

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20368

研究課題名(和文)3次元自己組織化技術を用いた唾液腺組織誘導法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the three-dimensional salivary gland self-organization induction method

研究代表者

田中 準一 (Tanaka, Junichi)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：40710166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウス唾液腺初期発生過程における網羅的な遺伝子解析により唾液腺原器特異的な2種類の転写因子を同定した。これらの転写因子についてマウスES細胞由来口腔粘膜上皮にアデノウイルスを用いて過剰発現を行った。分化誘導23日において三次元的な外分泌腺様構造が誘導されることが明らかとなった。マウスES細胞から誘導された外分泌腺様組織は、胎生期マウス唾液腺と類似した構造を有していた。さらに、耳下腺切除モデルマウスへの同所移植実験において唾液腺様組織を形成することが確認された。

研究成果の概要(英文)：The salivary gland rudiments in embryonic day 12 were separated into the epithelium of submandibular gland and oral epithelium far from the salivary gland by laser micro-dissection, and performed analysis of differential gene expression by RNA-seq. We identified the two transcriptional factors that regulate specification of salivary gland rudiment at the earliest stages of salivary gland development. To determine whether the transcriptional factors promote salivary gland differentiation, mouse embryonic stem cells-derived oral ectoderm was transduced with Ad-vector expressing transcription factors. During days 23, we observed the aggregates underwent a dynamic shape change and formed branching morphology. The ESCs-derived exocrine gland structures had three-dimensional salivary gland structures. Moreover, orthotopic transplantation of ESCs-derived salivary gland could replace salivary gland in a mouse model of a parotid gland defect.

研究分野：口腔病理

キーワード：唾液腺 ES細胞 分化誘導

1. 研究開始当初の背景

(1) 唾液腺の再生医療に関する報告は、唾液分泌障害マウスを用いた組織幹細胞による治療実験があげられる。マウス唾液腺から単離された c-Kit 陽性細胞や、CD24, c-Kit, Sca1 陽性細胞には腺組織再構築能が認められ、唾液腺組織幹細胞である可能性が報告されている。加えて申請者も、マウス唾液腺に存在する CD31 陽性血管内皮様細胞に唾液分泌障害抑制機能があることを報告してきた(Stem Cells 30: 1925-37, 2012)。しかしながら、ヒト唾液腺組織に同様な細胞が存在するのか、あるいは単離に必要な唾液腺組織を確保するのが困難であるなどの問題が残る。一方、ES/iPS 細胞は安定した培養系が確立されており移入に必要な細胞数を得ることは容易だが、唾液腺細胞への分化誘導法の確立が不可欠となる。しかし、現状では唾液腺においてその分化誘導法についての報告はない。

(2) マウス唾液腺は胎生 11.5 日に口腔粘膜の肥厚と、その陥入・伸長により形成が開始する。本発生過程においては、原基形成後の分枝形成に関わる因子に関する報告はあるが初期の口腔粘膜上皮の肥厚に関わる因子についての報告はない。唾液腺にきわめて類似した組織である涙腺においては Sox9 が上皮の陥入に必須であるという報告がなされた。このことから、唾液腺発生過程においても Sox9 の関与が想定されるが、Sox9 は軟骨分化を誘導するなどその機能は多彩であり単独で涙腺および唾液腺分化を誘導するとは考えにくい。以上のように唾液腺の初期発生メカニズムには不明な点が多い。

2. 研究の目的

「3次元自己組織化技術」と唾液腺原基特異的に発現する転写因子を応用することにより、唾液腺の発生・発達段階を *in vitro* で再現し、ES/iPS 細胞から3次元唾液腺組織への分化誘導法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 申請者が既に作製した胎生 12 日マウス唾液腺原基 唾液腺原基直上粘膜 口腔粘膜の3領域の遺伝子発現プロファイルから同定された 唾液腺原基 唾液腺原基直上粘膜特異的に発現する転写因子(10 種類)について、Fluorescence in situ hybridization (FISH)を用いて候補遺伝子の局在を確認した。

(2) 胎生 13 日マウス顎下腺を外科的に切除し器官培養する。器官培養の際、siRNA を用いて候補遺伝子を抑制した。

(3) ES細胞由来口腔外胚葉へのアデノウイルスベクターを用いた候補遺伝子の過剰発現を行い形態変化を解析した。

4. 研究成果

(1) 候補遺伝子の胎生期唾液腺における候補遺伝子の局在解析

胎生 12 日マウス唾液腺において候補遺伝子のうち2種類の遺伝子がマウス唾液腺原器および直上の口腔粘膜特異的な発現を示すことが明らかとなった。蛍光抗体法の結果からも2種類の候補遺伝子は唾液腺原器のみならず、唾液腺原器直上の口腔粘膜にも発現することが明らかとなった。

