

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16945

研究課題名（和文）網羅的遺伝子解析と不死化筋上皮細胞で挑む唾液腺腫瘍性筋上皮細胞の分化機序

研究課題名（英文）Differentiation mechanism of salivary gland neoplastic myoepithelial cells challenged by comprehensive genetic analysis and immortalized myoepithelial cells

研究代表者

松宮 由香（Matsumiya, Yuka）

大阪大学・歯学部附属病院・助教

研究者番号：80817023

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：唾液腺多形腺腫（以下 PA）における、腫瘍性筋上皮細胞の分化機序の解明を目指した。トロンボスポンジン（THBS）遺伝子ファミリーの中でも、THBS-1 / 2 は、腫瘍発生や腫瘍免疫に関連していることが報告されている。本研究で、これらはPAにおいて、正常組織に比し、RNA発現が上昇していることがわかった。また、THBS1、THBS2のタンパク発現は、正常唾液腺では、導管上皮のみで発現していたのに対し、PAでは腫瘍性筋上皮細胞と間葉組織細胞に発現していることがわかった。以上より、PAの腫瘍性筋上皮細胞の発生や間葉組織の分化機序にTHBS-1 と THBS-2が関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唾液腺腫瘍の中で、多形腺腫は最も多く発生し、被膜内浸潤による再発性の高さや悪性変化することも知られている。組織学的に多形腺腫は、腺管を形成する腺管上皮と、その周囲に広がる筋上皮細胞（腫瘍性筋上皮細胞）からなる上皮系組織と、多様な間葉組織から構成され多彩な組織像が、同一腫瘍内に見られる。間葉組織には、腫瘍性筋上皮細胞から分化すると考えられている。しかしながら、腫瘍性筋上皮細胞がなぜ、どのような機序で、多彩な分化を示すのかは不明である。唾液腺多形腺腫の発生・分化について知ることは、多形腺腫の病態制御に寄与するだけでなく、希少とされる唾液腺腫瘍研究へつながる共通した知見が得られるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We aimed to elucidate the differentiation mechanism of neoplastic myoepithelial cells in salivary gland pleomorphic adenoma (PA). Among the thrombospondin (THBS) gene family, THBS-1/2 has been reported to be associated with tumor development and tumor immunity. In this study, we found that these RNA expressions were increased in PA compared to normal salivary gland tissues. Furthermore, in normal salivary glands, THBS1 and THBS2 proteins were expressed only in the ductal epithelium, whereas in PA, they were found to be expressed in neoplastic myoepithelial cells and mesenchymal tissue cells. These results suggest that THBS-1 and THBS-2 may be involved in the development of neoplastic myoepithelial cells and the differentiation mechanism of mesenchymal tissue in PA.

研究分野：口腔外科学

キーワード：多形腺腫 唾液腺

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多形腺腫(pleomorphic adenoma)は、全唾液腺腫瘍のなかで最も頻度の高い良性腫瘍である。組織学的に、上皮成分と間葉成分が混在する腫瘍で、腺管成分に加え、腫瘍性筋上皮細胞の密な増殖巣(シート状増殖)、粘液腫様基質の産生(粘液腫様成分)、軟骨様基質の産生、基質の硝子化(硝子化基質)から脂肪細胞分化、骨基質の産生といった極めて多彩な組織像が、種々の比率で入り混じり腫瘍を形成している。本腫瘍の、多彩な間葉成分は、腫瘍性筋上皮および、その産生物により形成されると考えられているが、その詳細な分子背景や分化機序は不明である

そこで、本研究では、形態に基づく多彩な分化領域をもつ多形腺腫の網羅的遺伝子解析と不死化筋上皮細胞株の樹立、不死化筋上皮細胞株を用いた多分化機序の解明を目指した。

2. 研究の目的

本研究は、「腫瘍性筋上皮細胞が、なぜ、どのようにして多彩な分化を示すのか?」を学術的な「問い」として、形態に基づく多彩な分化領域の網羅的遺伝子解析と不死化筋上皮細胞株の樹立、不死化筋上皮細胞株を用いた多分化機序の解明を通じて、多形腺腫における多彩な組織分化メカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 多様な分化を示す多形腺腫組織の網羅的遺伝子解析 (RNA-Seq)

