

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：32622

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15678

研究課題名(和文)唾液腺老化における幹細胞の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of stem cell in salivary gland aging

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) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：当該研究では、唾液腺の老化である実質細胞の萎縮・消失の原因として、幹細胞システムの破綻(幹細胞老化)の関与に関して検討した。すなわち、唾液腺幹細胞の表面マーカーとしてCD133を用いて、6週齢(若齢)と80から90週齢(老齢)マウス、それぞれから幹細胞を単離しその性状を解析した。その結果、老齢マウスでは、CD133陽性細胞の割合が2.1%と若齢マウスの4.1%と比べて減少し、さらに、salisphere形成能についても低下が認められた。このことから、老齢マウスの唾液腺では幹細胞数のみならず機能の低下もみられることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Dry mouth is one of causes to promote various diseases including dental caries, eating and swallowing disorders, and aspiration pneumonia, which, in severe cases, results in remarkable decrease of quality of life (QOL). Dry mouth is known to be caused by Sjogren's syndrome, irradiation, medication, and ageing. The aim of this research is to clarify whether ageing of salivary gland stem cells is involved in salivary gland atrophy found in old people. The salivary gland stem cells of young mice (six weeks old) and old mice (80~90 weeks old) were identified as CD133-positive cells using flow cytometry and characterized. Consequently, the frequency of salivary gland stem cells was lower in submandibular glands of old mice than that in the young mice. In addition, salisphere-forming capacity was also decreased in submandibular glands of old mice compared with that in young mice. These results suggested that stem cell ageing was possibly involved in ageing-induced salivary gland atrophy.

研究分野：口腔病理

キーワード：唾液腺 再生 老化 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

高齢者に認められる口腔乾燥症の原因としては、基礎疾患に対する服薬が原因の多くを占めることが知られているが、加齢による唾液腺実質組織の損傷もその一因の1つとして知られている。実際、我々が日常診断で遭遇する口唇生検では、シェーグレン症候群などの基礎疾患に罹患していない患者においても唾液腺の腺房細胞に顕著な萎縮が認められる。このような背景のもと、当該研究では唾液腺老化、その中でも近年注目されている幹細胞老化に焦点をあて当該研究を実施した。

唾液腺組織幹細胞については、これまで CD24, c-Kit, Sca1 陽性細胞に加えて CD133 陽性細胞も高い幹細胞活性を有する可能性が示唆されている。しかしながら、これまで唾液腺幹細胞老化に関する解析は行われていない。

2. 研究の目的

若齢、老齢マウス顎下腺の CD133 陽性細胞の解析により、幹細胞老化を制御する標的因子を特定する。

3. 研究の方法

(1) 顎下腺組織の単細胞化

1) 6週齢雌マウス、80~90週齢雌マウスをそれぞれ頸椎脱臼にて屠殺し心尖部を切開し脱血を行う。唾液腺を摘出し、DMEM+10% FBS で顎下腺を氷上にて保存する。

2) 摘出した唾液腺から余分な水分を除き、ディッシュ上でハサミを用いて機械的に細切する。

3) 細切した顎下腺組織を 750U/ml コラゲナーゼタイプ、ヒアルロニダーゼタイプ 500U/ml、100µg/ml DNase を DMEM にて 37 のオービタルシェイカー上で 45 分インキュベートする。

4) 5ml の DMEM+10% FBS を加え、100g 20 秒 4 にて遠心する。

5) 上清を吸引し PBS 10ml にて懸濁しピペッティングを行う。

6) 100µm のセルストレイナーを用いて細胞塊を除去する。

7) 細胞懸濁液を 300g 5 分 4 にて遠心する。

8) 遠心後の細胞懸濁液から上清を吸引し Tryple Express+100µg/ml DNase を加え、37 で 10 分インキュベートする。

9) DMEM+10% FBS を加え、300g 5 分 4 にて遠心する。

10) 上清吸引後 HBSS+2%FBS にて懸濁する。
11) 40µm のセルストレイナーにて細胞塊を除去する。

12) 細胞数をカウントする。

(2) 顎下腺 CD133 陽性細胞の検出

1) 分散化したマウス顎下腺細胞の免疫染色を行う。

2) 免疫染色は anti-CD133-APC、anti-hematopoietic lineage cocktail、コ

ントロールには Isotype control を用いた。
3) 細胞懸濁液に抗体を加え、4、30 分遮光状態でインキュベートする。また、10 分毎にタッピングによる混和を行う。

