

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32622

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21688

研究課題名（和文）唾液分泌障害における唾液腺幹細胞の機能制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Regulation of stem cell functions in 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） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：若齢マウス（12週齢）と老齢マウス（94週齢）顎下腺を、それぞれシングルセル解析技術（scRNA seq）を用いて解析した。取得したデータをUMAPにより二次元展開して作製されたプロットは、遺伝子発現の類似性から13クラスターに分類された。次に、既知のマーカー遺伝子の発現に基づきクラスターのアノテーションが行われた。その結果、老齢マウス顎下腺では、若齢マウス顎下腺と比較して腺房細胞の割合が著しく減少していた。一方、間質細胞の割合が増加していることが明らかとなった。さらに、幹細胞老化に関連するFoxo3遺伝子の発現低下が老齢マウス顎下腺において確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唾液腺の老化による唾液分泌障害は、服薬などの要因と相まって重篤な唾液分泌障害をもたらす原因の1つと考えられている。しかしながら、老化に伴う唾液腺細胞の消失とその供給源である唾液腺幹細胞の動態に関する詳細な解析はなされていない。当該研究では、単一細胞レベルで遺伝子発現を網羅的に解析可能なシングルセル解析技術（scRNA seq）を用いて、老化における唾液腺幹細胞の機能制御因子を同定する。加えて、同定された遺伝子を改変した多能性幹細胞（ES細胞）より誘導した唾液腺オルガノイドを解析することにより老化関連遺伝子の機能を明らかにし、幹細胞老化制御分子を標的とした創薬の基盤研究として応用する。

研究成果の概要（英文）：Gene expressions of submandibular glands in young (12-week-old) and aged mice (94-week-old) were compared using scRNAseq analysis. Clustering analysis of scRNAseq results in 13 clusters, shown in UMAPs. Clusters were annotated based on the expression of known marker genes. The ratio of Acinar cells decreased in the submandibular glands of aged mice compared to young mice. In contrast, mesenchymal cells increased in the submandibular glands of aged mice compared to young mice. The gene expression of Foxo3, which is related to stem cell aging, decreased.

研究分野：口腔病理学

キーワード：唾液腺 老化 シングルセル解析

1. 研究開始当初の背景

高齢者にみられる口腔乾燥症の多くは、薬剤の服用などに起因するものに唾液腺自身の老化による器質的変化を伴った複合的な病態と考えられる。これまで研究代表者は、口腔病理医として診断目的で採取された小唾液腺の一つである口唇腺の生検標本を数多く観察してきた。その中で、高齢者の唾液腺に顕著な腺房細胞の萎縮が認められることを経験してきた。以前より、臓器・組織の老化が、新たな細胞の供給源として機能する幹細胞の機能不全によるもの（幹細胞老化）との報告がなされ、唾液腺においても幹細胞老化を介した唾液腺萎縮のメカニズムが想定される。実際、研究代表者らは、CD133 をマーカーとして老齢マウス顎下腺における唾液腺幹細胞を単離し、幹細胞老化の可能性について解析してきた。その結果、老齢マウスは若齢マウスと比較して、唾液腺幹細胞の数が減少しているのみならず、機能が減少している可能性が明らかとなってきた¹⁾。一方、唾液腺実質組織の恒常性維持には、個別に分化した唾液腺実質細胞（腺房細胞、導管細胞および筋上皮細胞）が分裂能を保持し、新たな細胞の供給源として関与しているとの報告もなされている。

2. 研究の目的

これまで、行われてきた網羅的遺伝子解析は、臓器・組織を一塊とした bulk 解析が主体であり、個々の細胞レベルでの解析はなされてこなかった。本研究では、シングルセル解析技術（scRNAseq）を応用することにより、若齢マウス唾液腺（12 週齢）と老齢マウス唾液腺（94 週齢）の遺伝子発現を細胞レベルで解析する。この結果をもとに細胞を亜集団に分類し、幹細胞分画などの亜集団それぞれにおける老化による遺伝子発現の変化を個別に特定する。

