

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19057

研究課題名(和文) マウス線維芽細胞へのダイレクトリプログラミングによる唾液腺の誘導

研究課題名(英文) Generating salivary gland cells from mouse embryonic fibroblasts using the direct reprogramming technique

研究代表者

行森 茜 (YUKIMORI, AKANE)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：60813748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題の目的はダイレクトリプログラミングを用いてマウス胎児線維芽細胞(MEF)から唾液腺を作出することである。MEFにTP63/TFAP2a/cMYC/GRHL2を導入し気相液相界面培養を行うことで口腔粘膜上皮マーカーであるCK13が発現した重層扁平上皮(MEF由来口腔粘膜上皮様組織)を作出した。またMEFにTP63/TFAP2a/cMYC/GRHL2/Sox9/Foxc1を導入することで単層培養でCK18陽性の腺上皮様細胞に分化転換可能であることが示された。MEF由来口腔粘膜上皮様細胞およびMEF由来腺上皮様細胞からの唾液腺分化および成熟方法について今後も検討を継続する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題によって唾液腺再生技術開発に向けての基盤的なデータを得ることができた。MEFは細胞数の確保が容易であり、ダイレクトリプログラミングは腫瘍化のリスクが低い点から、ダイレクトリプログラミングによるMEFから唾液腺の作出はより安全で有効な唾液腺再生技術となるものと期待される。本研究成果をヒト唾液腺再生、そして口腔乾燥症の根本的治療法へ応用することにより、口腔内環境のみならず全身のQOLの維持・増進をもたらすものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project is to generate salivary gland cells from mouse embryonic fibroblasts (MEF) using the direct reprogramming technique. Four transcription factors (TP63/TFAP2a/cMYC/GRHL2) were co-transduced into MEF, and these MEF were grown in air-liquid interface culture. They formed a CK13-positive stratified epithelium (MEF-derived oral mucosal epithelial-like tissue). In addition, Six transcription factors (TP63/TFAP2a/cMYC/GRHL2/Sox9/Foxc1) were co-transduced into MEF. They formed CK18, AQP5-positive epithelial cells (MEF-derived glandular epithelial-like cells) in monolayer culture conditions. We plan to continue the examination of the salivary gland differentiation and maturation methods from MEF-derived oral mucosal epithelial-like tissues or MEF-derived glandular epithelial-like cells.

研究分野：口腔病理学

キーワード：唾液腺発生 ダイレクトリプログラミング

### 1. 研究開始当初の背景

口腔乾燥症(ドライマウス)の潜在的患者数は800万人ともいわれており、これらの患者では口腔乾燥症状が持続することにより、齲蝕、口腔感染症および摂食嚥下障害などの罹患率の上昇が認められている。加えて、超高齢社会の到来とも相まって口腔乾燥症は誤嚥性肺炎の一因となり、その重症例では著しいQOLの低下をきたすことが懸念されている。本症の治療法としては人工唾液や唾液分泌促進薬の服用などがあげられるが、腺組織障害の著しい重症例では、必ずしも奏功するとは限らず、再生医療を始めとしたより根本的な治療法の開発が課題となっている。

現在の再生医療で使用されている細胞ソースとしては、ES細胞・iPS細胞・成体幹細胞・間葉系幹細胞があるが、ES細胞やiPS細胞は未分化な状態を経由することによる腫瘍化のリスクがあり、生体幹細胞や間葉系幹細胞では唾液腺などの臓器を再生するのに十分な細胞数の確保が困難であるといった問題点を抱えている。そこで我々はダイレクトリプログラミングという線維芽細胞を細胞ソースとした技術に着目した。ダイレクトリプログラミングを用いた場合、線維芽細胞という終末細胞から未分化細胞を経由することなく異なる終末細胞へ誘導を行うため、未分化細胞の混入がなく腫瘍化のリスクが極めて低いと考えられる。また線維芽細胞は細胞数の確保が容易であり、臓器再生へ必要な細胞数を確保できるものと期待される。

臓器再生へのダイレクトリプログラミングの応用例として、マウス線維芽細胞から肝細胞、心筋細胞、神経系細胞への分化誘導が可能であることが報告されている。しかし唾液腺への分化転換技術は報告されていない。

