

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893240

研究課題名(和文) 唾液腺成体幹細胞の再生能を亢進する因子の解明と治療への応用

研究課題名(英文) Identification of enhanced salivary gland stem cell regenerative capacity factor and its application to treatment of disease

研究代表者

田中 準一 (Junichi, Tanaka)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：40710166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：胎生期唾液腺原基に特異的に発現する因子の解析として、胎生12日齢マウスの頭頸部凍結組織切片より、口腔粘膜と唾液腺原基を採取し、RNA sequenceを用いて遺伝子発現プロファイルを作成した。また、唾液腺成体幹細胞として酵素処理により分散化した顎下腺よりCD133陽性細胞をフローサイトメトリーで採取した。採取したCD133陽性細胞および陰性細胞についてRNA sequenceを用いて遺伝子発現プロファイルを作成した。胎生期唾液腺原基およびCD133陽性細胞において発現の高い転写因子についてin situ hybridizationを用いて、成獣顎下腺及び胎生期唾液腺原基での局在を確認した。

研究成果の概要(英文)：As an analysis of the factors that is specifically expressed fetal salivary gland, from head and neck frozen tissue sections of embryonic day 12 old mice, two areas of the oral mucosa and salivary gland were collected using laser microdissection. In addition, the CD133-positive cells from adult submandibular glands were collected by flow-cytometry as salivary gland adult stem cells. And we analyzed embryonic stage salivary gland and salivary gland adult stem cells gene expression profiles using RNA sequence. Using in situ hybridization for high transcription factor of both population, it was confirmed localization in adult submandibular gland and fetal salivary gland.

研究分野：再生医療

キーワード：唾液腺 幹細胞 再生

1. 研究開始当初の背景

口腔乾燥症は、う蝕や歯周病などの口腔内疾患や、その症状が重篤な場合には嚥下障害による誤嚥性肺炎の原因となることから、著しいQOLの低下をもたらすことが知られている。また近年超高齢社会を背景としてその罹患者は益々増加傾向を示している。高齢者における唾液分泌量の低下の多くは薬剤によるものであることが報告されているが、その他加齢や頭頸部癌の放射線治療後などでもみられ、これらの症例では唾液腺実質組織の萎縮を伴うため根治療法がなく人工唾液などの対症療法のみで頼らざるを得ないのが現状である。唾液腺組織の消失を伴う重篤な口腔乾燥症に対して細胞治療を応用するためには、機能的な幹細胞の単離が必要となる。

成獣マウス唾液腺に多分化能を有する組織幹細胞が存在することは既に報告されており異論のないところである (Hisatomi, Y. et al., HEPATOLOGY 39:667-675, 2004)。唾液腺の再生医療に関する報告としては、唾液分泌障害を誘導したマウスを用いた治療実験があげられ、例えば Lombaert らが、sphere 培養により濃縮された c-Kit 陽性唾液腺細胞に腺組織再構築能が認められ、唾液分泌量の回復を報告している (PLoS One 30: e2063, 2008)。しかし、成獣マウス唾液腺の導管結紮モデルや部分切除モデルでは、少なくとも導管様組織の再生がみられるが唾液産生能を有する腺房の再生は認められず、唾液腺成体幹細胞の腺組織再構築能は必ずしも高くないことが予想される。

2. 研究の目的

本研究では唾液腺組織の萎縮の原因として、新たな細胞を供給する幹細胞システムの破綻に着目し、その中心的な役割を担う唾液腺成体(組織)幹細胞の遺伝子発現を、幹細胞活性の高い胎生期唾液腺細胞の遺伝子発現と比較する。このことにより、加齢に伴う幹細胞活性の低下に関連した遺伝子を同定し、その治療への応用を探る。

3. 研究の方法

(1) 胎生 12 日齢のマウス唾液腺組織切片から唾液腺原基 唾液腺原基直上粘膜 口腔粘膜の3領域をレーザーマイクロダイセクションで採取し、RNA sequence により遺伝子発現プロファイルを作製した。

(2) C57BL/6(6wks)のマウス顎下腺を用いて CD133 の蛍光抗体法により、その局在を解析した。またマウス顎下腺より酵素処理を用いて唾液腺細胞を単離し、フローサイトメーターにより CD133 陰性および CD133 陽性細胞を分取した。これらの細胞の遺伝子発現を RT-PCR により解析し、in vitro におけるコロニー形成能、spheroid 形成能を比較した。さらに顎下腺部分切除モデルマウスを作製し、GFP マウス由来 CD133 陽性細胞移植後の

