

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670845

研究課題名(和文) 転写因子群導入による脂肪由来間葉系幹細胞の唾液腺分化誘導法の開発

研究課題名(英文) Development of induction method using adipose-derived mesenchymal stem cells by transcription factor group for salivary gland differentiation

研究代表者

鵜澤 一弘 (UZAWA, KATSUHIRO)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30302558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：唾液腺の機能回復を狙った様々な研究が盛んに行われているが、治療法にまで到達できていないのが現状である。我々は唾液腺機能回復のため、脂肪幹細胞にGibberellic acidを使用した細胞でマイクロアレイ解析を行い、発現亢進を認めた6つの転写因子を同定した。ヒト胎児線維芽細胞に6因子導入し分化培地で培養したところアミラーゼの発現とF-actinに変化を認めたため、本結果は今後の唾液腺の機能回復治療にとって非常に有益なデータと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Various studies aimed for functional recovery of salivary glands have been performed, but is not able to establish the specific treatment. For salivary gland functional recovery, we performed microarray analysis of adipose derived stem cells after treatment with gibberellic acid, and identified six up-regulated genes, transcriptional factors. We transfected six genes into the human fetal fibroblast and cultured in the differentiation medium for salivary glands. Consequently, we found the amylase expression and changing in F-actin fibers. Therefore, we suggested that our data might be fruitful to establish the induction method for salivary gland differentiation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：唾液腺萎縮 direct reprogramming 唾液腺再生

1. 研究開始当初の背景

唾液腺萎縮による唾液分泌量の低下は様々な障害の原因となり、唾液分泌量は患者のQOLを左右する重要な因子の一つとされている。また、唾液の主要成分であるアミラーゼによる口腔内消化は、腸管での消化や血糖値の調節において重要な役割を持っている(Sakurai et al., JDI, 2012)。唾液腺の機能回復を狙った様々な研究が盛んに行われているが、治療法にまで到達できていないのが現状である。近年、唾液腺が発生する過程で様々な転写因子が機能していることが徐々に解明されてきた。それら転写因子のノックアウトモデルでは唾液腺形成不全が見られるため、我々は外因性に遺伝子発現を調節することで、困難とされている唾液腺再生療法の糸口になると考えた。

2. 研究の目的

申請者らは唾液腺発生過程に関与する5つの転写因子を候補として選定している。ASCsの作成過程は、iPS細胞のように遺伝子導入操作がなく培養可能で、さらにES細胞研究のような倫理面での問題も少ないという特徴を持ち合わせているため、本研究は臨床応用に最も近い再生医療としての開発手段と考えた。

3. 研究の方法

(1) 類脂肪体由来ASCsの採取・培養・分化  
上顎癌など口腔外科手術を施行する患者で、類脂肪体が露出する症例から術中に類脂肪体を採取する。その後、遠心法を用いてASCsを分離、培養を行い5継代し安定したASCsを実験に用いた。さらに、我々が既に関発し発表した方法により、ASCs細胞から唾液分泌細胞を分化させる。この際、Gibberellic acidの併用をした細胞と併用しなかった細胞を採取する。

(2) 分化前ASCs細胞と分化後唾液分泌細胞における遺伝子発現状態のmicro array解析

分化前ASCs細胞と上記2種類の分化後唾液産生細胞における遺伝子発現状態を比較して、唾液産生細胞に特有な遺伝子発現パターンを明らかにする。

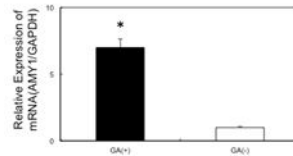
(3) 唾液腺分化に必要な転写因子の同定と転写因子導入による分化誘導実験

6種類の転写因子を搭載したレンチウイルスベクターの構築し、ヒト胎児線維芽細胞への遺伝子導入。唾液腺マーカーの発現量の確認。細胞形態的变化を評価する。(蛍光顕微鏡を用いて細胞骨格を含めた組織学的変化を観察・評価する。)

4. 研究成果

(1) 類脂肪体由来ASCsの採取・培養・分化  
上顎歯肉癌など類脂肪体が露出する症例

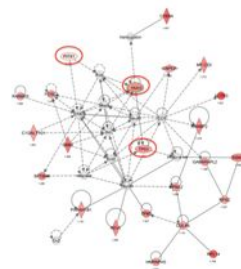
から術中に類脂肪体を採取し、遠心法を用いてASCsを分離、培養を行い5継代し安定したASCsを分離した。さらに、我々が既に関発し発表した方法により、ASCs細胞から唾液分泌細胞を分化させた。この際、Gibberellic acidの併用をした細胞と併用しなかった細胞を採取し、その細胞のアミラーゼの発現をRT-PCRにて確認したところ(図1) Gibberellic acidの併用をした細胞の方がアミラーゼの発現が有意に高かった。



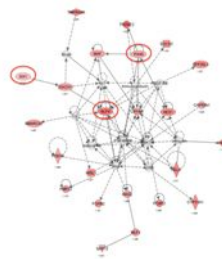
(図1 アミラーゼの発現確認)