M.Kurita らによってダイレクトリプログラミングを用いたマウス線維芽細胞から皮膚上皮への分化誘導法が報告された(M. Kurita, Nature, 2018)。その報告によるとチャンバーを用いてマウスの隔離した背部の皮膚潰瘍に TP63/TFAP2a/ cMYC/GRHL2 という4種の転写因子をウイルスで感染させると潰瘍部に線維芽細胞由来の上皮組織が再生され、再生過程の上皮組織は免疫染色の結果より口腔粘膜に類似していた。また、当研究室ではマウス ES 細胞 口腔粘膜 唾液腺という段階的な唾液腺の誘導方法を確認し、口腔粘膜から唾液腺への誘導に Sox9/Foxc1 という2種の転写因子が重要であることを明らかにした(J. Tanaka, Nature communications, 2018)。これらの報告を参考にし、6種類の転写因子を用いてマウス線維芽細胞から唾液腺への誘導が可能なのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ダイレクトリプログラミングを用いてマウス線維芽細胞から唾液腺への誘導法を確立することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 線維芽細胞由来唾液腺の作出モデル

マウス胎児線維芽細胞(MEF)に TP63/TFAP2a/ cMYC/GRHL2 を導入して口腔粘膜上皮を誘導し、口腔粘膜上皮に Sox9、Foxc1 を導入して唾液腺を誘導する方法(段階的誘導)、MEF に TP63/TFAP2a/ cMYC/GRHL2/ Sox9/Foxc1 を同時に導入して唾液腺を誘導する方法(直接的誘導)を検討した。(図1)

#### (2) MEF の単離培養

8週齢のマウスを頸椎脱臼により屠殺し、尾部の真皮を機械的に除去した。さらにメスにて細断し、I型コラーゲンコートディッシュ上で10%FBS含有DMEMにて培養した。

#### (3) MEF への遺伝子導入

MEF にレトロウイルスを用いて TP63/TFAP2a/ cMYC/GRHL2 を導入した。濃縮したウイルス液を用いて3回感染させることによって、約90%の細胞に感染が認められた。

#### (4) MEF 由来口腔粘膜上皮細胞の作出

遺伝子導入した MEF を平面培養法ないし気相液相界面培養法(液相4日間、気相7日間)にて培養した。細胞形態の変化を観察し、RT-PCR と免疫染色を用いて MEF 由来上皮細胞の性質を評価した。また MEF 由来細胞のケラチン発現パターンを皮膚上皮と口腔粘膜上皮(硬口蓋部、口底部)のケラチン発現パターンと比較し、MEF 由来細胞はどの部位の重層扁平上皮に類似した性質を示すのかを検討した。

#### (5) MEF 由来口腔粘膜上皮細胞からの唾液腺への誘導

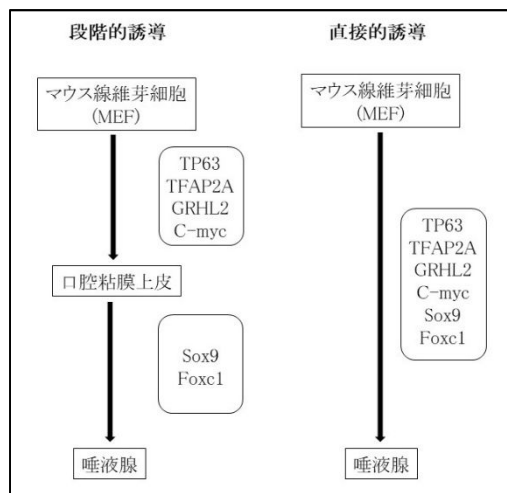


図1:線維芽細胞由来唾液腺の作出モデル

MEF 由来口腔粘膜上皮細胞に唾液腺成熟に必要な因子である FGF7/FGF10 を入れてオルガノイド培地を用い3次元培養を行った。培養中にプランチングが認められたため、免疫染色を用いプランチング部の細胞集団の性質を評価した。

(6)直接的誘導を用いた MEF 由来上皮細胞の作出

TP63/TFAP2a/ cMYC/GRHL2/Sox9/Foxc1 の6因子を導入した MEF を平面培養法ないし気相液相界面培養法で培養した。細胞形態の変化を観察し、RT-PCR と免疫染色を用いて MEF 由来上皮細胞の性質を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 段階的誘導

