

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659899

研究課題名(和文)唾液腺組織由来スフェロイド(STOS)を用いた唾液腺再生法の開発

研究課題名(英文) Establishment of salivary gland regeneration method using salivary gland tissue-originated spheroid (STOS)

研究代表者

杉浦 剛 (Sugiura, Tsuyoshi)

九州大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40322292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：胎生期の組織を用いた研究は、組織再生のメカニズムを知る手がかりとなる。我々は、胎生期組織から細胞を分離し、*in vitro* で再構成させるモデルを開発し、組織学的に観察した。胎齢 13.5 日の胎仔マウスより顎下腺を摘出し、単一分離した細胞を高濃度で I 型コラーゲンゲルやマトリゲル中に滴下しフィルター上で培養したところ、細胞塊より分枝形成、続いて管腔形成が観察できた。単一化細胞を腎被膜下に移植しても細胞塊は組織構築を示した。この培養系では、胎生期の顎下腺細胞はその構造を再構築する機能を持ち、胎生期の唾液腺分化過程をある程度再現できることが示された。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated the regenerative capability of dissociated E13.5 embryonic submandibular gland (SMG) cells *in vitro* in collagen type I gels. The resulting structures were similar to native salivary glands. Large cyst-like structures, probably due to swollen ducts, began to appear on day 7, and they enlarged and increased in number by day 14. Through the addition of fibronectin and an anti-integrin antibody into the regenerate salivary glands, cyst formation and enlargement were clearly inhibited, and the expression and localization of AQP5 was concentrated on the lumen side with cell polarity similar to native salivary glands. In contrast, anti-integrin antibodies induced cyst formation and enlargement. Together, these data indicate that dissociated SMGs can regenerate salivary gland structure, and specific interactions between integrins and extracellular matrices are essential for regenerate salivary gland differentiation and development.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：幹細胞 唾液腺再生

1. 研究開始当初の背景

口腔領域において唾液腺は唾液の分泌を介して咀嚼嚥下・衛生状態の維持・消化機能の補助をになっている重要な腺組織である。シェーグレン症候群における唾液腺の障害や、口腔癌の治療における放射線治療・切除によってその機能は大きく障害を受け、口腔乾燥症状を訴える患者は増加している。しかしながら唾液腺の障害・喪失に対する治療法は非常に限られており、近年登場した塩化セビメリンなどの分泌促進剤も破壊が進んだ唾液腺に対しては十分な効果が得られていない。一方で医療における再生医療の位置づけは年々重要となっており、種々の臓器の再生の試みが報告されているが、唾液腺の再生の試みは遅れていると言わざるを得ない。国内外の報告でも唾液腺の分化・形態形成の検討が中心に行われており、再生を試みた研究も散見するもののいずれも実用に至るものではない。

われわれの研究室ではマウス胎生期の唾液腺より顎下腺を分離し、器官培養法により増殖分化を誘導するテクニック(図1)を用いて唾液腺の形態形成に関わる因子とその機能について検討してきた(Ikari T, Hiraki A, Seki K, Sugiura, T, Matsumoto K, Shirasuna K. Involvement of hepatocyte growth factor in branching morphogenesis of murine salivary gland. Dev Dyn 228: 173-184, 2003)。その結果HGFをはじめとする増殖因子が唾液腺の分枝形成に大きく寄与すること、細胞外基質の存在の重要性を見出した。同様の所見は海外のグループからも報告されている。最新の知見としてマウス胎児より分離した顎下腺原器の細胞は一度単一細胞に分離しても組織の自己再構築を行う能力があることを見出した。この結果はこの方法が確立すれば単一唾液腺細胞から唾液腺を作成することが理論的に可能であることを示唆している。しかしながら、一旦唾液腺様構造を再構築することが

できてもその後の最終分化が困難であった。

近年、ヒト大腸がん組織由来のスフェロイド(Cancer Tissue-Originated Spheroid : CTOS)が、培養、継代可能でヌードマウス皮下に移植するとオリジナルと極めて類似した組織構築をすることが報告された(PNAS, 2011, 108(15), 6235-6240)。この培養法では幹細胞と組織ニッチが共存していると考えられ、正常組織にも応用可能であると考えられている。

2. 研究の目的

そこで本研究では、唾液腺組織由来スフェロイド(Salivary gland Tissue-Originated Spheroid : STOS)を利用した唾液腺の再生医療を視野に入れ、以下のプロジェクトを立案した。