4) インキュベート後、300g 5 分 4 にて遠心する。

5) 上清吸引後 HBSS+2%FBS にて懸濁する。

6) 300g 5 分 4 にて遠心する。

7) 上清吸引後 HBSS+2%FBS にて懸濁する。

8) フローサイトメトリーを用いて CD133 陽性細胞の検出を行う。

(3) Salishpere 形成能 (幹細胞活性) の評価

1) CD133 陽性細胞をフローサイトメトリーを用いて回収する。

2) CD133 陽性細胞 10,000cells を 25µl Salishpere medium (DMEM/F12, 800µ/ml EGF, 800µg/ml FGF-2, 0.4mg/ml insulin, 10mM Dexamethasone, N2,

Penicillin-Streptomycin) にて懸濁し

Matrigel (Growth factor reduced) 50 µl と混合した後、12well プレートへドロップする。

3) 15~20 分間 37 インキュベーター内に静置しゲルを硬化させる。

4) ゲル硬化後、Salishpere medium を 1ml 加え 37 インキュベーターにてインキュベートする。

(4) H2B-GFP マウスを用いた

Label-retaining cells (LRCs: 幹細胞とされる) の検出

1) TetO-H2B - GFP マウスに 1mg/ml の doxycycline を出生時から 6 週間飲水投与する。

2) 6 週間後 4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定の後、顎下腺を摘出する。

3) 4%パラホルムアルデヒドにて再度固定する。

4) 10%, 20%, 30%スクロース溶液にてスクロース置換を行う。

5) OTC コンパウンドに包埋し、液体窒素で急速凍結する。

6) クリオスタットにて薄切し蛍光顕微鏡を用いて解析する。

4. 研究成果

(1) 老齢マウス解剖時の所見

顎下腺組織周囲には脂肪組織の付着が認められたが、顎下腺実質には顕著な変化は認められなかった。(図.1)

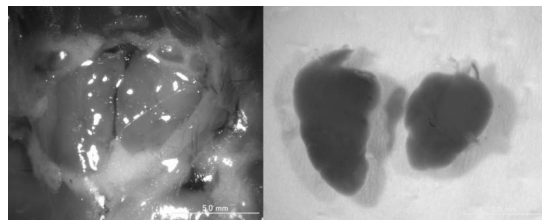


図 1. 老齢(87w)マウス解剖時の顎下腺組織頸部皮膚剥離時の顎下腺組織(左) 摘出後の顎下腺組織(右)

(2) 若齢マウス(6w)と老齢マウス(84w)で

顎下腺における CD133 陽性細胞の割合

若齢マウスにおいては顎下腺細胞中、CD133 陽性細胞は 4.1%の割合で存在するが、老齢マウス顎下腺では 2.1%と集団の減少を認めた。(図 2,3,4)

