

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22792084

研究課題名(和文) 唾液腺幹細胞と iPS 細胞を用いた唾液分泌障害に関する病因因子の解明

研究課題名(英文) Factors for secretion disorder of salivary gland with mouse salivary gland progenitor cell and iPS cell

研究代表者

峯柴 淳二 (MINESHIBA JUNJI)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：00509383

研究成果の概要(和文)：唾液腺前駆細胞である CD49f 陽性細胞が産生する唾液腺の再生に及ぼす可能性のある因子を見つけ出した。CD49f 陽性細胞は *Inhba* と *Inhbb* が発現し、*Inha* が発現していないので *Activin A, AB, B* を構成している可能性がある。また、*Follistatin* の mRNA が発現している。これは、*Activin-Follistatin* の相互作用が唾液腺の修復や再生に関与する可能性があることを示す。

研究成果の概要(英文)：We found that the extracellular humoral factors secreted by CD49f-positive cells would be potential progenitor cells related to regeneration of salivary glands.

Inhibin β_A , Inhibin β_B , and Follistatin may relate to the proliferation of progenitor cells in salivary glands.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：唾液腺分泌障害, 唾液腺幹細胞

1. 研究開始当初の背景

現在の日本は急速に高齢化が進んでいる。この社会現象の中、高齢者に頻発する疾患を無視するわけにはいかない。とりわけ、歯科界で深刻な問題となる唾液の分泌障害もそのうちのひとつである。唾液の分泌障害は、歯周病やう蝕の発症

および進行に深くかかわっている。

ところが、唾液腺は肝臓のように自身の再生が不可能であり、一度破壊されればその機能は失われていくこととなる。現在、多くの研究者が失われた機能を回復しようと、遺伝子治療による機能回復や、分化した唾液腺細胞を用いて体外で人工唾液腺を作製する研究など

が試みられているが、唾液腺機能の完全回復には至っていない。

そこで、私はこの自己再生不可能な唾液腺から再生能力を持つ細胞である幹細胞、もしくは唾液腺細胞の前駆細胞を採取し、万能細胞である iPS 細胞と共培養することにより iPS 細胞の機能的分化を促し、それに関わる因子を探し出すことが失われた機能の回復の近道となるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、なぜ加齢にともない唾液腺機能は減弱し、唾液の分泌量が減少するのかを、唾液腺に存在する幹細胞と iPS 細胞を用いて細胞の機能的分化に関わる因子を見つけ、これを用いて失われた機能を回復させることを目的としたものである。

3. 研究の方法

- (1) オスのマウスの唾液腺を摘出し、組織小片に刻み、酵素溶液中で個々の細胞に分離する。分離された細胞を100 mm細胞培養用デッシュに播種し、1週間培養する。ここで形成されたコロニーをトリプシン-EDTAではがし、幼弱上皮細胞において高頻度に発現する表面抗原 (CD49f) で特異的に抽出する。低カルシウム培地で培養する。
- (2) 分離培養した細胞を高カルシウム培地で培養し、分化を誘導する。この分化誘導後の細胞を間葉系細胞のマーカーであるVimentinと上皮系細胞のマーカーであるPan-Cytokeratinで免疫染色し、分離した細胞の性状を確認する。
- (3) 先に採取したマウス唾液腺幹細胞とマウスiPS細胞を、フィルターによって隔離された一つのウェルのそれぞれの培養区域に播種する。この状態で数日培養し細胞の性状を比較、観察する。この際、コントロールとしてマウス線維芽細胞とマウス唾液腺幹細胞、マウス線維芽細胞とマウスiPS細胞を用いて同様に比較、観察する。
- (4) マウス唾液腺前駆細胞とマウス iPS 細胞の共培養、およびコントロールの共培養をおこなった

細胞内から RNA を抽出し、QPCR で発現量の大きく異なる mRNA を選び出す。

この結果 iPS 細胞において、非角化扁平上皮細胞と、増殖期の扁平上皮細胞に発現する Cytokeratin 6a の mRNA 発現量は増加した。さらに、腺房・導管細胞に発現する Claudin 3 の mRNA は、CD49f⁺細胞と共培養していない対照と比較すると発現量を維持した。以上のことまではわかったが、分化に関与する因子の解明の糸口にはならない。そこで我々は、唾液腺前駆細胞の可能性のある CD49f 陽性マウス顎下腺上皮細胞 (CD49f 陽性細胞) の産生する細胞外液性因子が、唾液腺の再生に関与しているのではないかと考え、少し戻って研究を行うこととした。まず、CD49f 陽性細胞が産生する細胞外液性因子を網羅的に解析し、その中で唾液腺の再生に及ぼす可能性のある因子の見つけ出すことを目的に立て直した。

- (5) C57BL/6 マウス (雄性 5 週齢) から顎下腺を採取し、酵素処理の後に磁気ビーズ法を用いて、CD49f 陽性細胞を分離した。CD49f 発現細胞の割合をフローサイトメーターで測定し、分離の確認を行った。分離後の CD49f 陽性細胞と CD49f 陰性マウス顎下腺上皮細胞 (CD49f 陰性細胞) の形態と増殖速度の評価を行った。
- (6) 分離した直後の CD49f 陽性細胞と CD49f 陰性細胞から Total RNA を抽出し、Mouse Growth Factors RT² Profiler[™] PCR Array を用いて、成長因子に関する mRNA の両者の違いを網羅的に解析した。
- (7) CD49f 陽性細胞と CD49f 陰性細胞において、2 で得られた結果をもとに、両者、あるいはどちらか一方の mRNA の発現量の極端に少ないものを除外して、残った候補について定量 RT-PCR 法を用いて mRNA 発現量の差の確認を行った。
- (8) CD49f 陽性細胞と CD49f 陰性細胞において、*inhibin β_B* (*inhbb*), *inhibin β_A* (*inhba*), *inhibin α*