本研究では、病理組織学的に多形腺腫と診断されたホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織を用いた。多様な分化を示す標本を抽出し、腫瘍 6 例、正常唾液腺 3 例を検体とした。

腫瘍組織の部位は耳下腺、顎下腺、小唾液腺由来のものとし、形態学的に間葉組織に粘液腫様組織、硝子様組織、軟骨様組織を形成している症例と筋上皮を主体とする症例を含めた。正常唾液腺組織は顎下腺由来を用いた。

上記組織より RNA を抽出し、RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を行った。

(2) THBS-1/2、TGF β のタンパク発現の評価 (免疫組織学的染色)

THBS は文献にて正常唾液腺の導管上皮に発現していることが報告されているが、腫瘍組織にて RNA 発現が上昇していることから多形腺腫でのタンパク発現の有無と局在について確認するために、免疫組織化学的に評価を行った。

特に、多形腺腫において筋上成分と間葉組織成分での発現について検討した。

(3) マウス唾液腺細胞の分離培養

筋上皮細胞株の樹立を目標に、まずは、器官培養から開始した。胎生 14.5 日にて胎児顎下腺を摘出し、器官培養を施行した。また、胎生 16.5 日で顎下腺を摘出し、コラゲナーゼにて単細胞単位まで分離し培養を行った。

4. 研究成果

(1) 多形腺腫の網羅的遺伝子解析

RNA-seq により正常唾液腺に比し、多形腺腫では、HTN や CST、MUC など、唾液中に分泌される因子は有意に発現が抑制されていることがわかった (図 1) の発現上昇を認めた。

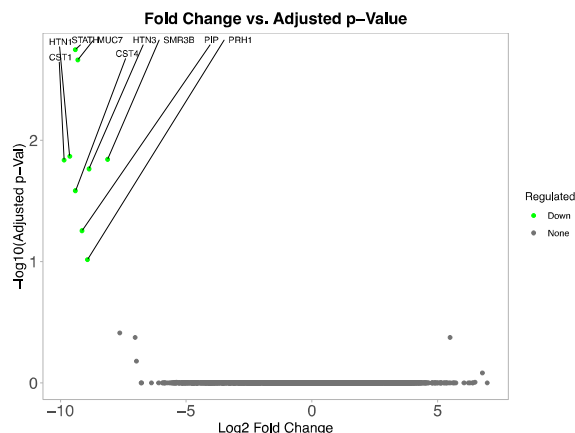


図 1 Volcano plot PA vs 正常唾液腺

RNA seq 解析データの中で、THBS ファミリーと TGF に着目した。多形腺腫群と正常群を比較したところ、THBS1 は fold change 5.716、THBS2 は 4.872、THBS3 は 21.370 で、多形腺腫での発現上昇を認めた。

(2) THBS、TGFb の発現評価

THBS-1/2 と TGF 3 のタンパク発現を免疫組織科学的に評価したところ、正常唾液腺では、これら 3 因子ともに、道管上皮で発現を認めた。一方で、PA では THBS-1/2 は腫瘍性筋上皮細胞と間葉組織細胞での発現を認めた。TGF 3 の発現は PA では認めなかった(図 2)。