	1 回目	2 回目	3 回目	平均
若齢マウス (6w)	4.1%	4.8%	3.4%	4.1%
老齢マウス (84w)	2.1%	2.5%	2.1%	2.2%

図 2 . フローサイトメトリーの結果

平均して若齢マウス(6w)と老齢マウス(84w)では約 2 倍の差を認めた。

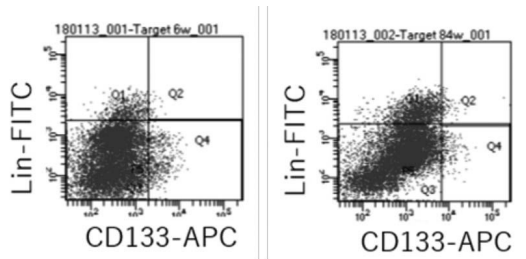


図 3 . CD133 陽性細胞の分布

若齢マウス(左)と老齢マウス(右)の CD133 陽性細胞の分布

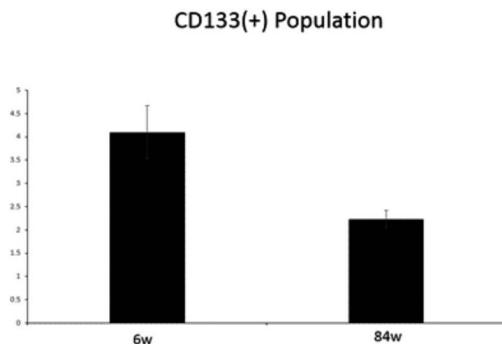


図 4 . CD133 陽性細胞の割合

若齢マウス(6w)と老齢マウス(84w)の CD133 陽性細胞の割合をグラフで示す。

(3) Sphere 形成能の評価

若齢マウスの CD133 陽性細胞は陰性細胞に比較して高い Sphere 形成能を示したが、老齢マウス(84w)の CD133 陽性細胞は若齢マウス(6w)CD133 陽性細胞と比較して Sphere 形成能が低下している傾向を示した。(図.5)

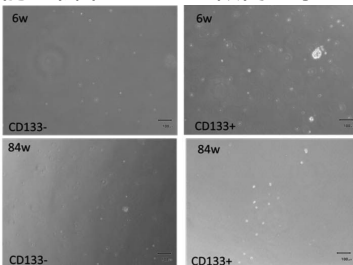
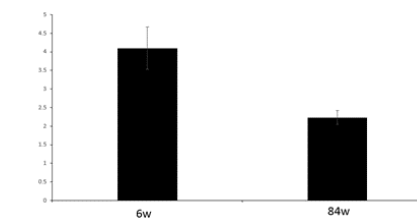
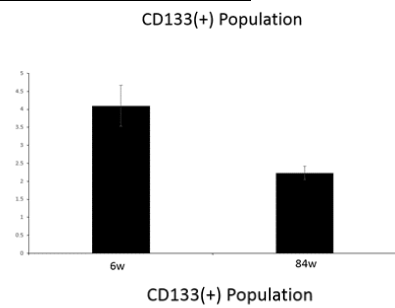


図 5. 若齢マウス(6w)と老齢マウス(84w)の Sphere では若齢マウス(6w)で明らかに認められた。

(4) 若齢(6w)マウスと老齢(84w)マウスの

CD133 陽性細胞の局在



若齢マウス唾液腺において CD33 陽性細胞は CK18 陽性の導管に位置することが分かった。(図.6)。この局在は老齢マウスにおいても変化はなかった。

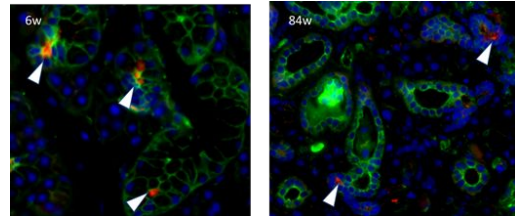


図 6 . 顎下腺 CD133 陽性細胞の局在

若齢マウス顎下腺 (左) および老齢マウス顎下腺 (右) ではいずれも CK18 (緑) 陽性の導管細胞に CD133 (赤) 陽性細胞を認めた。

(5) 若齢(6w)マウスと老齢(84w)マウスの腺房構造の比較

上皮細胞マーカーである pan-cytokeratin と唾液腺腺房細胞マーカーである AQP5 による蛍光免疫染色において、腺房構造に明らかな違いは認められなかった。(図.7)

