

令和 4 年 6 月 26 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03838

研究課題名（和文）同所移植可能なiPS細胞由来ヒト唾液腺オルガノイドの作出

研究課題名（英文）Generation of human iPSCs-derived human salivary gland organoids for orthotopic transplantation

研究代表者

田中 準一（Tanaka, Junichi）

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：40710166

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,600,000円

研究成果の概要（和文）：マウスES細胞由来唾液腺オルガノイドの誘導方法を改変し、ヒトiPS細胞より唾液腺オルガノイド誘導することに成功した。誘導した唾液腺オルガノイドは組織学的に胎生期唾液腺に類似した組織形態を持っていることが明らかとなった。またscRNA-seqの結果より唾液腺オルガノイドには、唾液腺構成細胞である、導管細胞、腺房細胞、筋上皮細胞が含まれていることが示された。  
この唾液腺オルガノイドは耳下腺を切除した免疫不全マウスに同所的に移植することで周囲組織との関係を保って生着することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、移植可能なヒトiPS細胞由来の唾液腺オルガノイドの誘導方法を開発したことでこれまで主にマウスで行ってきた唾液腺発生研究や疾患メカニズムの解析をヒト細胞で行うことが可能となる。また本研究で唾液腺オルガノイドの同所移植によって機能的な唾液腺を再生できる可能性が示され、将来的には唾液腺移植治療への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：We have succeeded in inducing salivary gland organoids from human iPSC cells by modifying the induction method of salivary gland organoids derived from mouse ES cells. The induced salivary gland organoids were found to have histologically similar morphology to embryonic salivary glands. The scRNA-seq results showed that the salivary gland organoids contained ductal cells, acinar cells, and myoepithelial cells, which are the constituent cells of the salivary gland. Orthotopic transplantation of these salivary gland organoids into immunodeficient mice with excised parotid glands showed that they functioned in relation to the surrounding tissues.

研究分野：唾液腺再生

キーワード：唾液腺 オルガノイド 移植 iPS細胞

### 1. 研究開始当初の背景

近年、ES・iPS細胞などの多能性幹細胞から「ミニ臓器」とも呼ばれる3次元的な組織構築を持ったオルガノイドの分化誘導が報告され、再生医療、疾患メカニズム解析のツールとして大きな注目を集めている。多能性幹細胞から誘導した臓器を用いた再生医療は臓器移植に変わる究極の再生医療として切望されているが、いまだ臓器全体をオルガノイドで代替した報告はなかった。申請者らは世界に先駆けて、マウスES細胞より唾液腺オルガノイドの分化誘導方法を確認し、さらに同所移植により唾液腺全体を代替可能であることを報告した (Tanaka J., et al., Nature Commun, 2018)。

### 2. 研究の目的

上記の学術的背景と我々の先行研究の中で、マウスES細胞由来の唾液腺オルガノイドの分化誘導技術を改変し、ヒトiPS細胞からヒト唾液腺オルガノイドを作出し、それを同所移植することで、マウス唾液腺をヒトiPS細胞由来唾液腺に代替することを研究目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ヒト唾液腺オルガノイドの分化誘導

ヒトiPS細胞を浮遊培養を用いて非神経系外胚葉に誘導し、外層に原始口腔粘膜を誘導した。原始口腔粘膜への分化誘導はヒト内耳や下垂体オルガノイドの分化誘導方法を改変し行った。具体的には、ヒトiPS細胞に凝集塊を形成させTGFβ抑制剤を添加後、浮遊培養を続けた。誘導された口腔粘膜に対してFGF7およびFGF10添加培地で長期浮遊内容を行うことで唾液腺オルガノイドを作製した。

#### (2) ヒト唾液腺オルガノイドの解析

作製したオルガノイドを免疫蛍光染色、scRNA-seqを用いて解析した。さらに機能解析としてカルバコールによる刺激後に細胞内カルシウム濃度の測定を行った。

#### (3) ヒト唾液腺オルガノイドの同所移植

同所移植実験では耳下腺を排泄部導管で完全に切除したマウスに対して分化誘導した唾液腺オルガノイドをガイド糸を挿入後に同所移植した。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒトiPS細胞から唾液腺オルガノイドの分化誘導

我々が過去に報告したマウス唾液腺の誘導方法を改変してヒトiPS細胞から唾液腺オルガノイドが誘導可能であるか否かについて検討を行った。

SFBEq法を用いてTGFβの阻害剤であるSB431542を添加することで、ヒトiPS細胞から効率よく非神経系の上皮組織が誘導できることが明らかとなった。qPCRの結果より、この時点の上皮組織は口腔粘膜上皮のマーカーであるPITX2の高い発現を示した。