(*inha*), *follistatin* の発現量を定量 RT-PCR 法を用いて比較検討した。

- (9) CD49f 陽性細胞と CD49f 陰性細胞において, (7) で得られた結果をもとに, 両者, あるいはどちらか一方の mRNA の発現量の極端に少ないものを除外して, 残った候補について定量 RT-PCR 法を用いて mRNA 発現量の差の確認を行った。
- (10) CD49f 陽性細胞と CD49f 陰性細胞において, Inhibin β_A (*Inhba*), Inhibin β_B (*Inhbb*), *Follistatin* に関して, ウェスタンブロット法を用いてそれぞれのタンパク発現量の比較検討を行った。

(岡山大学大学院医歯薬学総合
研究科動物実験承認: OKU-2012375)

4. 研究成果

- (1) CD49f⁺細胞を種々に分化した iPS 細胞と共培養を行うと, 中間まで分化した iPS 細胞において, 非角化扁平上皮細胞と増殖期の扁平上皮細胞に発現する Cytokeratin 6a の mRNA 発現量は増加した。さらに, 腺房・導管細胞に発現する Claudin 3 の mRNA は, CD49f⁺細胞と共培養していない対照と比較すると発現量を維持した。しかし, ME と DE に分化した iPS 細胞では, CD49f⁺細胞と共培養していない対照と比較して変化がなかった。
- (2) 分離後の CD49f 陽性細胞数は, 総細胞数の約 10 % 存在していた。また, その細胞群は同時に内在性ラミニンを発現していた。CD49f 陽性細胞の培養上での形態は小型の紡錘形で, それが凝集したコロニーを形成した。一方, CD49f 陰性細胞は培養皿への付着に乏しく, 形成したコロニーの増殖速度は CD49f 陽性細胞に比べて遅かった。
- (3) CD49f 陽性細胞と CD49f 陰性細胞を比較すると, mRNA 発現量に 2 倍以上差のある成長因子は 46 種

類あった。その中で, CD49f 陽性細胞と CD49f 陰性細胞のどちらか一方の Threshold Cycle が 30 以上のものを除外し, 11 種類の候補に絞った。

- (4) 2 で挙げた 11 種類の候補のうち *inhbb* の mRNA の発現量は, CD49f 陽性細胞の方が CD49f 陰性細胞に比べ有意に多かった。
- (5) *inhbb* に関連する *inhba*, *follistatin* の mRNA の発現量は, CD49f 陽性細胞の方が CD49f 陰性細胞に比べ有意に多かった。一方, *inha* の発現量に有意な差はなかった。
- (6) *Inhba*, *Inhbb* のタンパクの発現は CD49f 陽性細胞の方が CD49f 陰性細胞に比べ多かったものの, 両者に *Follistatin* の発現はなかった。

肝臓再生と Activin-Follistatin 相互作用の関係は, 肝臓の部分切除を行うと Activin の発現が急速に低下し, 24 時間後に増加するという報告や, 正常肝に *Follistatin* を投与すると DNA の合成が促進され肝重量が増加するという報告, 90 % 部分切除を行った肝臓に *Follistatin* を投与すると, 再生率が有意に高くなるという報告で示されている。このように, 自己再生能力の高い肝臓では, Activin-Follistatin 相互作用がその能力に大きく関与していることが考えられる。また肝臓の他, 膵臓や腎臓でも分子形態形成時における Activin-Follistatin の相互作用の重要性が報告されている。障害を与えた腎臓では Activin の発現が著明に増加し, さらに *Follistatin* の投与で腎機能, 組織所見の改善があったという報告がある。これは, 肝臓だけでなく腎臓でも Activin-Follistatin の相互作用が再生や修復に関与していることを示唆している。

これらの報告は, 今回の結果と酷似していることから, この仕組みが唾液腺の再生に大きく関わっていることは必至である。しかし, 現在このような報告はない。この観点から, 本研究は唾液腺再生に大きなインパクトを与える。しかし, 自己再生能力を有しない唾液腺なので, これだけが関与しているとは言い難い。したがって, これに加えて, もう少し他の因子を探していく必要がある。

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)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 峯柴 淳二、唾液腺の機能的再生は可能か?、第 1 回先端医学研究会 at OU、2013年03月30日、岡山県岡山市
- ② A. IKEDA, (J. MINESHIBA), Salivary Gland Progenitor Cells Express Inhibin β A, and Inhibin β B, The 91st International Association for Dental Research, 2013年03月22日, Seattle, USA
- ③ 峯柴 淳二、iPS細胞を使って唾液腺再生の鍵となる因子を探す、岡山大学サイエンスカフェ「iPS細胞の原理と将来」、2013年02月04日、岡山県岡山市
- ④ 峯柴 淳二、抗菌ペプチド遺伝子の唾液腺への導入による口腔感染予防、第22回日本歯科医学会総会、2012年11月10日、大阪府大阪市
- ⑤ 池田淳史、(峯柴淳二、マウス顎下腺上皮細胞の細胞外液性因子がiPS細胞に与える影響、第 136 回日本歯科保存学会春季学術大会、2012年06月29日、沖縄県宜野湾市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

峯柴 淳二 (MINESHIBA JUNJI)
岡山大学・岡山大学病院・講師
研究者番号 : 00509383

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし