

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10093

研究課題名（和文）唾液腺の起源に基づく機能的唾液腺再生への試み

研究課題名（英文）An Attempt at Functional Salivary Gland Regeneration Based on the Origin of the Salivary Gland

研究代表者

皆木 瞳（Minagi, Hitomi）

岡山大学・医歯薬学総合研究科・特別研究員（RPD）

研究者番号：70754810

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：研究活動を開始してから一貫して外分泌腺の分泌障害に対する再生研究に取り組んできた。唾液腺再生を目指して発生過程の分子メカニズムを明らかにすることを研究の目的とする。細胞の運命は胚発生初期にまず外胚葉、内胚葉、中胚葉に分かれ、その後それぞれ、神経系や内臓、骨などに順次分化して行く過程に注目し、検討を行ってきた。本研究課題を通して、唾液腺や涙腺など外分泌腺の外胚葉、内胚葉、中胚葉のすべてに胚葉由来をもつということを明らかにした。さらに外分泌腺上皮には神経堤由来の上皮が存在し、それらが組織損傷に寄与するというを示した。本研究課題については2023年に学術論文として報告を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請書は、器官の再生医療を実現させるため、唾液腺形成の遺伝子発現と分子機構を解析してきた。特に唾液腺の分泌障害である口腔乾燥症をターゲットにしている。我々の身体は、全身の臓器同士がコミュニケーションで恒常性が保たれている。しかしながら唾液腺発生の起源は明らかとなっていないおらず、唾液腺疾患の病態において、その再生メカニズムは不明な点が多い。本研究では、唾液腺発生と再生の実態を最新の網羅的遺伝子解析、分子生物学的・免疫学的研究手法により解明することにより、新たな恒常性維持機構を明らかにするとともに、唾液腺再生の新たな臨床応用を目指す。

研究成果の概要（英文）：The objective of our research is to clarify the molecular mechanisms of the developmental process for the regeneration of salivary glands. Cell fate first divides into ectoderm, endoderm, and mesoderm in early embryogenesis, and then differentiates sequentially into nervous system, internal organs, and bone, respectively. Through this research project, we have shown that all exocrine glands such as salivary and lacrimal glands have germinal origin in the exoderm, endoderm, and mesoderm. Furthermore, we showed that the epithelium of exocrine glands contains neural crest-derived epithelium, which contributes to tissue damage. This research project was reported in a paper in 2023.

研究分野：唾液腺

キーワード：唾液腺 再生 口腔乾燥症

1. 研究開始当初の背景

本研究の目的は唾液腺の起源と発生過程を解明し、粘液腺と漿液腺への誘導まで展開することである。唾液腺発生における報告は数多くあるものの、一貫した知見が得られていない (Vaishali et al. *Semin Cell Dev Biol.* 2014)。唾液腺というのは顎下腺、耳下腺、舌下腺また小唾液腺と多くのバリエーションがあり、組織再生を目指す上でそれぞれの唾液腺ごとの器官形成の全容を解明することが求められている。本研究ではそれら未解決の問題に取り組み、唾液腺の再生に向けた発生生物学に基づいた一貫した基盤づくりを行う。本研究では、第一に唾液腺の発生過程から遡り、三胚葉における由来を明らかにする。そして次に粘液腺と漿液腺が各々に分化するための遺伝子を見つけだし、唾液腺の初期発生機構を解明することで 機能的粘液腺・漿液腺への誘導を行うという計画はより具体的で独自性がある。臓器再生を図る上で発生生物学に基づいた鍵となる遺伝子の解明は必須であるが、唾液腺の臓器ごとの違いに注目した報告はこれまでになく創造性があるため本研究計画によって基礎研究から臨床応用までの一貫した研究の基盤を確立できると考えた。

2. 研究の目的

細胞の運命は胚発生初期にまず外胚葉、内胚葉、中胚葉に分かれ、その後それぞれ、神経系や内臓、骨などに順次分化して行く。通常、これらの胚葉を超えて組織を分化させることは難しいため、細胞の系譜情報は非常に重要である。教科書や多くの文献では、耳下腺は外胚葉由来、顎下腺・舌下腺は内胚葉由来であると考えられてきた。しかしながら近年その由来には疑問が呈されている。まずは唾液腺が発生中の胚のどの細胞に由来するかを探索することを目的とする。

3. 研究の方法

TRiCK (TRiple Coloured germ layer Knock-in) マウスは Sox1、Brachyury、Sox17 にそれぞれ異なる蛍光がついたマウスで、慶応大学で作成された (Serizawa et al, *Development*, 2019)。TRiCK マウスを継時的にサンプリングし、初期発生における細胞系譜を解析する。RIKEN から購入し、成体唾液腺における TRiCK マウスの組織解析を進めた。

