

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：34408

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659864

研究課題名(和文)唾液腺細胞の分化転換と再生に必要な転写因子の同定

研究課題名(英文)Transcription factors required for salivary gland regeneration

研究代表者

桧枝 洋記 (HIEDA, Yohki)

大阪歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：30243132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：マウス顎下腺を構成する複数の細胞タイプを分離し、それらの細胞タイプで発現している転写因子遺伝子を同定することを試みた。顎下腺構成細胞は2種類の細胞表面分子CD66aとCD117の発現パターンによって4種類の細胞タイプ、すなわち、腺房細胞CD66a(+)CD117(-)、介在部導管細胞CD66a(+)CD117(+)、一部の導管細胞CD66a(-)CD117(+)、他の導管細胞および筋上皮細胞CD66a(-)CD117(-)にFACS分離できることを明らかにした。これらの細胞で発現している転写因子の同定を試みたが、確定するには至っていない。

研究成果の概要(英文)：We tried to isolate several cell types of the mouse submandibular gland and to identify transcription factor genes expressed by the cell types. FACS analysis demonstrated the classification of salivary gland cells into four types, namely, CD66a(+)CD117(-) cells of acini, CD66a(+)CD117(+) intercalated duct cells, and CD66a(-)CD117(+) and CD66a(-)CD117(-) cells including ductal cells and myoepithelial cells. We have not yet identify transcription factors expressed in these FACS-isolated cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：唾液腺 転写因子 分化 再生

1. 研究開始当初の背景

器官再生のアプローチの1つは器官形成や細胞分化を制御している転写因子を用いて特定の細胞タイプへと分化誘導することである。申請者らは、特定の細胞タイプへの分化誘導に必要な転写因子は器官形成初期で発現する転写因子と成体器官で細胞タイプ特異的に発現する転写因子との組み合わせであるという仮説を立て、マウス顎下腺をモデルケースとして、この仮説を検証することを計画した。

顎下腺形成初期については、申請者らのこれまでの研究から、不完全ではあるが数十の転写因子の発現が上昇することを見いだしている。一方、成体顎下腺においては、数種類の転写因子の発現が報告されているのみであり、顎下腺を構成する主要な細胞タイプ(腺房細胞や導管細胞、筋上皮細胞など)で発現している転写因子の全体像の解明にはほど遠いのが現状である。そのような転写因子を同定するための有力な方法の1つは、成体顎下腺の主要な細胞タイプを分離することである。

本研究の計画当初は、顎下腺の主要な細胞タイプを分離するために、Sox9-EGFPマウスと細胞表面分子CD117を用いることを予定していた。しかし、研究の過程で、2種類の細胞表面分子CD66aとCD117がマウス顎下腺上皮組織において、部位特異的な発現パターンを示すデータが得られた。すなわち、これら2つの細胞表面分子を指標にすれば、Sox9-EGFPマウスのような遺伝子改変マウスを使わずに、野生型マウスを用いて顎下腺の主要な細胞タイプを分離できる可能性が示唆された。このことは、本研究成果を将来的にヒトへ応用する上できわめて重要である。そこで、本研究では、2つの細胞表面分子CD66aとCD117を指標に用いて、野生型マウス顎下腺から各細胞タイプを分離することとした。

2. 研究の目的

(1) 我々はこれまでに、2つの細胞表面分子CD66aとCD117の遺伝子発現が顎下腺形成過程で増加すること、そして、これらの遺伝子産物が上皮組織特異的に発現することを見いだしている。本研究では、成体マウス顎下腺におけるCD66aおよびCD117の発現部位を免疫染色によって解析する。

(2) CD66aとCD117を指標にしたFACS(Fluorescence activated cell sorting)解析によって、顎下腺の構成細胞タイプを分離する。

(3) FACS分離した各細胞タイプでの遺伝子発現をマイクロアレイによって解析し、転写因子を同定する。

(4) 胎児期で発現する転写因子のうち形態形成に関わっている転写因子を、器官培養系

を用いたsiRNA実験によって同定する。
(5) 上記(3)と(4)で同定した転写因子を繊維芽細胞に発現させて、唾液腺細胞に分化するかどうかを解析する。

3. 研究の方法

(1) 顎下腺の摘出

顎下腺は成体および胎児マウス(ddY系統)から摘出した。動物実験は大阪歯科大学動物実験委員会の承認を得た上で行った。

(2) 免疫染色

摘出した顎下腺はOCCTコンパウンドに包埋し、液体窒素で凍結して、厚さ6μmの凍結切片を作成した。また、FACS分離した細胞はサイトスピンにてスライドガラスに貼付けた。これらの試料を風乾したのち、4%パラホルムアルデヒド/PBSで10分(室温)あるいはメタノールで10分(-20℃)固定した。1%牛血清アルブミン(BSA)/PBSで30分処理後、1次抗体(抗CD66a抗体、抗CD117抗体、抗AQP5抗体、抗CLDN4抗体、抗CK5抗体、抗αSMA抗体)で1時間反応させた。PBSで洗浄した後、蛍光色素(AlexaFluor488あるいはAlexaFluor555)で標識した2次抗体で1時間反応させた。DNA染色色素(DAPI)と蛍光退色防止剤を含んだ封入剤で封入したのち、共焦点レーザー顕微鏡(ツァイスLSM700)あるいは蛍光顕微鏡(オリンパスBX51)で観察および撮影した。画像処理はImageJ(アメリカNIH)およびフォトショップ(Adobe社)を用いて行った。