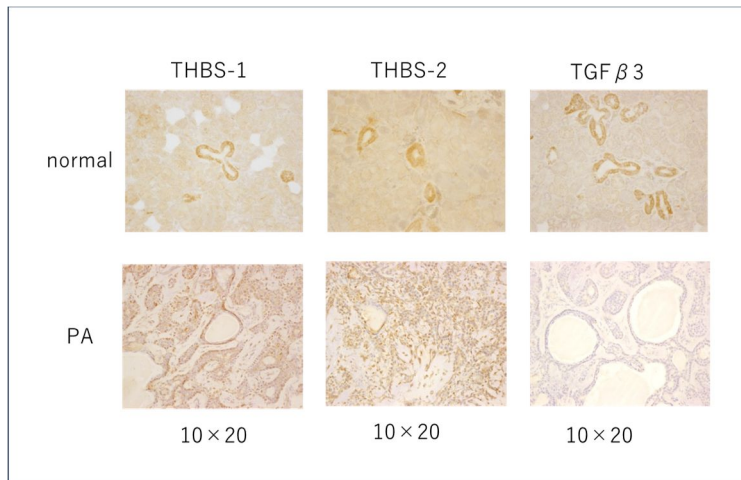


図 2 正常唾液腺組織と PA 組織における THBS、TGFb の発現

(3) マウス唾液腺 器官培養と細胞分離培養

マウス顎下腺器官培養

胎生 14.5 日にて胎児顎下腺を摘出し、器官培養を施行したところ、培養開始 4 日目には、腺房部 end bud の安定した発達を確認した(図 3)。

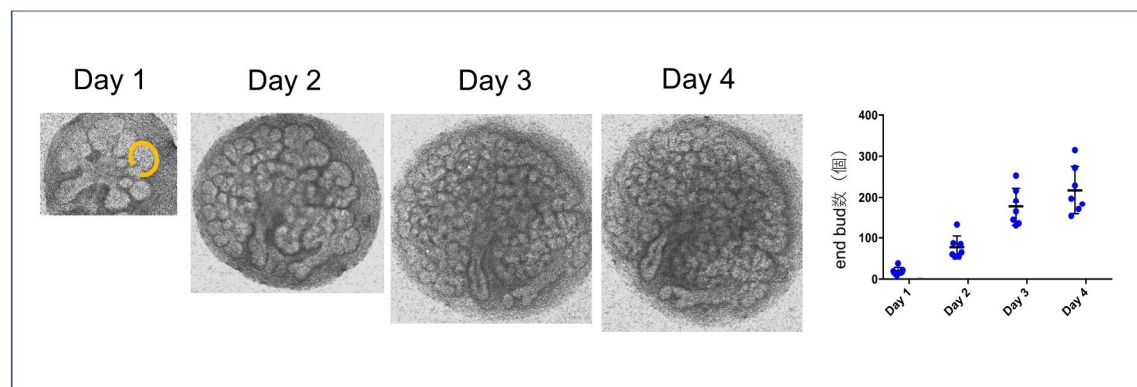
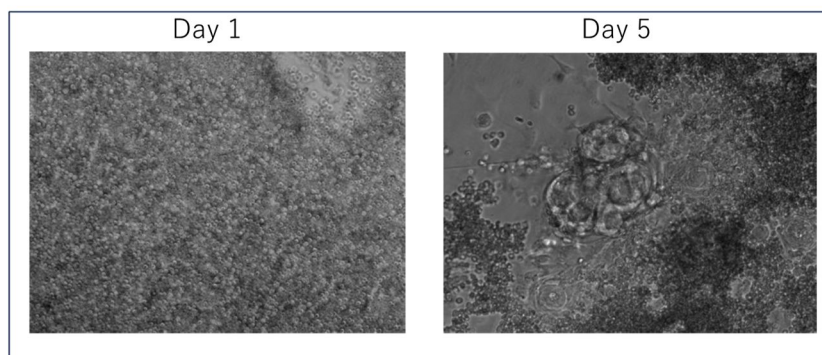


図 3 マウス顎下腺器官培養

マウス顎下腺細胞培養



胎生 16.5 日で顎下腺を摘出し、コラゲナーゼにて単細胞単位まで分離し培養を行った。培養開始 5 日後にオルガノイド様の細胞集塊が出現した(図 4)。

図 4 顎下腺細胞培養

PA において、腫瘍性筋上皮細胞から間葉組織への分化において THBS を介した作用が関与している可能性が示唆された。本研究ではマウス顎下腺組織、細胞の単離培養は実現した。今後、腫瘍性筋上皮細胞の分離培養を進め、THBS を開始した腫瘍性筋上皮細胞の分化機序についてさらなる解明を目指していく予定である。

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 0件）

1. 著者名 Matsumiya-Matsumoto Yuka、Morita Yoshihiro、Uzawa Narikazu	4. 巻 11
2. 論文標題 Pleomorphic Adenoma of the Salivary Glands and Epithelial-Mesenchymal Transition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 4210～4210
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm11144210	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1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 寺本朱里、松宮由香
2. 発表標題 線維芽細胞におけるヘパラン硫酸鎖は唾液腺の発生と再生に関与する
3. 学会等名 日本口腔科学会近畿地方会 2023/12/9
4. 発表年 2023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
---------	---------