(2) 候補遺伝子の機能解析

胎生 13 日マウス顎下腺を外科的に切除し器官培養する。器官培養の際、siRNA を用いて候補遺伝子を抑制した結果、唾液腺の分枝形態形成が有意に抑制された。(図1)

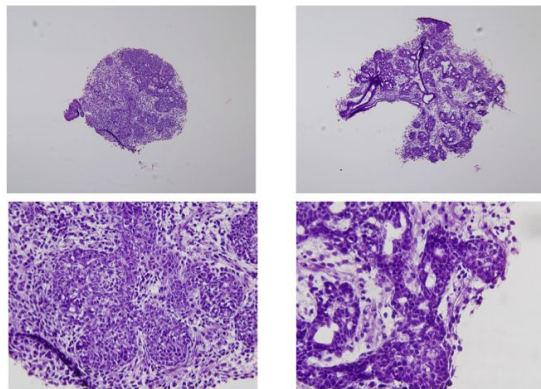


図1. 胎生 13 日唾液腺器官培養
コントロール siRNA(左)に比べて候補遺伝子 siRNA による遺伝子抑制を行った唾液腺(右)では分子形態形成に異常がみられた。

(3) マウス ES 細胞の口腔粘膜上皮への分化誘導

マウス ES 細胞から無血清凝集浮遊培養法(SFEBq 法)を用いて口腔外胚葉の分化誘導方法を検討した。SFEBq 法に BMP4 を添加することで原法より高効率に外胚葉組織を誘導でき、分化誘導 7 日で EB の最外層に位置することが明らかとなった。(図2,3,4)

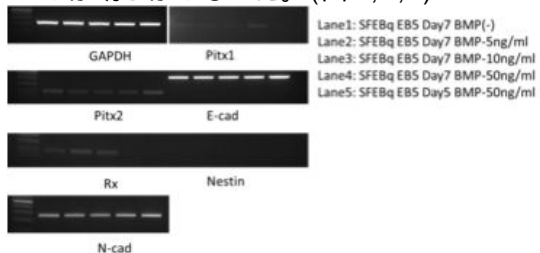


図2. 分化誘導 7 日における EB の遺伝子発現
BMP4 添加群で Pitx1 等の口腔粘膜マーカー遺伝子の発現がみられた。

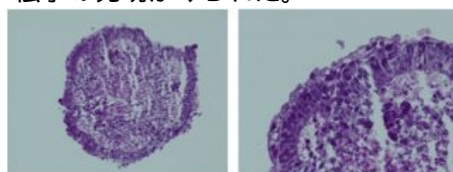


図3. 分化誘導 7 日目 H-E 像

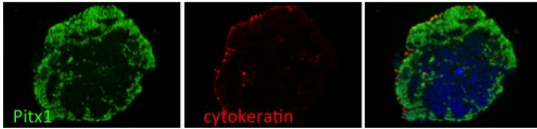


図4. 分化誘導7日の蛍光抗体法
口腔粘膜マーカーが最表層に認められる。

(4) マウス ES 細胞由来口腔粘膜上皮へのアデノウイルスによる
マウス ES 細胞由来口腔粘膜上皮は EB の最外層に位置し、アデノウイルスによる感染により ES 由来口腔粘膜に候補遺伝子を過剰発現できることが明らかとなった。(図5)

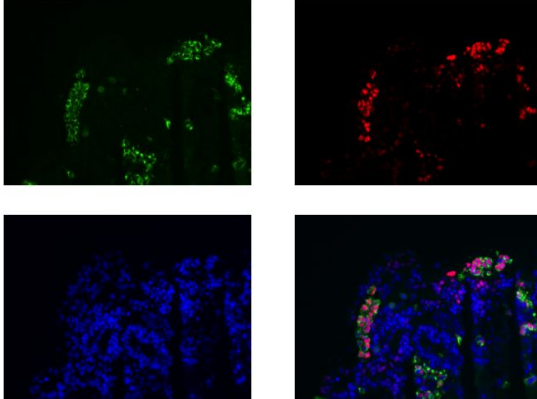
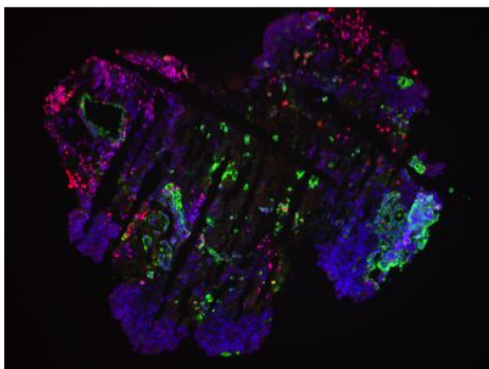