その後FGF7およびFGF10存在下で浮遊培養を続けるとiPS細胞の凝集塊より分枝構造を持った組織が発生することが明らかとなった。

#### (2) ヒト唾液腺オルガノイドの解析

この組織にはAQP5陽性の腺房様細胞、K18陽性の導管様細胞、αSMA陽性の筋上皮細胞が極性を持って配列し、そのパターンは胎生期唾液腺に類似した組織構築パターンであった。

また、bulk RNAseqの結果より唾液腺オルガノイドには唾液腺特異的遺伝子群の高い発現が見られ過去の報告と比較した結果、胎生期唾液腺に類似した遺伝子発現プロファイルを示した(図1)。さらに唾液腺の機能解析としてムスカリン受容体を介した細胞内カルシウム濃度上昇の機能解析を行った。カルバコールによる刺激により唾液腺オルガノイドの細胞内カルシウム濃度は濃度依存的な上昇をみせ、さらにこの反応は拮抗薬によるアトロピンの添加により完全にブロックされた。

これらの結果よりヒト唾液腺オルガノイドは組織構築、遺伝子発現プロファイル、および機能解析の結果より、未成熟ではあるが唾液腺を高度に模倣していると考えられた。

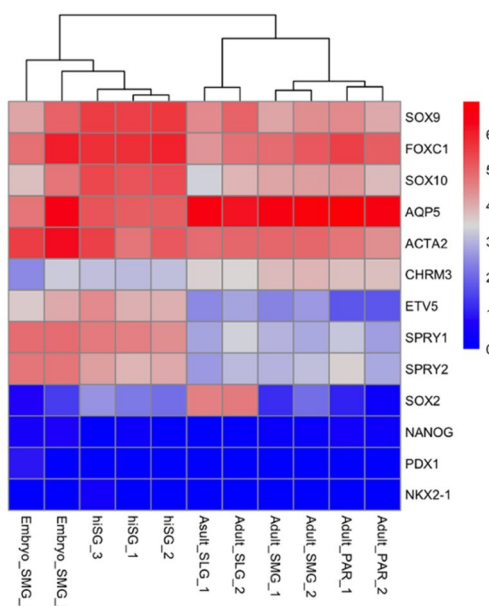


図1. 唾液腺オルガノイド(hiSG)のRNA-seq

### (3) ヒト唾液腺オルガノイドの同所移植

ヒト唾液腺オルガノイドが移植により機能的なオルガノイドを再生可能か否かについて同所移植による解析を行った。移植後 30 日の結果より唾液腺オルガノイドは移植部位に生着し腺組織構造を保っていた。これらの構造はヒト特異的ミトコンドリア抗体による染色により全てヒト細胞であることが示された。また移植したヒト唾液腺オルガノイドと宿主のマウス排泄部導管は完全に接続していることも組織学的に明らかとなった。

### (4) scRNAseq による細胞系譜解析

さらに詳細な唾液腺オルガノイドの解析として scRNAseq による解析を行った。scRNAseq データより唾液腺オルガノイドには少量の間葉細胞と、導管細胞、腺房細胞、基底細胞、筋上皮細胞、および増殖期細胞から構成されていることが明らかとなった(図 2)。また疑似時間軸解析により導管細胞と腺房細胞の系譜、および基底細胞、筋上皮細胞の系譜の 2 つの細胞系譜が存在し、これら 2 つの細胞系譜は増殖期細胞より供給されている可能性が示された。

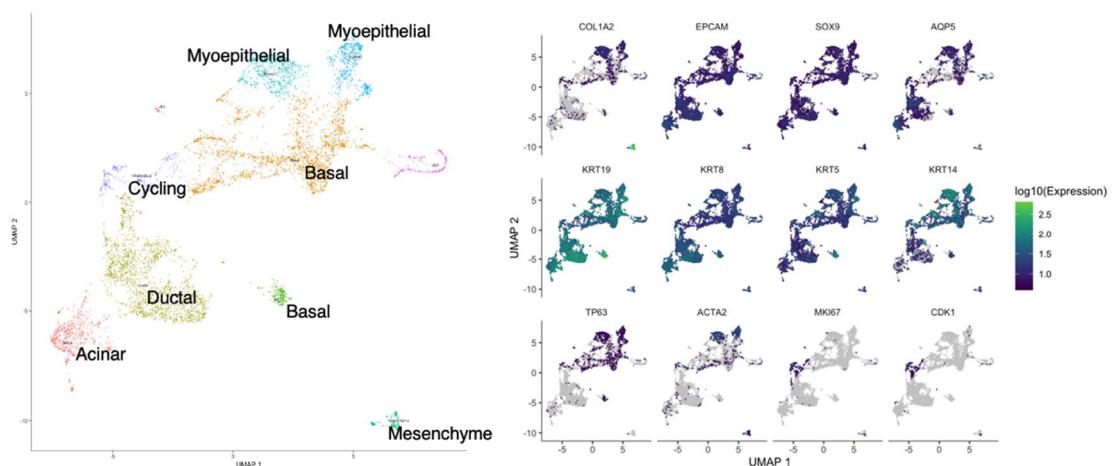


図 2 . 唾液腺オルガノイドの scRNA-seq

### (5) 結論

本研究成果より、ヒト iPS 細胞より唾液腺オルガノイドが誘導可能であることが示された。この唾液腺オルガノイドは組織学的にも遺伝子発現プロファイルからも胎生期唾液腺に類似していた。さらにこの唾液腺オルガノイドは同所移植により唾液腺部分に生着し成熟することが明らかとなった。