・TRiCK マウスを用いた三胚葉由来の解析

外胚葉由来細胞系譜に対して Sox1 遺伝子、内胚葉由来細胞系譜に対して Sox17 遺伝子をそれぞれ発生時に組織全体で発現することを利用し TRiCK マウスの cell lineage 解析を行う。細胞の系譜と分布をそれぞれ解析することで唾液腺が発生中の胚のどの細胞から作られるかを明らかにする。また TRiCK マウスは中胚葉マーカーである Brachyury も mCherry で蛍光標識されているため中胚葉由来細胞の機能解析も同時に行う。さらに胎仔唾液腺を摘出し、蛍光のタイムラプス動画を数理的に解析することで顎下腺、舌下腺、耳下腺、また涙腺の外分泌腺の組織毎の形態形成の違いを明らかにする。

・外胚葉・内胚葉由来細胞系譜の追跡を目的とした組織解析

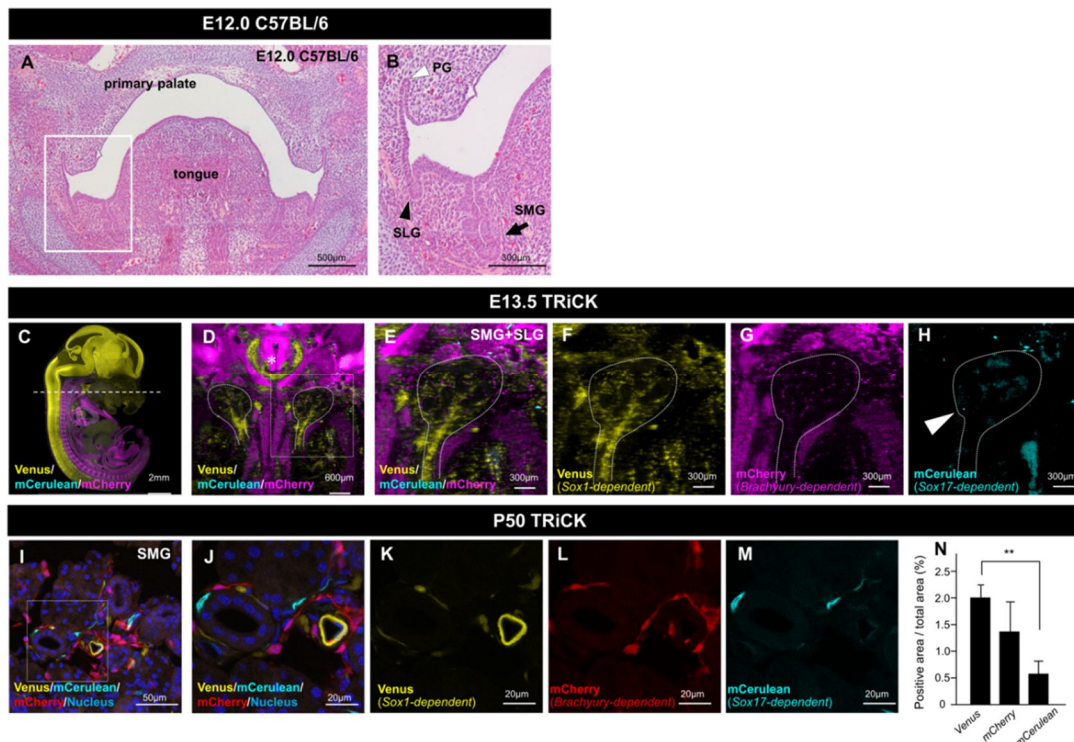
摘出したマウス胚は、組織透明化技術を用いた唾液腺組織評価および免疫組織染色で構造解析を行う。Sox1 は神経外胚葉のマーカー遺伝子であるため、表皮外胚葉のマーカーである Keratin5 の染色も同時に行うことで外胚葉、内胚葉の由来細胞系譜を明らかにしていく。胎生期も含め順次サンプル数を増やしてより詳細な解析を行う。

4. 研究成果

TRiCK マウスは、遺伝子 Sox1、T/Brachyury と Sox17 (3つの胚葉の各々のための代表的な標識遺伝子) のために蛍光タンパク質を表します。

このアプローチを通して、唾液で涙の腺の細胞血統は、調べました。調査結果は、唾液で涙の腺が全3つの胚葉に由来する細胞を含むことをはっきりと証明できると考えました。

TRiCK マウスを用いることで唾液腺と涙腺のどちらも 3 つの胚葉の各々に彼らの発達上の起源があることを持っていることが分かりました。さらに個体差があり、初期の起源は均一でないことが分かりました。