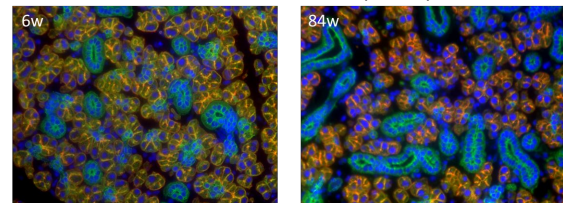


図 7. 顎下腺の腺房細胞

若齢マウス (左) 老齢マウス (右) いずれも AQP5 陽性細胞は維持されていた。

(6) 若齢(6w)マウスと老齢(84w)マウスの顎下腺細胞増殖能の比較

上皮細胞マーカーである pan-cytokeratin と増殖期細胞マーカーである Ki-67 の蛍光免疫染色により唾液腺上皮細胞における Ki-67 陽性率を測定した。老齢マウス唾液腺では若齢(6w)マウスと比較し有意に Ki-67 陽性率が低下していた。(図.8,9)

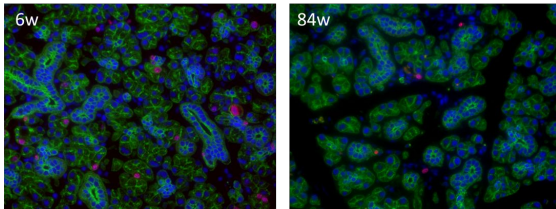


図 8. Ki-67 による蛍光免疫染色
Pankeratin(緑)陽性の唾液腺上皮細胞における Ki-67(赤)陽性率は若齢(6w) マウスと比較し老齢マウス唾液腺では有意に減少していた。

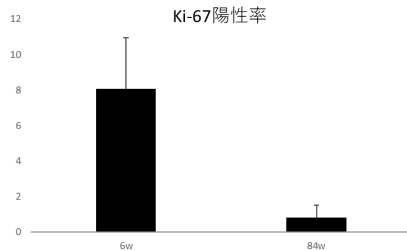


図 9. Ki-67 陽性率

若齢マウス(6w)では Ki-67 陽性率:約 8.1%(左) 老齢マウスでは Ki-67 陽性率:1%未滿(右)という結果であった。

本研究結果より、老齢マウス唾液腺においては若齢マウスと比較し CD133 陽性細胞の数の減少が起こっていることが明らかとなった。また、老齢マウス唾液腺 CD133 陽性細胞は幹細胞活性についても低下している可能性も示された。今後の研究では CD133 陽性細胞の数の減少、機能低下が起こるメカニズムについて解析を進める必要がある。

(7) H2B-GFP マウスにおける唾液腺幹細胞の同定は困難であった

顎下腺では小腸と比較し、GFP 陽性細胞数が少なく初期のラベル効率が低い結果となり、長期観察による LRCs の検出が困難であることが予測された。

(図 10.)

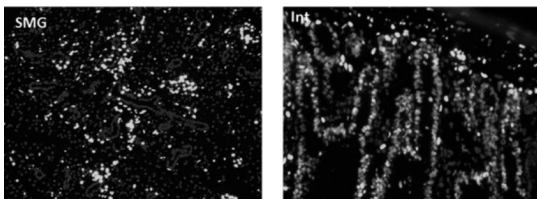


図 10. 顎下腺(SMG 左)と小腸(Int 右)での GFP 陽性細胞

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 17 件)

1. Seki T, Aizawa R, Tanaka J, Yajima-Himuroa S, Kato M, Tanaka K, Mishima K, Yamamoto M. Establishment of mouse gingival junctional epithelial cell line using a bioengineered tooth system. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018.

(in press) 査読有り

2. Bin B, Bhin J, Takaishia M, Toyoshima K, Kawamata S, Ito K, Hara T, Watanabe T, Irie T, Takagishi T, Lee SH, Jung HS, Rho S, Seo J, Choi DH, Hwang D, Koseki H, Ohara O, Sano S, Tsuji T, Mishima K, Fukada T. Requirement of zinc transporter ZIP10 for epidermal development: implication of the ZIP10-p63 axis in epithelial homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017, 114(46):201710726 査読有り