(3) 単一上皮細胞の調製

摘出した顎下腺を生理食塩水中でピンセットを用いて細切した後、コラゲナーゼ/ヒアルロニダーゼで処理した(1時間、室温)(図1)。緩く遠心した後、間質細胞を含む上澄みを捨て、沈殿を再懸濁して、緩い遠心によって上皮組織片を得た(図2)。上皮組織片をトリプシンで処理し(20分、4℃)さらにディスパーゼ/DNaseを含む液中でピペティングした。得られた細胞懸濁液を注射針(20Gと23G)およびセルストレーナーに通して、単一上皮細胞を得た。

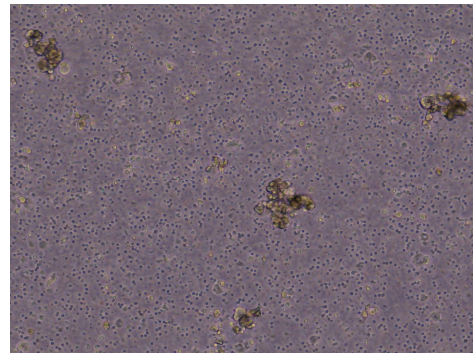


図1

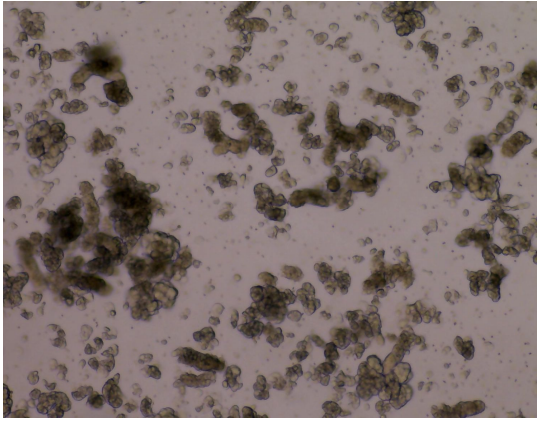


図 2

(4) FACS解析

成体顎下腺から調製した単一上皮細胞懸濁液に抗CD16/32抗体（Fcリセプターブロッカー）および血球・間質細胞マーカー（ビオチン標識抗CD31抗体（ラットIgG2a）、ビオチン標識抗CD45抗体（ラットIgG2b）、ビオチン標識抗TER119抗体（ラットIgG2b）、ビオチン標識抗CD140a抗体（ラットIgG2a））を加えて反応させた（30分、4℃）。洗浄後、BV421標識ストレプトアビジン、PE標識抗CD66a抗体（マウスIgG）、APC標識抗CD117抗体（ラットIgG2b）を反応させた（30分、4℃）。洗浄後、7-AADを含む液に懸濁した。ネガティブコントロールとしてビオチン標識ラットIgG2a、ビオチン標識ラットIgG2b、BV421標識ストレプトアビジンを反応させた。また、単染色コントロールとしてPE標識マウスIgGおよびAPC標識ラットIgG2bを用いた。染色した細胞をFACS装置（BD FACSAria）で解析した。ネガティブコントロールおよび単染色コントロールを用いて蛍光補正を行った後、単一細胞集団を得て、死細胞集団（7-AAD陽性）を除去し、さらに、血球・間質細胞マーカー陽性集団を除去して、上皮細胞集団を得た。この上皮細胞集団を用いてCD66aとCD117の染色強度を解析した。

(5) 顎下腺器官培養

胎仔マウス（胎齢12日～13日）から顎下腺原基を摘出した。フィルター下部に培養液をハンギングドロップ状態で置き、上部に顎下腺原基を置いて液相/気相界面で培養した。siRNA（Dharmacon）を培養液に加えた。

(6) 細胞から全RNAを抽出し、蛍光標識したプローブをDNAマイクロアレイにハイブリダイズさせた。読み取ったシグナル値を正規化およびバックグラウンド補正し、解析に用いた。