(2) 分化前ASCs細胞と分化後唾液分泌細胞におけるmicro array解析

Gibberellic acidを併用した細胞と併用しなかった細胞のtotal RNAを採取しAffymetrix®社製GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Arrayにて発現解析を行った。その結果をトミーデジタルバイオロジー社のインジェニイティーパスウェイアナリシス(IPA)を用い解析した。その結果、図2、3に示すようにmorphology, developmentのpathwayにおいてGibberellic acidの併用をした細胞で発現が2倍以上の亢進を認めた15遺伝子の中から6つの転写因子(PITX1, TP63, SNAI2, PAX6, SIX1, KLF4)を選定した。



(図2 morphology)

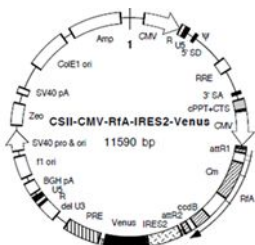


(図3 development)

(3) 転写因子導入による分化誘導実験

図4に示すレンチウイルスベクターを理化学研究所バイオリソースセンターより購入し使用した。6つの転写因子(PITX1, TP63, SNAI2, PAX6, SIX1, KLF4)をそれぞれ搭載したレンチウイルスベクターを invitorgen の

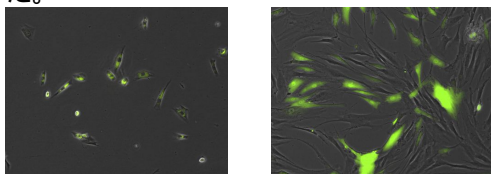
Gateway システムを用いて作成した。



(図4 レンチウイルスベクター)

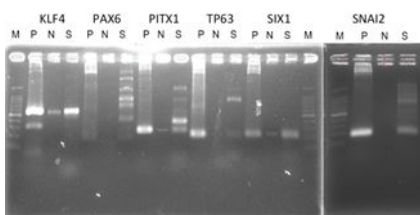
6つの転写因子(PITX1, TP63, SNAI2, PAX6, SIX1, KLF4)、コントロールとしてコントロール配列(Random)をそれぞれ搭載したレンチウイルスベクターをヒト胎児線維芽細胞に導入した。感染後のセレクションマーカーとして Venus (EYFP の Variant) を使用し Flow cytometry を使用し Venus 陽性細胞のセレクションを行った。

図6、7に示すように転写因子導入群、コントロール群においてvenus陽性細胞を確認した。



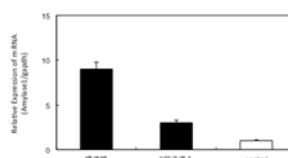
(図6 6因子導入群) (図7 Control群)

さらに転写因子導入群をPCRにて確認したところ6因子全てにおいて導入が確認された(図8)。



(図8 転写因子導入群のPCR)  
(P:Positive control、N:Negative control、S:Sample、M:Marker)

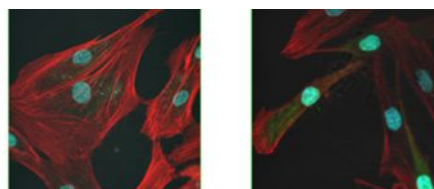
6因子導入が確認されたヒト線維芽細胞をDMEM/F12に下記の試薬を添加した (GlutaMAX、10% of Xeno-free KnockOut Serum Replacement、1% non-essential amino acids、0.1 mM 2-mercaptoethanol、1%penicillin/streptomycin、10 ng/mL heregulin-1b、10 ng/mL activin A)mediumを3週間使用し分化誘導を行った。3週後 total RNA 抽出し PCR にて Amylase の発現量を確認したところ図9に示すように、6因子導入し分化誘導した細胞において control と比較し約3倍の発現亢進を認めた。



(図9 アミラーゼの発現確認)

さらに分化誘導を行った細胞の形態的变化を評価するために細胞骨格因子である F-actin を使用し免疫蛍光細胞染色を行った。図10、11に示すように control と比較すると6因子導入した細胞においてF-actinが多くみとめられ、細胞骨格においても差を認めた。

F-actin の走行



(図10 6因子導入群) (図11 Control群)

[まとめ]

Gibberellic acid の併用をした ASCs 細胞と併用しなかった ASCs 細胞を用いて網羅的遺伝子発現解析および IPA により、唾液腺分化における候補転写因子を6遺伝子選出し、ヒト線維芽細胞に導入し、遺伝子強制発現実験を行った。6遺伝子を強制発現させ分化誘導培地にて培養した細胞は細胞骨格に変化を認め、さらに唾液腺のマーカーである、アミラーゼの発現が亢進した。以上の結果より今後の新しい唾液分泌障害に対する治療法として大いに期待できる。さらに実験を進めればさらなる唾液腺再生療法の糸口になると考える。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：  
出願年月日：  
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

鷓澤 一弘 (UZAWA KATSUHIRO)  
千葉大学・大学院医学研究院・准教授  
研究者番号：30302558

##### (2) 研究分担者

丹沢 秀樹 (TANZAWA HIDEKI)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：50236775

笠松 厚志 (KASAMATSU ATSUSHI)  
千葉大学・医学部付属病院・助教  
研究者番号：60375730

##### (3) 連携研究者

( )  
研究者番号：