3. 研究の方法

(1) 細胞の分散化

12 週齢および 94 週齢の C57BL/6 マウス雌より顎下腺をそれぞれ採取し、メスにて 2mm 角に分断化した。分断化した組織片をコラゲナーゼ Type I (750 U/ml) とヒアルロニダーゼ (500 U/ml) 存在下で 37、30 分間振盪処理した。次に、TrypLE にて 37、10 分間振盪処理した後、Dispase I により細胞を分散化した。さらに、分散化した細胞をセルストレイナー (40 μ m) により濾過し、未消化の組織片や細胞の凝集塊を除去した。

(2) 唾液腺上皮細胞の単離

上記の細胞懸濁液 (1 \times 10⁶ cells/mL) に APC 標式抗 EpCAM 抗体 (BioLegend) を 500 倍希釈で加え染色した。フローサイトメトリーにより EpCAM 陽性分画を上皮細胞集団として採取した。

(3) 遺伝子発現ライブラリーの作成およびシークエンス解析

10X Genomics Chromium Single Cell 3' Library & Gel Bead Kit v2 システムを使用して、個別の細胞に対してゲルビーズエマルジョンを作製し cDNA の合成、精製、増幅を行った。次に、増幅されたライブラリーを Illumina NextSeq 500 を用いてシークエンス解析した。

(4) データ解析

シークエンス解析により得られたデータを Cell Ranger (10XGenomics) で処理後 Seurat により解析した。すなわち、UMAP により細胞をクラスターに分類し、既知のマーカー遺伝子として、幹細胞マーカー (胎生期); CK5, c-Kit, 筋上皮マーカー; Acta2, Myh11 基底細胞マーカー; Krt5, 14, 導管細胞マーカー; Krt7, 8, 18, 腺房細胞マーカー; Aqp5, Mist1 の発現を指標に個別のクラスターを構成する細胞集団の種類を決定した。さらに、violin plot により個別のクラスターにおける特異的遺伝子発現量が詳細に比較検討された。

4. 研究成果

マウス顎下腺の scRNAseq 結果

(1) UMAP プロット

マウスの顎下腺細胞から scRNAseq ライブラリーを作製し、そのシークエンス解析結果を Cell Ranger (10XGenomics) を用いて出力した。出力したデータを R パッケージ Seurat により解析した。その結果、12 週齢マウス顎下腺と 94 週齢マウス顎下腺ととも 13 クラスターに細胞集団を分けることができた (図 1)。

(2) 各クラスターの細胞種別決定

既知のマーカー遺伝子の発現より各クラスターを構成する細胞の種類を決定した (図 2)。

(3) 老齢マウスと若齢マウス顎下腺における細胞種の割合を比較

各クラスターの細胞数により、それぞれを構成する細胞の割合を算定した (表 1) その結果、94 週齢マウス顎下腺では、12 週齢マウス顎下腺に比べて間質細胞の割合が増加している事が明らかとなり、また、逆に腺房細胞の割合が減少していることが明らかとなった。