4. 研究成果

(1) CD66aの発現を成体顎下腺の凍結組織切片を用いて免疫染色によって解析した。CD66aは形態形成初期の唾液腺ではほとんどすべての上皮細胞で発現していた。成体では一部の細胞に限定して発現していた。腺房細胞マーカーAQP5、導管管腔細胞マーカーCLDN4、基底/筋上皮細胞マーカーCK5、筋上皮細胞マーカーαSMAとの二重染色解析により、CD66aはほとんどすべての腺房細胞と介在部導管細胞および一部の線状部/排出部導管細胞で発現しており、一方、導管の基底細胞や筋上皮細胞での発現は認められないことが明らかになった（図3）。CD66aのこのような発現パターンは単一上皮細胞懸濁液を用いた免疫染色によっても確認された（図4）。

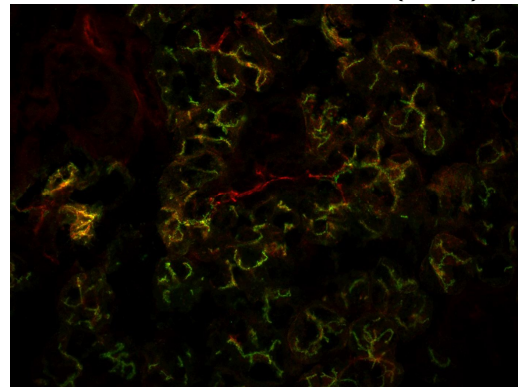


図 3

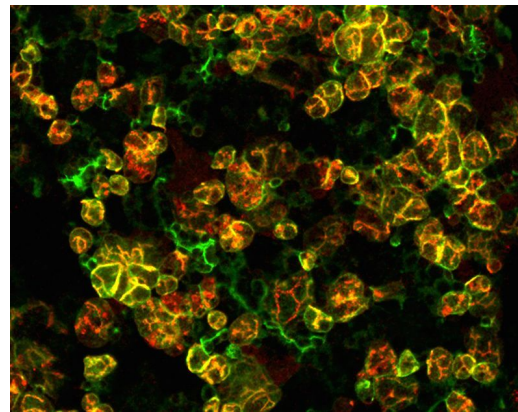


図 4

(2) CD117についての同様の方法で解析した。CD117は形態形成初期の唾液腺ではほとんどすべての上皮細胞で発現していたが、発生が進むに釣れて発現部位が限局されるようになり、成体では介在部導管細胞と一部の導管管腔細胞のみで発現していた（図5）。このような発現パターンは単一上皮細胞懸濁液を用いた染色によっても確認された（図6）。

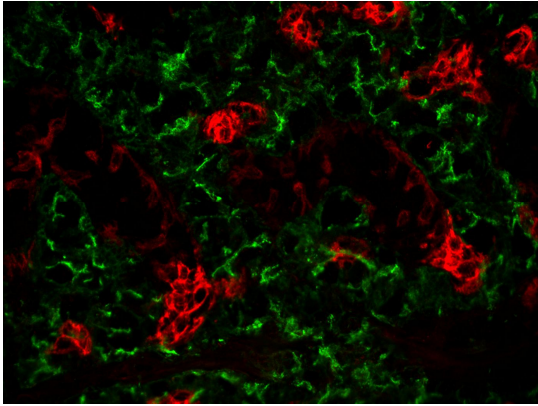


図 5

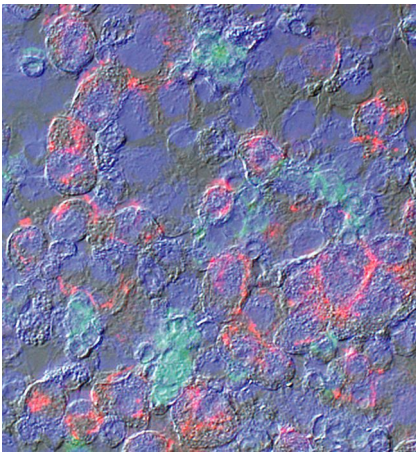


図 6

(3) 成体顎下腺の凍結組織切片に対して CD66a と CD117 の二重染色を行ったところ、これらの発現パターンの組合せによって、顎下腺上皮細胞は4つのグループに区別できることが明らかになった。すなわち、CD66a (+) CD117 (-) の腺房細胞、CD66a (+) CD117 (+) の介在部導管細胞、CD66a (-) CD117 (+) の導管細胞、CD66a (-) CD117 (-) の導管および筋上皮細胞に分類できた。これは単一上皮細胞を用いた解析によっても確認された (図 7)