図5. 候補遺伝子アデノウイルス感染後の蛍光抗体法
Pan-cytokeratin(Alexa488、左)、候補遺伝子(Alexa594、右)。Pan-cytokeratin 陽性の上皮細胞に候補遺伝子の発現が認められる。

(5) 候補遺伝子過剰発現マウス ES 細胞由来口腔粘膜上皮の単離
アデノウイルスによる感染後にマウス ES 細胞由来口腔粘膜上皮の培養を継続した。EB の内部は非上皮性成分を含み、培養継続により非上皮性成分の増殖が進み、上皮成分の割合が低下することが、長期培養によって明らかになった。(図6)そのため、感染後の口腔粘膜上皮の単離を試みた。ES 細胞由来口腔粘膜上皮部分を実体顕微鏡化で27G シリンジを用いて外科的に切除することで上皮組織を単離できることが明らかとなった。単離した上皮組織を長期培養した。

図6. 分化誘導20日



Pan-cytokeratin(Alexa488)、候補遺伝子(Alexa594、右)。

(6) 候補遺伝子過剰発現マウス ES 細胞由来口腔粘膜上皮の長期培養
分化誘導8日で外科的に単離した ES 細胞由来口腔粘膜を長期浮遊培養して形態観察を行った。分化誘導23日目において口腔粘膜の部分的な肥厚、外方への伸長が観察され、その後分子形態形成が継続した。この構造は胎生期唾液腺の上皮部分と形態が類似し、ES 細胞より唾液腺様の組織が誘導されたことが予想された。(図7)

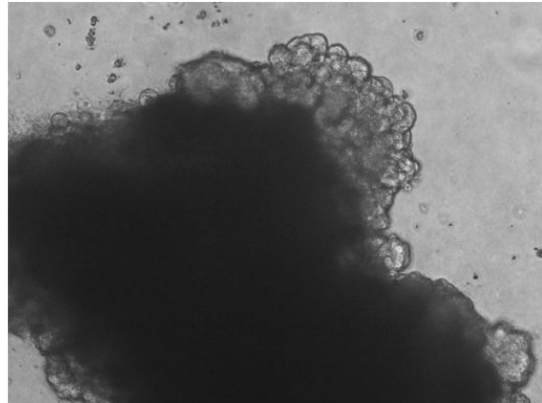


図7. 上皮単離後、分化誘導27日
外方への分子形態形成が認められた。

(7) マウス ES 細胞由来唾液腺様組織の移植
耳下腺全切除マウスの排泄導管部分に誘導した唾液腺組織を移植することで移植後1ヶ月で誘導唾液腺の生着が確認された。

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 3件)

1. Hoashi, Y., Okamoto, S., Abe, Y., Matsumoto, T., Tanaka, J., (他5名). 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)
2. Nagahama R, Yamada A, Tanaka J, Aizawa R, Suzuki D, Kassai H, (他5名). Rho GTPase protein Cdc42 is critical for postnatal cartilage development. Biochem Biophys Res Commun. 2016 Feb 19;470(4):813-7. (査読有)
3. Saito Y, Yamada A, Suzuki D, Tanaka J, Nagahama R, Kurosawa T, (他4名). Association of aging with gene expression profiling in mouse submandibular glands. Genom Data. 2015 Sep;5:115-9. (査読有)

〔学会発表〕(計 4件)

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, 横浜, 2016 年 12 月)

田中準一, 馬淵 洋, 安原理佳, 入江太朗, 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, 仙台, 2016 年 5 月)

Tanaka J, Mabuchi Y, Yasuhara R, Irie T, Fukushima M, Fukada T, Yohko K, Mishima K : Characterization of tissue-specific stem cells from murine salivary gland. (第 63 回 国際歯科研究学会 (IADR) 日本部会総会 (JADR)・学術大会, 福岡, 2015 年 10 月)

田中準一, 馬淵 洋, 安原理佳, 入江太朗, 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, 名古屋, 2015 年 4 月)

〔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

田中 準一 (TANAKA, Junichi)
昭和大学歯学部・口腔病態診断科学講座
口腔病理学部門・助教
研究者番号 : 40710166

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者
なし ()

研究者番号 :

(4) 研究協力者
なし ()