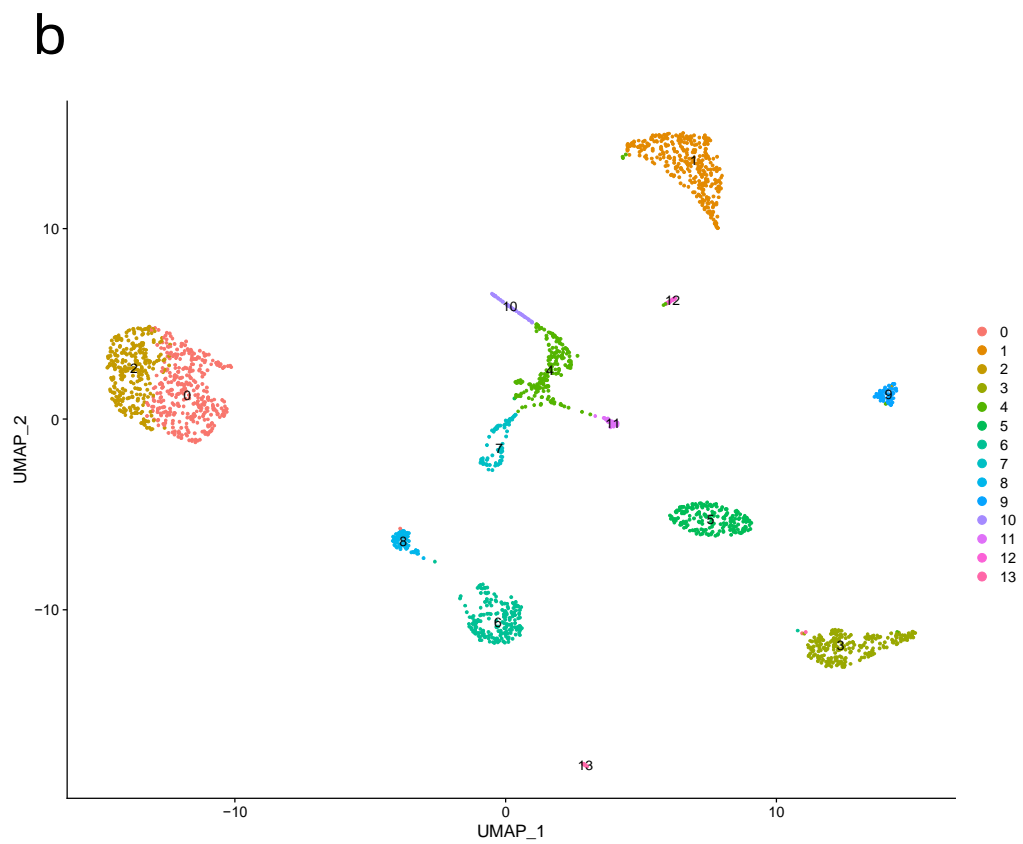
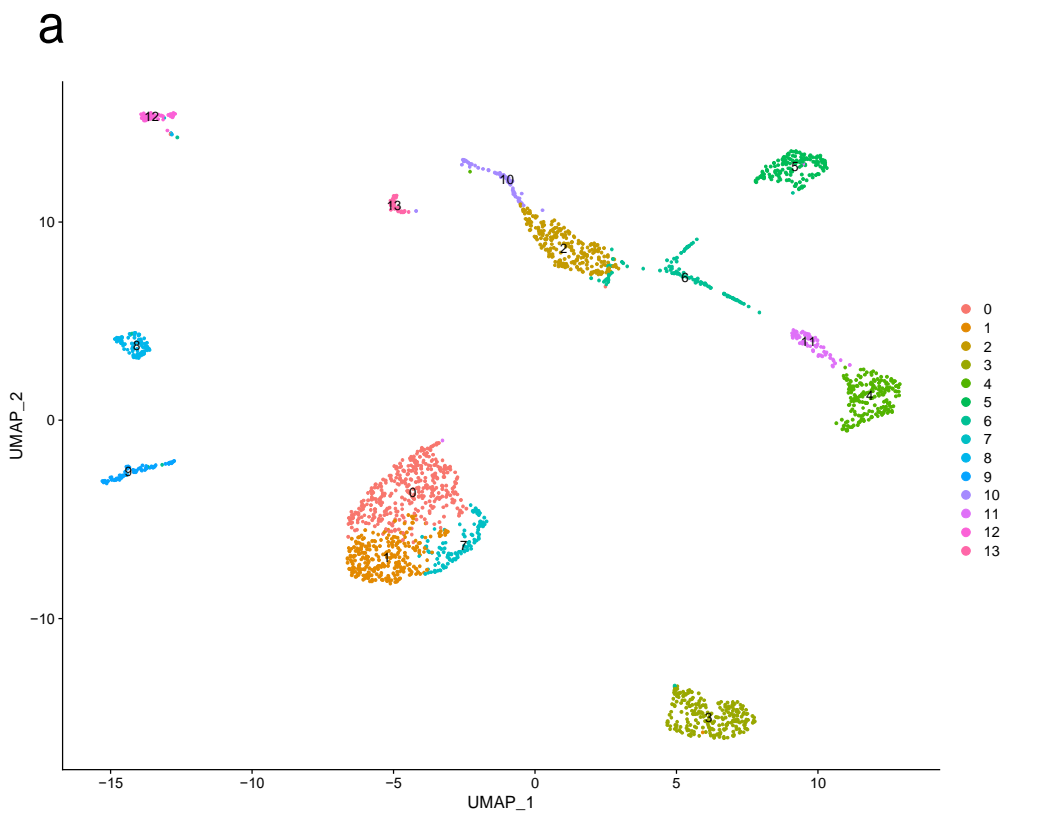