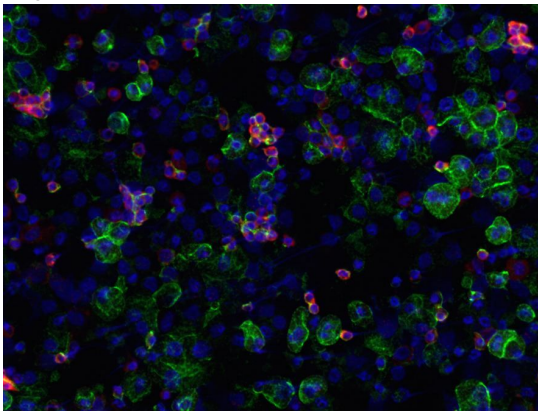


図 7

(4) 以上の結果をもとに、成体顎下腺の上

皮細胞を CD66a と CD117 の発現を指標にして FACS 分離することを試みた。免疫染色の結果から予想されるように、CD66a (+) CD117 (-) 細胞、CD66a (+) CD117 (+) 細胞、CD66a (-) CD117 (+) 細胞、CD66a (-) CD117 (-) 細胞に分離することができた (図 8)

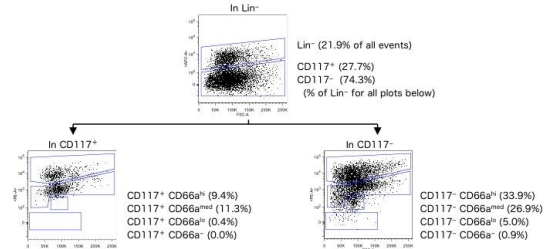


図 8

(5) FACS 分離した4種類の細胞タイプで発現している遺伝子をマイクロアレイで解析した。予備的な結果は、CD66a (+) CD117 (-) 細胞が腺房由来であること、CD66a (+) CD117 (+) 細胞の介在部導管由来であること、CD66a (-) CD117 (+) と CD66a (-) CD117 (-) がおもに線状部 / 排出部導管細胞由来であることを示唆していた。しかし、FACS 装置の故障や人員不足などのために、マイクロアレイ解析に必要な細胞数を複数回得ることができず、各細胞タイプの発現遺伝子および転写因子を同定するには至っていない。

(6) 形態形成初期の顎下腺においては、約46種類の転写因子遺伝子の発現が上昇する。それらのうち19種類について、その発現阻害実験を、顎下腺の器官培養系と siRNA を用いて行った。その結果、約半数の転写因子が顎下腺の成長や分枝形態形成に必要であることがわかった (図 9)。再現性を確認する必要があるが、これらの転写因子は唾液腺の分化や再生に必要な可能性が示唆された。

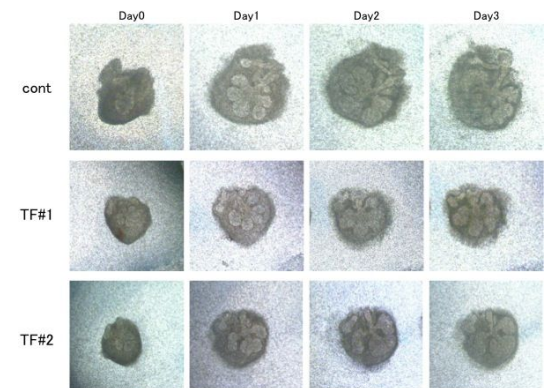


図 9

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)

1. Mima J, Koshino A, Oka K, Uchida H, Hieda Y, Nohara K, Kogo M, Chai Y, Sakai T. 2013. Regulation of the epithelial adhesion molecule CEACAM1 is important for palate formation. *PLoSOne* **8**:e61653. (査読有)
2. Hieda Y, Hashimoto Y, Kawai S. 2013. Identification of genes encoding apical membrane proteins up-regulated during lumen formation and of prominin-1 as a maker of the initial luminal cell surfaces in the developing mouse submandibular gland. *Journal of Osaka Dental University* **47**:249-255. (査読有)
3. Hieda Y. 2013. Claudins participate in lumen expansion by regulation of apical membrane biogenesis in the submandibular gland. *Journal of Osaka Dental University* **47**:241-247. (査読有)
4. Hieda Y. 2013. Assembly of tight junction molecules in the developing mouse submandibular gland. *Journal of Osaka Dental University* **47**:233-240. (査読有)

〔学会発表〕(計 1件)

1. 竹山旭, 吉川美弘, 森田章介, 池尾隆, 檜枝洋記 .CD117とCD66aは唾液腺構成細胞を分離するための有用なマーカーである .第67回日本口腔科学会学術集会 . 2013年5月23日 . 栃木県総合文化センター . 宇都宮 .

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

桧枝 洋記 (HIEDA, Yohki)
大阪歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：30243132

(2)研究分担者

阪井 丘芳 (SAKAI, Takayoshi)
大阪大学・歯学研究科・教授
研究者番号：90379082

美島 健二 (MISHIMA, Kenji)
昭和大学・歯学部・教授
研究者番号：50275343

斎藤 一郎 (SAITO, Ichiro)
鶴見大学・歯学部・教授