MEF 由来口腔粘膜上皮細胞の作出(図2)

平面培養では培養7日目、敷石状の形態をとる細胞集団を認めた。RT-PCR では上皮マーカーである E-cadherin、基底細胞マーカーである CK5、表層細胞マーカーである CK14 の発現を認めた。免疫染色では上皮マーカーである Pan-CK、E-cadherin、CK5 の陽性像を認めた。BrdU 染色より、ほとんどの細胞が増殖期の細胞であった。

この MEF 由来上皮細胞を用いた気相液相界面培養では培養12日目、重層扁平上皮様の形態をとる組織構築が認められた。免疫染色では基底細胞マーカーである CK5、角化細胞マーカーである CK10、粘膜上皮マーカーである CK13 の陽性像を認めた。このケラチン発現パターンは皮膚上皮と異なるものであり、マウス各種口腔粘膜と比較したところ硬口蓋部の口腔粘膜上皮に類似したものであった(図3)。以上より、4種類の転写因子を導入した MEF 由来上皮細胞から構築した組織は硬口蓋部の口腔粘膜上皮様のタンパク発現パターンを示すことが明らかになった。

MEF 由来口腔粘膜上皮様細胞から唾液腺への誘導

MEF 由来口腔粘膜上皮様細胞に FGF7/FGF10 を添加して培養すると、培養22日目にプランチングが認められた。しかしプランチング部の細胞集団は基底細胞マーカーである CK5 陽性を示し、腺上皮マーカーである AQP5 の発現は認められなかった。

##### (2)直接的誘導(図4)

MEF に TP63/TFAP2a/ cMYC/GRHL2/ Sox9/Foxc1 の6因子を同時に導入し唾液腺への分化を目指す方法を検討した。6因子を同時に導入した MEF は、平面培養では敷石状の細胞集団が認められ、RT-PCR にて CK5、CK14、CK18、CK19 の発現を認めた。また免疫染色では腺上皮マーカーである AQP5 と CK18 の発現が認められた。以上より、6種類の転写因子を導入した MEF 由来細胞は腺上皮様のタンパク発現パターンを示すことが明らかになった。

MEF 由来口腔粘膜上皮様細胞および MEF 由来腺上皮様細胞からの唾液腺分化および成熟方法について、今後も検討を継続する予定である。

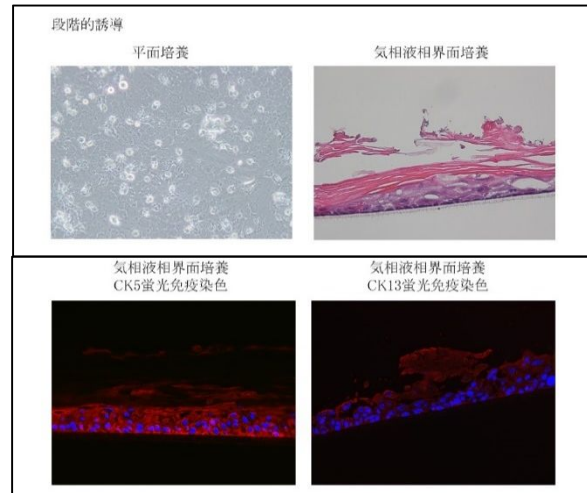


図2:MEF 由来上皮細胞の性質(段階的誘導)

	口腔粘膜 (硬口蓋)	口腔粘膜 (口底)	皮膚	MEF由来 上皮
CK5	+	+	+	+
CK10	+	-	+	+
CK13	+	+	-	+
CK14	+	+	+	+

図3:MEF 由来上皮細胞と口腔粘膜・皮膚のケラチン発現パターン

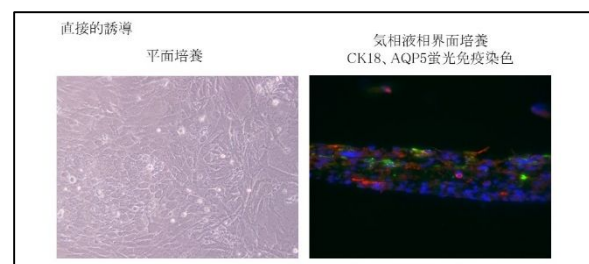


図4:MEF 由来腺上皮細胞の性質(直接的誘導)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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