3. Bin B, Bhin J, Seo J, Kim SY, Lee E, Park K, Choi DH, Takagishi T, Hara T, Hwang D, Koseki H, Asada Y, Shimoda S, Mishima K, Fukada T. Requirement of zinc transporter SLC39A7/ZIP7 for dermal development to fine-tune endoplasmic reticulum function by regulating protein disulfide isomerase. *J Invest Dermatol*. 2017, 137(8):1682-1691 査読有り

4. Takebe Y, Tatehara S, Fukushima T, Tokuyama-Toda R, Yasuhara R, Mishima K, Satomura K. Novel Cryopreservation Method for the Effective Collection of Dental Pulp Stem Cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2017, 23(5):251-261 査読有り

5. Funato S, Yasuhara R, Yoshimura K, Miyamoto Y, Kaneko K, Suzawa T, Chikazu D, Mishima K, Baba K, Kamijo R. Extracellular matrix loss in chondrocytes after exposure to interleukin-1 in NADPH oxidase-dependent manner. *Cell Tissue Res*. 2017 Apr;368(1):135-144 査読有り

6. Hoashi Y, Okamoto S, Abe Y, Matsumoto T, Tanaka J, Yoshida Y, Imaizumi K, Mishima K, Akamatsu W, Okano H, Baba K. Generation of neural cells using iPSCs from sleep bruxism patients with 5-HT2A polymorphism. *J Prosthodont Res*. 2016 Dec 1. pii: S1883-1958(16)30106-2 査読有り

7. Inoue H, Kishimoto A, Nakayama RU, Hasaka A, Takahashi A, Ryo A, Muramatsu T, Ide F, Mishima K, Saito I. Resveratrol improves salivary dysfunction in a non-obese diabetic (NOD) mouse model of Sjogren's syndrome. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 2016 Sep;59(2):107-112 査読有り

8. Ohashi W, Kimura S, Iwanaga T, Furusawa Y, Irie T, Izumi H, Watanabe T, Hijikata A, Hara T, Ohara O, Koseki H, Sato T, Robine S, Mori H, Hattori Y, Watarai H, Mishima K, Ohno H, Hase K, Fukada T. Zinc transporter SLC39A7/ZIP7 promotes intestinal epithelial self-renewal by