1. 唾液腺原器および成獣マウス唾液腺からのSTOSによる唾液腺再構築のテクニックの確立
2. STOS移植による唾液腺再生の検討
3. 成獣マウス唾液腺障害モデルを用いた唾液腺再生

3. 研究の方法

唾液腺原器および成獣マウス唾液腺のSTOSによる唾液腺再構築の検討

我々はこれまでの検討で胎児マウスの唾液腺原器を酵素分解により単一細胞化し、これを精製細胞外基質中に埋入し、器官培養と同様のテクニックにより培養するとばらばらになった細胞は自ら器官としての細胞配列を再構成することを見出した。これをさらに培養を続けるとほぼ胎生齢と同様の器官発達を認める。しかしながら、腺管構造や腺房の形成などの最終分化には至らない。恐らくこの現象には組織ニッチが適切な部位に配列しないことによるものと考えられる。近年発表された Tissue Originated Spheroid 法は、組織由来の細胞を完全には単

細胞化せず、マイルドな酵素処理により 100 個程度の細胞集団に細胞間接着を維持したまま培養する方法である。癌組織にこの方法を応用すると、マウスにスフェロイドを移植することにより元の組織構築と同等の組織が構築される。

このテクニックをさらに発展させることにより唾液腺構成の責任細胞の存在部位と分化条件を確立する。

4. 研究成果

胎生期の組織を用いた研究は、組織再生のメカニズムを知る手がかりとなる。我々は、胎生期組織から細胞を分離し、*in vitro* で再構成させるモデルを開発し、組織学的に観察した。

胎齢 13.5 日の胎仔マウスより顎下腺を摘出し、単一分離した細胞を高濃度で 1 型コラーゲンゲルやマトリゲル中に滴下しフィルター上で培養したところ、細胞塊より分枝形成、続いて管腔形成が観察できた。組織中の小葉では PAS 染色にて粘液の産生が確認され、免疫組織化学ではアクアポリン 5 の局在を認めたことにより、構造物は正常組織の Terminal Bud Stage 相当まで分化可能であることが示された。また、コラーゲンゲル中にフィブロネクチンを滴下することで、管腔形成は抑制され、分枝形成が促進された。抗インテグリン $\alpha 2$ 中和抗体を添加すると、管腔の空洞化、肥大化が抑制された。一方、抗インテグリン $\alpha 5$ 中和抗体を添加すると、管腔の空洞化、肥大化が抑制された。単一化細胞を腎被膜下に移植しても細胞塊は組織構築を示した。

この培養系では、胎生期の顎下腺細胞はその構造を再構築する機能を持ち、胎生期の唾液腺分化過程をある程度再現できることが示され、この方法は組織再生の過程を考察するのに有効な手段の一つであると考えられた。さらに、細胞外基質蛋白およびその受容体蛋

白の調節が再構築に重要であることから唾液腺幹細胞と間葉系細胞の相互作用の重要性が示唆される。

T-box 転写因子の一つである *Brachyury* が発生段階の中胚葉形成に必須の遺伝子であることは知られている。近年、この遺伝子が発生のさまざまな過程で働く新規の転写制御因子に関与することが明らかになりつつある。脊椎動物の発生過程において、Wnt や TGF β といったシグナル経路を構成する下流遺伝子を制御していることも分かってきた。さらに、*Brachyury* は成熟した組織においては上皮間葉移行、つまり上皮と間葉の形質変化をコントロールする遺伝子であることが知られている。また、癌幹細胞とも関係が深いとされ、癌細胞の浸潤や転移に関与していることで注目されている遺伝子である。

そこで、本研究ではマウス唾液腺初期発生における *Brachyury* の発現動態を明らかにするとともに、器官培養法を用いて顎下腺原基の初期発生における *Brachyury* の役割について検討した。マウス顎下腺は、胎生 11.5 日 (E11.5) 頃より発生を開始し、その後 E13.5-16.5 にかけて分枝形成を繰り返し、最終的に終末部での細胞分化によって成熟する。胎生期マウス顎下腺における *Brachyury* 遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR で解析した。発生初期の分枝形成期に一致して、E12.5-13.5 にかけて急激な *Brachyury* 遺伝子発現の増加を認めた。胎生期マウス顎下腺における *Brachyury* 発現を Western blotting で評価した。リアルタイム RT-PCR の結果と同様に、E12.5-13.5 での高発現を認めた。この発現動態から、*Brachyury* がマウス唾液腺初期発生に何らかの作用を及ぼしている可能性が示唆された。