図1 マウス顎下腺細胞のUMAPプロット
 (a) 12週齢マウス顎下腺、(b) 94週齢マウス顎下腺

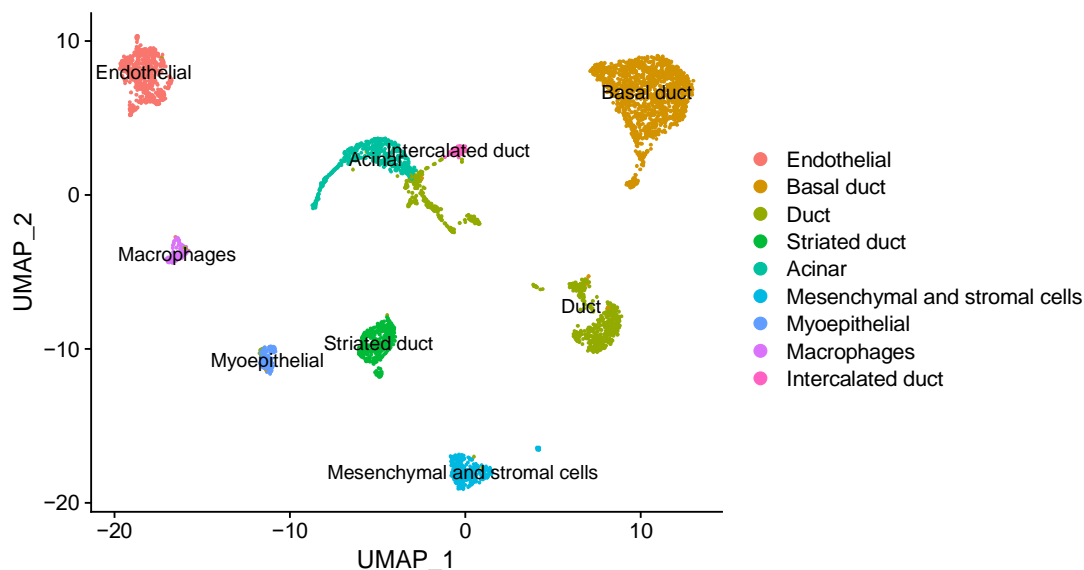


図2 マーカー遺伝子の発現パターンによる各クラスターのアノテーション

表1 細胞腫別の割合

	Young	%	Aged	%
Acinar cells	296	14.0	171	8.0
Basal duct cells	772	36.5	697	32.7
Ductal cells	391	18.5	356	16.7
Endothelial cells	243	11.5	340	16.0
Intercalated Duct Cells	42	2.0	35	1.6
Macrophage	80	3.8	20	0.9
Mesenchymal cell	54	2.6	253	11.9
Myoepithelial cell	79	3.7	59	2.8
Striated duct	159	7.5	199	9.3
Total	2116	100.0	2130	100.0

(4) 老化・増殖マーカー遺伝子の発現変化

老化マーカー遺伝子である *p16* 遺伝子の発現は、94 週齢マウス顎下腺の導管細胞と基底細胞クラスターにおいて増加していた。一方、増殖マーカー遺伝子である *Ki-67* 遺伝子の発現低下が、導管細胞、腺房細胞および筋上皮細胞のクラスターで顕著に確認された。

(5) 唾液腺幹細胞老化関連遺伝子の発現変化

これまで我々は、唾液腺幹細胞老化に関連する因子として *Foxo3* 遺伝子の関与を報告してきた。今回のシングルセル解析においても、介在部導管細胞において *Foxo3* 遺伝子発現の低下が確認された。

(6) まとめ

今回の若齢マウスおよび老齢マウス顎下腺の scRNAseq 解析結果により、老齢マウス顎下腺において間質細胞の割合が増加する一方で、腺房細胞の割合が減少していることが明らかとなった。また、老齢マウス唾液腺においては、老化マーカーである *p16* 遺伝子発現細胞の増加が確認された。加えて、幹細胞老化に関連する *Foxo3* 遺伝子の発現低下が確認された。