- resolving ER stress. PLOS Genetics 2016;12(10): e1006349 査読有り
9. Nagahama R, Yamada A, Tanaka J, Aizawa R, Suzuki D, Kassai H, Yamamoto M, Mishima K, Aiba A, Maki K, Kamijo R. Rho GTPase protein Cdc42 is critical for postnatal cartilage development. Biochem Biophys Res Commun. 2016;470:813-817 査読有り
 10. Yasuhara R, Irie T, Suzuki K, Sawada T, Miwa N, Sasaki A, Tsunoda Y, Nakamura S, Mishima K. The beta-catenin signaling pathway induces aggressive potential in breast cancer by up-regulating the chemokine CCL5. Exp Cell Res. 2015;338:22-31 査読有り
 11. Tanaka J, Irie T, Yamamoto G, Yasuhara R, Isobe T, Hokazono C, Tachikawa T, Kohno Y, Mishima K. ANGPTL4 regulates the metastatic potential of oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. 2015;44:126-133 査読有り
 12. Takahashi A, Inoue H, Mishima K, Ide F, Nakayama R, Hasaka A, Ryo K, Ito Y, Sakurai T, Hasegawa Y, Saito I. Evaluation of the effects of quercetin on damaged salivary secretion. PLoS One. 2015;10:e0116008 査読有り
 13. Saito Y, Yamada A, Suzuki D, Tanaka J, Nagahama R, Kurosawa T, Maki K, Mishima K, Shiota T, Kamijo R. Association of aging with gene expression profiling in mouse submandibular glands. Genom Data. 2015;5:115-119 査読有り
 14. Ono M, Suzawa T, Takami M, Yamamoto G, Hosono T, Yamada A, Suzuki D, Yoshimura K, Watahiki J, Hayashi R, Arata S, Mishima K, Nishida K, Osumi N, Maki K, Kamijo R. Localization and osteoblastic differentiation potential of neural crest-derived cells in oral tissues of adult mice. Biochem Biophys Res Commun. 2015;464:1209-1214 査読有り
 15. Okada S, Irie T, Tanaka J, Yasuhara R, Yamamoto G, Isobe T, Hokazono C, Tachikawa T, Kohno Y, Mishima K. Potential role of hematopoietic pre-B-cell leukemia transcription factor-interacting protein in oral carcinogenesis. J Oral Pathol Med. 2015;44:115-125 査読有り
 16. Matsunaga A, Takami M, Irie T, Mishima K, Inagaki K, Kamijo R. Microscopic study on resorption of beta-tricalcium phosphate materials by osteoclasts. Cytotechnology. 2015;67:727-732 査読有り
 17. Ichikawa Y, Watahiki J, Nampo T, Nose K, Yamamoto G, Irie T, Mishima K, Maki K. Differences in the developmental origins of the periosteum may influence bone healing. J Periodontal Res. 2015;50:468-478 査読有り
- [学会発表](計23件)
1. 安原理佳, 田中準一, 美島健二. 筋上皮細胞可視化マウスを用いた唾液腺由来筋上皮細胞の単離と局在解析. 「口腔機能維持・回復のための集学的研究開発拠点の形成」東京 2018.3.17
 2. 美島健二: 唾液腺機能障害における再生医療研究の現状. 『唾液腺機能回復の展望』メインシンポジウム B. 第59回歯科基礎医学会学術大会、松本、9/16-18, 2017.
 3. 田中準一, 大庭伸介, 馬淵 洋, 安原理佳, 入江太朗, 福島美和子, 河野葉子, 美島健二. 唾液腺初期発生における Sox9 の機能解析第16回日本再生医療学会総会, 仙台, 3/7-9, 2017
 4. 安原理佳, 田中準一, 川嶋章弘, 福島美和子, 入江太朗, 関沢明彦, 美島健二. 脂肪幹細胞を活用した唾液腺再生メカニズムの解析. 第106回日本病理学会総会, 東京 4/27-29, 2017.
 5. 田中準一, 大庭伸介, 北條宏徳, 馬淵 洋, 安原理佳, 入江太朗, 福島美和子, 河野葉子, 美島健二. 唾液腺初期発生における転写因子の機能解析 Functional analysis of transcription factors in salivary gland development 第106回日本病理学会総会, 東京 4/27-29, 2017.
 6. 田中準一, 大庭伸介, 北條宏徳, 馬淵 洋, 安原理佳, 入江太朗, 福島美和子, 河野葉子, 美島健二. 唾液腺発生における転写因子の機能解析. 第17回抗加齢医学会総会東京 6/2-4, 2017.
 7. Rika Yasuhara, Junichi Tanaka, Miwako Fukushima, Tarou Irie, Kenji Mishima. Mouse salivary gland-derived myoepithelial cells shows stem/progenitor cell properties in vitro. International Society for Stem Cell Research Boston, MA, 6/14-17, 2017.
 8. Junichi Tanaka, Shinsuke Ohba, Hironori Hojo, Yo Mabuchi, Rika Yasuhara, Tarou Irie, Miwako Fukushima, Yohko Kohno, and Kenji Mishima. SOX9 IS A KEY TRANSCRIPTION FACTOR OF SALIVARY GLAND DEVELOPMENT. International Society for Stem Cell Research Boston, MA, 6/14-17, 2017.
 9. 安原理佳, 田中準一, 入江太朗, 美島健二. 筋上皮細胞可視化マウスを用いた唾液腺由来筋上皮細胞の単離と局在解析. 第28回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会埼玉 8/23-25, 2017
 10. 田中準一, 大庭伸介, 北條宏徳, 馬淵 洋, 安原理佳, 入江太朗, 美島健二. 唾液腺発