加えて scRNAseq による解析より、これまでは解析が困難であったヒト唾液腺発生過程の細胞系譜についても解析が可能である可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5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 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	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 無
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 -
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 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Abe Kyoko, Tanaka Junichi, Mishima Kenji, Iijima Takehiko	4. 巻 16
2. 論文標題 Exploring the mechanism of hyperpermeability following glycocalyx degradation: Beyond the glycocalyx as a structural barrier	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0252416	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Yuko, Yamada Atsushi, Akimoto Yoshihiro, Abe Kyoko, Matsubara Sachie, Hayakawa Junri, Tanaka Junichi, Kinoshita Mitsuhiro, Kato Tadashi, Ogata Hiroaki, Sakashita Akiko, Mishima Kenji, Kubota Yoshiaki, Kawakami Hayato, Kamijo Ryutarō, Iijima Takehiko	4. 巻 477
2. 論文標題 Cdc42 has important roles in postnatal angiogenesis and vasculature formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 64 ~ 69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2021.05.002	査読の有無 無
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 無
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 J, Mishima K	4. 巻 70(8)
2. 論文標題 In vitro three-dimensional culture systems of salivary glands	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathol Int	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka J, Takamatsu K, Yukimori A, Kujiraoka S, Ishida S, Takakura I, Yasuhara R, Mishima K	4. 巻 63(1)
2. 論文標題 Sox9 function in salivary gland development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Oral Biosci	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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka J, Mabuchi Y, Hata K, Yasuhara R, Takamatsu K, Kujiraoka S, Yukimori A, Takakura I, Sumimoto H, Fukada T, Azuma M, Akiyama H, Nishimura R, Shimane T, Mishima K	4. 巻 382(1)
2. 論文標題 Sox9 regulates the luminal stem/progenitor cell properties of salivary glands	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Exp Cell Res	6. 最初と最後の頁 111449
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2019.05.030.	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6件(うち招待講演 2件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 田中準一、高松弘貴、行森茜、鯨岡聡子、石田尚子、安原理佳、美島健二
2. 発表標題 多細胞系譜追跡法を用いたマウス唾液腺細胞系譜の解析
3. 学会等名 第31回日本臨床口腔病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中準一、小川美帆、安原理佳、行森茜、鯨岡聡子、高松弘貴、辻孝、美島健二
2. 発表標題 The role of FGFs in mouse embryonic stem cells-derived salivary gland organoid culture system
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 Tanaka J, Ogawa M, Hojo H, Mabuchi Y, Yasuhara R, Takamatsu K, Ohba S, Tsuji T, Mishima K
2. 発表標題 Generation of functional salivary gland organoid from mouse embryonic stem cells by Sox9 and Foxc1 transduction
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中準一, 北條宏徳, 安原理佳, 鯨岡聡子, 行森茜, 大庭伸介, 美島健二
2. 発表標題 唾液腺発生におけるSox9の転写制御ネットワーク機構
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中準一
2. 発表標題 唾液腺の基礎研究から再生医療へ
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tanaka J
2. 発表標題 ライフサイエンス研究を支える理研バイオリソース研究センター
3. 学会等名 TSUKUBA CONFERENCE(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	安原 理佳  (Yasuhara Rika)  (20453649)	昭和大学・歯学部・講師    (32622)	

## 6. 研究組織（つづき）

	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	大庭 伸介 (Ohba Shinsuke)  (20466733)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授  (17301)	
研究分担者	美島 健二 (Mishima Kenji)  (50275343)	昭和大学・歯学部・教授  (32622)	
研究分担者	辻 孝 (Tsuji Takashi)  (50339131)	国立研究開発法人理化学研究所・生命機能科学研究センター・チームリーダー  (82401)	
研究分担者	馬淵 洋 (Mabuchi Yo)  (50424172)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教  (12602)	
研究分担者	行森 茜 (Yukimori Akane)  (60813748)	昭和大学・歯学部・助教  (32622)	
研究分担者	桐田 忠昭 (Kirita Tadaaki)  (70201465)	奈良県立医科大学・医学部・教授  (24601)	
研究分担者	鯨岡 聡子 (Kujiraoka Satoko)  (90824673)	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
---------	---------