培養することが難しいことが明らかとなってきた。このことから、本研究ではiPS細胞を用いた唾液腺細胞の誘導法を確立することを目的とする。これまで、造血系の細胞をはじめiPS細胞の分化誘導法に関する報告がなされているが、基本的にはES細胞からの分化誘導法と同様の手法が用いられている。すなわち、標的細胞を誘導する基本的な転写因子の遺伝子導入、分化誘導因子の添加およびフィーダー細胞の利用であり、本研究においても同様な手法の応用が可能と考えられる。

当該研究ではマウスiPS細胞を用いて唾液腺細胞への分化誘導法を確立し、最終的なゴールとして、診断目的で採取された小唾液腺より樹立された患者自身のiPS細胞から分化誘導した唾液腺細胞を用いて臨床応用を図りたい。

2. 研究の目的

ES細胞様の性格を有する未分化なiPS細胞から唾液腺細胞を分化誘導するためには、その発生の初期過程を*in vitro*で再現する必要がある。このことから本研究では、マウスの顎下腺をモデルとして、その胎生期における上皮-間葉の相互作用を*in vitro*で再構築することによりiPS細胞から当該腺組織の細胞を分化誘導する。

内胚葉由来であるマウス顎下腺の原基は、胎生期の11.5日(E11.5)に口腔粘膜の陥入により形成される。その後周囲間質組織との上皮-間葉の相互作用により誘導され、胎生13.5日(E13.5)に顎下腺の特徴的な構造であるブランピングを形成する。そこで我々は、胎生期の唾液腺の形成初期としてE11.5から、形成中期としてE13.5の顎下腺周囲の

間質細胞を採取し、これらの細胞をフィーダーとしてLCA (large-cell aggregate)-SFEBq法により分化誘導したiPS細胞を培養することにより唾液腺細胞の誘導をはかる。

3. 研究の方法

1) 唾液腺間質細胞の樹立

- (1) 妊娠11.5日あるいは13.5日のC57BL/6マウスをエーテル麻酔後、頸椎脱臼する。
- (2) 開腹し胎仔を子宮ごと取り出し、子宮に切開を加え胎仔を取り出す。
- (3) E11.5の胎仔は実態顕微鏡下で上顎と下顎の間で離断し舌を露出する。
- (4) 舌下部の舌下小丘を指標に顎下腺rudimentを摘出する。
- (5) 摘出した唾液腺をコラゲナーゼで消化後、PBS(-)で洗浄後、10%FCS含DMEMにて96穴の細胞培養用ディッシュに播種する。(8)
- (6) E13.5の胎仔は実態顕微鏡下で頸部を切断すると顎下腺が露出する。
- (7) 露出した顎下腺を摘出し、コラゲナーゼで消化後、PBS(-)で洗浄後、10%FCS含DMEMにて96穴の細胞培養用ディッシュに播種する。
- (8) コンフルエントになったらトリプシン/EDTAにより細胞をはがし、24穴の細胞培養用ディッシュに播種する。
- (9) さらにコンフルエントになったらトリプシン/EDTAにより細胞をはがし、3.5cmの細胞培養用ディッシュに播種する。
- (10) Fugene (Roche)を用いてSV40 Large T抗原発現プラスミド(pMK16)を遺伝子導入し細胞の不死化をはかる。
- (11) コンフルエントになったらトリプシン/EDTAにより細胞をはがし、トリパンプルー法により生細胞数を計測後、5 cells/mlに細胞数を調節する。
- (12) 細胞懸濁液を100μlずつ96穴ディッシュに播種し、limiting dilution法によりsingle cloneを獲得する。
- (13) E11.5およびE13.5それぞれについて5クローンを選択し、RT-PCRによりSV40 Large T抗原の発現を確認する。
- (14) 次に、間葉系マーカーとしてvimentin、上皮系マーカーとしてE-cadherin, cytokeratin 14の発現を確認する。
- (15) 得られたクローンの中でvimentin陽性、上皮系マーカー陰性の細胞を唾液腺間質細胞としてiPS細胞のフィーダーとして利用する。

2) マウスiPS細胞の分化誘導

- (1) SNL76/7細胞(ECACCより供与)をフィーダーとしてマウスiPS細胞(京都大学山中教授より供与)を未分化状態を維持したまま継代培養する。
- (2) ES細胞から3次的に下垂体組織が誘導可能なLCA-SFEBq法を応用して唾

液腺細胞誘導法の確立を試みた。

4. 研究成果

1) 胎仔唾液腺間質細胞の樹立

E11.5 のマウス間質細胞からは 2 つのクローンが樹立され、また、E13.5 のマウス間質細胞は 4 つのクローンが樹立された。得られたクローンそれぞれにおける遺伝子発現を RT-PCR で (図 1) 蛋白質発現をウェスタンブロットティングで解析した (図 2)。

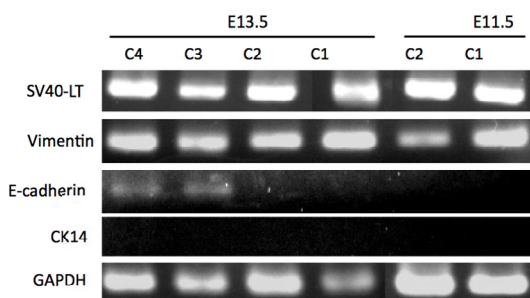
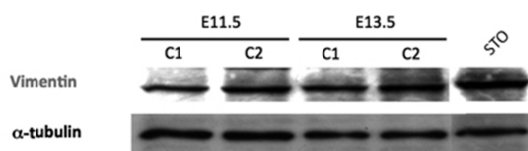