- 生における機能的転写因子の同定
Identification of functional transcription factors in salivary gland development. 第 28 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会埼玉 8/23-25, 2017
11. Rika Yasuhara, Junichi Tanaka, Tarou Irie, Kenji Mishima. Myoepithelial cells are one of stem/progenitor cells in mouse salivary gland. Japanese Association for Dental Research(JADR), Tokyo, 11/18-19, 2017
 12. Junichi Tanaka, Shinsuke Ohba, Hironori Hojo, Yo Mabuchi, Rika Yasuhara, Tarou Irie, and Kenji Mishima. Identification of transcription factors to induce the salivary gland from the primitive oral epithelium. Japanese Association for Dental Research(JADR), Tokyo, 11/18-19, 2017
 13. 田中準一、中村史郎、安原理佳、井上富雄、美島健二. 自己組織化技術を用いたマウス ES 細胞由来 3 次元唾液腺組織の誘導. Self-formation of salivary gland tissue from mouse embryonic stem cells 第 62 回日本唾液腺学会学術集会東京 11/25, 2017
 14. 美島健二 (座長および企画): 口腔からアプローチする全身の病態制御, 第 16 回日本抗加齢医学会総会シンポジウム, 大阪 2016 年 6 月
 15. 田中準一、馬淵 洋、安原理佳、入江太郎、福島美和子、河野葉子、美島健二: 唾液腺発生における Sox9 の機能解析: Sox9 regulates development of salivary glands. 第 15 回日本再生医療学会総会, 2016 年 3 月 18 日, 大阪
 16. Rika Yasuhara, Junichi Tanaka, Miwako Fukushima, Tarou Irie, Yohko Kohno, Kenji Mishima: 唾液腺由来筋上皮細胞の単離と性質解析 Characterization of myoepithelial cells in salivary glands. 第 105 回日本病理学会総会, 2016 年 5 月 12-14 日, 仙台
 17. 田中準一、馬淵 洋、安原理佳、入江太郎、福島美和子、河野葉子、美島健二: Sox9 を介したマウス唾液腺組織幹細胞の機能解析 Sox9 is involved in the ability to self-renew of stem-like cells in murine salivary gland. 第 105 回日本病理学会総会, 2016 年 5 月 12-14 日, 仙台
 18. 安原理佳、田中準一、福島美和子、入江太郎、河野葉子、美島健二: Isolation and characterization of myoepithelial cells in salivary glands. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 11 月 30-12 月 2 日, 横浜.
 19. 田中準一、大庭 伸介、馬淵 洋、安原理佳、入江太郎、福島美和子、河野葉子、美島健二: 唾液腺発生における Sox9 の機能解析 Sox9 regulates development of salivary glands. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 12 月 2 日, 横浜.
 20. 安原理佳、田中準一、福島美和子、入江太郎、河野葉子、美島健二: 唾液腺由来筋上皮細胞の単離と性質解析 Isolation and characterization of myoepithelial cells in salivary glands. 第 61 回日本唾液腺学会学術集会, 2016 年 12 月 3 日
 21. 田中準一、馬淵 洋、安原理佳、入江太郎、福島美和子、河野葉子、美島健二: マウス唾液腺における幹細胞の同定とその characterization. 第 14 回日本再生医療学会, 2015 年 3 月 19-21 日, 横浜
 22. Tanaka J, Mabuchi Y, Yasuhara R, Irie T, Fukushima M, Fukada T, Yohko K, Mishima K: Identification and characterization of tissue-specific stem cells from murine salivary gland. International Society for Stem Cell Research, June 24-27th, 2015, Stockholm, Sweden
 23. 田中準一、馬淵 洋、安原理佳、入江太郎、福島美和子、河野葉子、美島健二: マウス唾液腺における幹細胞の同定とその機能解析. 第 104 回日本病理学会, 2015 年 4 月 30 日- 5 月 2 日, 名古屋
- 〔図書〕(計 1 件)
美島健二: 病理学総論にもとづく口腔病理学 (分担) 永末書店 京都 24-34 頁, 2016
- 〔その他〕
ホームページ等
<http://www10.showa-u.ac.jp/~oralpath/index.html>
- 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
安原 理佳 (YASUHARA Rika)
昭和大学・歯学部・講師
研究者番号: 20453649
- 田中 準一 (TANAKA Junichi)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号: 40710166