現在、遺伝子改変唾液腺オルガノイドを用いて *Foxo3* 遺伝子の機能解析を進めている。

<引用文献>

1) Takamatsu K, Tanaka J, Katada R, Azuma K, Takakura I, Aota K, Kamatani T, Shirota T, Inoue S, Mishima K. Aging-associated stem/progenitor cell dysfunction in the salivary glands of mice. *Exp Cell Res.* 2021; 409 (1): 112889.
“ 10.1016/j.yexcr.2021.112889

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Katada Ryogo, Tanaka Junichi, Takamatsu Koki, Hata Kenji, Yasuhara Rika, Ohnuma Shintaro, Takakura Ikuko, Nishimura Riko, Shirota Tatsuo, Mishima Kenji	4. 巻 586
2. 論文標題 Induction of salivary gland-like cells from epithelial tissues transdifferentiated from mouse embryonic fibroblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 55～62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.11.064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takamatsu Koki, Tanaka Junichi, Katada Ryogo, Azuma Kotaro, Takakura Ikuko, Aota Keiko, Kamatani Takaaki, Shirota Tatsuo, Inoue Satoshi, Mishima Kenji	4. 巻 409
2. 論文標題 Aging-associated stem/progenitor cell dysfunction in the salivary glands of mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 112889～112889
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yexcr.2021.112889	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka Junichi, Mishima Kenji	4. 巻 57
2. 論文標題 Application of regenerative medicine to salivary gland hypofunction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Dental Science Review	6. 最初と最後の頁 54～59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdsr.2021.03.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka Junichi, Takamatsu Koki, Yukimori Akane, Kujiraoka Satoko, Ishida Shoko, Takakura Ikuko, Yasuhara Rika, Mishima Kenji	4. 巻 63
2. 論文標題 Sox9 function in salivary gland development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 8～13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2021.01.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Keisuke, Tanaka Junichi, Aizawa Ryo, Kato-Tanaka Mayu, Ueno Hiroo, Mishima Kenji, Yamamoto Matsuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Structure of junctional epithelium is maintained by cell populations supplied from multiple stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 ページの記載なし
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-98398-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Goto Yuriko, Ibi Miho, Sato Hirota, Tanaka Junichi, Yasuhara Rika, Aota Keiko, Azuma Masayuki, Fukada Toshiyuki, Mishima Kenji, Iri? Tarou	4. 巻 62
2. 論文標題 PLAG1 enhances the stemness profiles of acinar cells in normal human salivary glands in a cell type-specific manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 99 ~ 106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2020.01.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawashima Akihiro, Yasuhara Rika, Akino Ryosuke, Mishima Kenji, Nasu Michiko, Sekizawa Akihiko	4. 巻 6
2. 論文標題 Engraftment potential of maternal adipose-derived stem cells for fetal transplantation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e03409 ~ e03409
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2020.e03409	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Junichi, Mishima Kenji	4. 巻 70
2. 論文標題 In vitro three dimensional culture systems of salivary glands	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 493 ~ 501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12947	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Junichi, Takamatsu Koki, Yukimori Akane, Kujiraoka Satoko, Ishida Shoko, Takakura Ikuko, Yasuhara Rika, Mishima Kenji	4. 巻 63
2. 論文標題 Sox9 function in salivary gland development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 8~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2021.01.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 美島健二
2. 発表標題 3次元的唾液腺組織の作出とその応用
3. 学会等名 第62回 歯科基礎医学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 美島健二
2. 発表標題 マウスES細胞誘導による唾液腺原基オルガノイド形成と再生医療に向けた基礎研究
3. 学会等名 第109回 日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 美島健二
2. 発表標題 唾液腺再生
3. 学会等名 第74回 日本口腔科学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

昭和大学歯学部 口腔病態診断科学講座 口腔病理学部門 ホームページ
http://www10.showa-u.ac.jp/~oralpath/index.html

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
研究分担者	田中 準一 (Tanaka Junichi) (40710166)	昭和大学・歯学部・講師 (32622)	
研究分担者	行森 茜 (Yukimori Akane) (60813748)	昭和大学・歯学部・助教 (32622)	

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