TRiCK マウスの蛍光性に標識化された唾液腺。

(A, B) 正面の断片の組織構造 (H&E 染色) は、胎生 12.0 日目で C57BL/6 匹のマウス、スケール・バー: 500µm(A)、300µm(B)。 (C) E13.5 の TRiCK 胚の矢状セクションでは、全 3 つの胚葉に由来する 3 胚葉由来各自の同時のラベルを示した。

Sox12A-CreΔPuro は、ビーナス(黄色の)をドライブしており、T/Brachyury2A-DreΔPuro は、mCherry (マゼンタ) そして、Sox172A-phiC31oΔPuro は、mCerulean (シアン) をドライブしています。スケール・バー: 2mm. (D) SMG と SLG の前頭断。点線は、左右の SMG と SLG の様子を示します。スケール・バー: 600µm。 (E-H) (D) の拡大イメージ。スケール・バー: 300µm。 (I-M) P50 TRiCK マウス SMG の凍結切片に、DAPI で共染色をおこなったものスケール・バー: 50µm(I)、20µm (J-M)。 (N) 成体マウスの唾液腺の各々の陽性細胞のパーセンテージを示す。エラー・バーは、標準偏差を示します。n=5、* p<0.05。

さらに、興味深いことにこれらの外分泌腺は神経堤から派生した上皮細胞が発生している組織があると考えられました。また TRiCK マウスに対して、導管結紮と穴あけパンチモデルで損傷を加えたところ、損傷が加わった領域には神経堤由来細胞の増加が見られた。それは組織の損傷再生の一助になると考えられました。

このように、この研究は、外分泌腺の胚の起源と組織の損傷の後の再生反応への腺上皮の中の神経冠から派生した細胞の貢献に関して動かぬ証拠を提供すること成功しました。

本研究は The Germinal Origin of Salivary and Lacrimal Glands and the Contributions of Neural Crest Cell-Derived Epithelium to Tissue Regeneration. という題名で Int J Mol Sci. 誌に 2023 年の 9 月に報告した。(doi:10.3390/ijms241813692) また、The embryonic origins of exocrine Glands and the role neural crest-derived epithelium in tissue regeneration. という題名で 2024 年 3 月に米国 New Orleans 開催された International Association for Dental Research 学会にてポスター発表を行った。共著者は以下の通り。 Tsutomu Nohno, Takashi Serizawa, Yu Usami, Takayoshi Sakai, Hideyuki Okano, John A Chiorini and Hideyo Ohuchi

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Ono-Minagi Hitomi, Gojo Nao, Nohno Tsutomu, Inoue Tsuyoshi, Ohuchi Hideyo, Sakai Takayoshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Evaluation of oral care using MA-T gel for high-risk patients: a pilot study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Oral Health	6. 最初と最後の頁 108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12903-023-02779-5	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 Minagi Hitomi Ono, Yamanaka Yoshie, Nohara Kanji, Ikai Kazuki, Sakai Takayoshi	4. 巻 26
2. 論文標題 Analysis of medication-induced xerostomia in elderly Japanese patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Oral Investigations	6. 最初と最後の頁 2021～2029
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00784-021-04182-2	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 皆木 瞳
2. 発表標題 口腔乾燥症の層別化に基づく新たな治療戦略
3. 学会等名 日本唾液腺学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hitomi Ono-Minagi, Tsutomu Nohno, Takayoshi Sakai, Hideyo Ohuchi
2. 発表標題 Predictor of Sjogren's syndrome severity by spatial analysis of labial glands
3. 学会等名 Gordon research conference（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 皆木 瞳、大内 淑代、阪井 丘芳
2. 発表標題 非シェーグレン症候群患者におけるサクゾンテストの有効性の検討
3. 学会等名 日本口腔科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 皆木 瞳、宇佐美 悠、酒井 学、井階一樹、大内 淑代、阪井 丘芳
2. 発表標題 唾液腺組織の再生過程は発生過程を模倣しているか？
3. 学会等名 日本口腔科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 皆木 瞳、山中 賀恵、野原 幹司、大内 淑代、阪井 丘芳
2. 発表標題 高齢者の服薬と口腔乾燥症の実態解明-治療法の確立を目指して-
3. 学会等名 日本唾液腺学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 皆木 瞳、山中恵賀、大内淑代、 阪井丘芳
2. 発表標題 サクゾンテストはすべての患者で有効か -非シェーグレン症候群患者における調査-
3. 学会等名 日本老年歯科医学会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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