図 1. 樹立細胞における遺伝子発現



STO: mouse embryonic fibroblast cell line

図 2. ウェスタンブロットティングによる Vimentin 蛋白の検出

E11.5 の C1 と C2 は vimentin 遺伝子発現が認められたが、E-cadherin、CK14 遺伝子発現は認められなかった。また、E13.5 の C1 と C2 でも、同様に vimentin 遺伝子発現が認められたが、E-cadherin、CK14 遺伝子発現は認められなかった。一方、C3 と C4 では E-cadherin 遺伝子発現が認められ、部分的に上皮系への分化ないし上皮細胞の混入の可能性が示唆された。

これらの結果から、純粋な間質細胞として、E11.5 と E13.5 とともに C1 と C2 が iPS 細胞の分化誘導時のフィーダーとして使用された。

2) LCA (large-cell aggregate) -SFEBq 法を用いた iPS 細胞から唾液腺組織への分化誘導

発生段階の唾液腺を培養ディッシュ上で 3 次元的に再現することを目的に、前年度から用いている LCA (large cell-aggregate) -SFEBq

法の培養条件の詳細を検討した。具体的には、フィーダー細胞 (PH-STO) 上で培養することにより未分化状態を維持したマウスの iPS 細胞 (clone38C2) をトリプシン処理

により剥離後、ゼラチンコートディッシュで 2 日間培養することにより、フィーダー細胞を除去した。その後、iPS 細胞 (細胞数 10,000 個ないし 15,000 個) を 0.5nMBMP4 非添加ないし添加培地を用いて LCA-SFEBq 法により 6 日間培養を行い、作製された細胞凝集塊の最外層における外胚葉組織 (口腔粘膜上皮) 形成の有無について解析した。その結果、共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析により、凝集塊を作製する細胞数が 15,000 個、0.5nMBMP4 の存在下で、凝集塊の最外層に数層の上皮性マーカーであるカドヘリン陽性細胞の存在が観察され、本条件が外胚葉性組織の誘導に適していることが明らかとなった。次に、前年度までに作製した胎生期唾液腺周囲間質細胞 (E11.5 および E13.5) をフィーダーとして、前述した条件で作製した LCA を半割ないし最外層上皮のみを 8 日間培養した。その後、培養した細胞をトリプシンで分散化し、ゼラチン内で 3 次元培養を行った。培養 1 週後に唾液腺組織の分化マーカー発現を RT-PCR により確認した。その結果、LCA 半割ないし上皮の間で、発現程度に差は認められたものの、E13.5 のフィーダー上で培養した場合に、唾液腺特異的マーカー (Aqp5, M3AChR, 2-AdR) の発現上昇が認められた (図 3)。

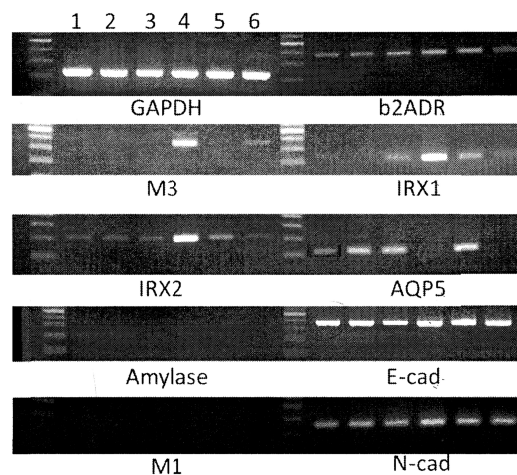


図 3. 分化マーカーの遺伝子発現

Lane1: SFEBq 半割+E11.5フィーダー
Lane2: SFEBq 上皮+E11.5フィーダー
Lane1: SFEBq 半割+E13フィーダー
Lane1: SFEBq 上皮+E13フィーダー
Lane1: SFEBq 半割+Gelatin
Lane1: SFEBq 上皮+Gelatin

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

Takahashi M, Suzawa T, Yamada A, Yamaguchi T, Mishima K, Osumi N, Maki K, Kamijo R. Identification of gene expression

profile of neural crest-derived cells isolated from submandibular glands of adult mic. BBRC 2014; 446:481-6.

Maruyama T, Miyamoto Y, Yamamoto G, Yamada A, Yoshimura K, Suzawa T, Takami M, Akiyama T, Hoshino M, Iwasa F, Ikumi N, Tachikawa T, Mishima K, Baba K, Kamijo R. Downregulation of carbonic anhydrase IX promotes Col10a1 expression in chondrocytes. PlosOne 2013; 8:e56984.

Yamamura Y, Yamada H, Sakurai T, Ide F, Inoue H, Muramatsu T, Mishima K, Hamada Y, Saito I. Treatment of salivary gland hypofunction by transplantation with dental pulp cells. Arch Oral Biol. 2013; 58: 935-42.

Hayashi S, Tanaka J, Okada S, Isobe T, Yamamoto G, Yasuhara R, Irie T, Akiyama C, Kohno Y, Tachikawa T, Mishima K. Lin28a is a putative factor in regulating cancer stem cell-like properties in side population cells of oral squamous cell carcinoma. Exp Cell Res 2013; 319: 1220-8.

〔学会発表〕(計1件)

田中準一、安原理佳、入江太郎、秋山知恵、河野葉子、美島健二 マウス唾液腺細胞におけるCD133陽性細胞の機能解(第13回日本再生医療学会総会 京都 2014年3月4日)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

齋藤 一郎(SAITO, Ichiro)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：60147634

井上 裕子(INOUE, Hiroko)

日本薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50367306

梁 洪淵(Ryo, Koufuchi)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：10298268

(3)連携研究者

なし