以上から、次にマウス顎下腺原基の器官培

養における *Brachyury* 遺伝子ノックダウンの効果を検討した。E12.5-13.5 から分離した顎下腺原基の器官培養において、形態形成初期に必須の過程である cleft 形成や分枝形成が有意に抑制された。一方、発生の中期以降である E14.5-15.5 から分離した顎下腺原基の器官培養においては有意な効果は認められなかったことから、*Brachyury* が初期発生段階における cleft 形成や分枝形成に関与している可能性が示唆された。*Brachyury* が発生初期の cleft 形成や分枝形成に関与している可能性が示唆されたため、cleft 形成や分枝形成、および細胞接着に関連するとされる *Btbd7*、*fibronectin*、*E-cadherin* の胎生期マウス顎下腺における発現動態を Western blotting で確認した。*Btbd7*、*fibronectin* は *Brachyury* と同様に E13.5 を中心に高発現が認められた。一方、*E-cadherin* の発現は発生初期に減少していた。*Brachyury* と同様に *Btbd7*、*fibronectin* が発生初期に高発現していることを確認したため、マウス顎下腺原基の器官培養における *Btbd7*、*fibronectin* 遺伝子ノックダウンの効果を検討した。*Brachyury* ノックダウンと同様に cleft 形成や分枝形成が有意に抑制された。また、*Btbd7*、*fibronectin* 遺伝子をノックダウンしても *Brachyury* の発現動態に影響は認めなかったが、一方、*Brachyury* ノックダウンにおいては *Btbd7*、*fibronectin* の発現の抑制が認められた。*Brachyury* が *fibronectin* や *Btbd7* の上流でその発現を制御している可能性が示唆された。

すなわち、*Brachyury* は唾液腺の発生の初期に局限して強発現し、間葉マーカーである *fibronectin* を誘導し、*Btbd7* を介して上皮細胞接着因子である *E-cadherin* の発現を抑制することで上皮同士の接着から上皮間葉接着を誘導し、唾液性発生における上皮間葉移行を制御している可能性が示唆された。

また、唾液腺の発生には唾液腺幹細胞の存在が必要であり、幹細胞を維持することが重要となる。幹細胞に関連する因子には、iPS細胞の樹立に必要な *Sox2*、*Oct3/4*、*c-Myc*、*Klf4* などが挙げられるが、その中でも *Sox2* は全ての多能性幹細胞で発現しており、それゆえ共通の多能性維持を担うとされる。

そこで、幹細胞に関わる因子として特に *Sox2* との関わりについて検討を行った。E12.5-16.5 より分離した顎下腺原基を用いて、胎生期マウス顎下腺における *Sox2* の発現動態を Western blotting で解析した。

Brachyury の発現動態と同様に *Sox2* は発生初期の E12.5-13.5 にかけて強発現していることを確認した。*Brachyury* と同様に *Sox2* が発生初期に高発現していることを確認したため、マウス顎下腺原基の器官培養における *Sox2* 遺伝子ノックダウンの効果を検討した。*Brachyury* ノックダウンと同様に cleft 形成や分枝形成が有意に抑制された。また、*Sox2* 遺伝子をノックダウンしても *Brachyury* の発現動態に大きな影響は認めなかったが、一方、*Brachyury* ノックダウンにおいては *Sox2* の発現の抑制がやや認められた。*Brachyury* が *Sox2* と相互的に影響することがいわれているが *Brachyury* の方が中心的に発現を制御している可能性が示唆された。Cleft 形成に関してはどちらも必要な因子であることが示唆された。

最後に、E12.5-16.5 より分離した顎下腺原基を用いて、多能性の維持や様々な臓器発生に関与するとされる *Wnt* の発現を Western blot 法で解析した。*Wnt* シグナルは、*Sox2*、*Oct*、*Brachyury*、*fibronectin* などを誘導し、一方で上皮間葉移行に関わる *E-cadherin* は抑制することが報告されている。今回は *Brachyury* の発現に関与するとされる *Wnt3a* について解析した。*Brachyury* と同様に発生の初期の E12.5-13.5 に局限して発現しているのを確認した。

以上より、Brachyury が fibronectin、Btbd7、E-cadherin を制御することで、マウス唾液腺の cleft 形成を制御し発生の中心的な役割を果たしている可能性が示唆された。また、Brachyury は幹細胞の維持を担う Sox2 や Wnt シグナルも制御している可能性が考えられた。

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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

杉浦 剛 (SUGIURA Tsuyoshi)

九州大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：40322292

(2)研究分担者

碓 竜也 (IKARI Tatsuya)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：70380467

(3)連携研究者

()

研究者番号：