組織学的解析により in vivo における組織再生能を評価した。加えて、CD133 陽性細胞および陰性細胞の遺伝子発現プロファイルを RNA sequence により作製した。

(3) CD133 陽性細胞と胎生期唾液腺原基の遺伝子プロファイルを比較検討し、その局在を Fluorescence in situ hybridization (FISH)により解析した。

4. 研究成果

(1) 胎生 12 日齢のマウスの唾液腺原基特異的に発現する転写因子 16 種類を同定した。

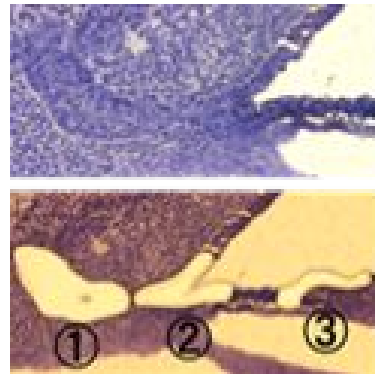


図1. 唾液腺原基 唾液腺原基直上粘膜 口腔粘膜の3領域をレーザーマイクロダイセクションで採取し、遺伝子発現プロファイルを作製した。

(2) 成体幹細胞としての CD133 陽性細胞の単離

6週齢の C57BL/6J マウスから顎下腺を切除し酵素処理により唾液腺組織を分散させた。Anti-CD133-APC、Anti-Lineage-FITC で抗体染色後、フローサイトメーターで解析を行った。PI 陰性、FITC 陰性、APC 陰性の群を CD133 陰性細胞として、PI 陰性、FITC 陰性、APC 陽性の群を CD133 陽性細胞として2つの細胞分画を分取した。

フローサイトメトリーの結果より、PI 陰性、FITC 陰性、APC 陽性の分画である CD133 陽性細胞は顎下腺全細胞中に 3%という割合で存在した。

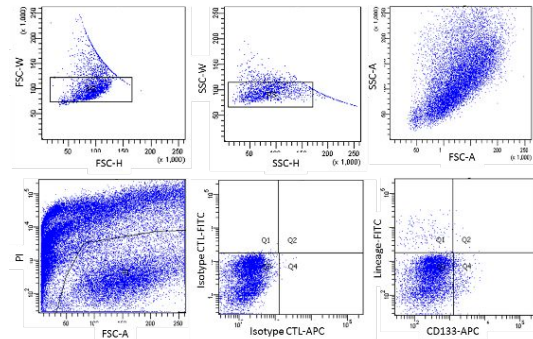


図2. 唾液腺組織 CD133 陽性細胞の単離

(3) CD133 陽性細胞の局在解析

蛍光抗体法の結果、成獣マウス顎下腺においてCK18 陽性の導管上皮細胞の一部にCD133 陽性細胞が局在することが明らかになった。

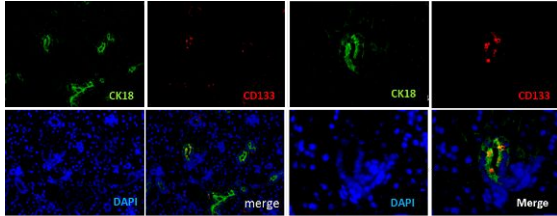


図 3 . 唾液腺における CD133 陽性細胞の局在解析

(4) CD133 陽性細胞の機能解析

CD133 陽性細胞は CD133 陰性細胞に比べ有意に高い colony 形成能および sphere 形成能を示した。

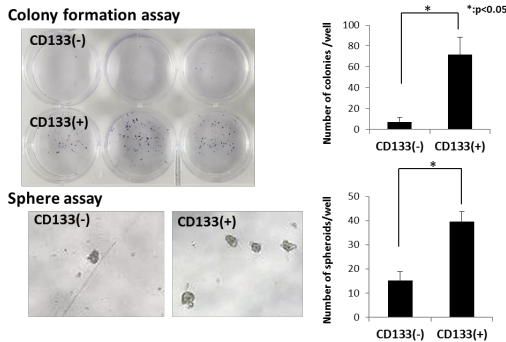


図 4 . CD133 陽性細胞の colony 形成能および sphere 形成能

(5) CD133 陽性細胞の移植による再生能の解析

CD133 陽性細胞移植群の再生結節には移植後 4 週で多数の GFP 陽性の導管様構造が確認され、CD133 陽性細胞も多く見られた。

また、移植後 4 週の再生結節内には AQP5 陽性の腺房様構造が確認された。再生結節内の腺房様構造は PAS 染色陽性の粘液産生性の細胞により構成されていた。

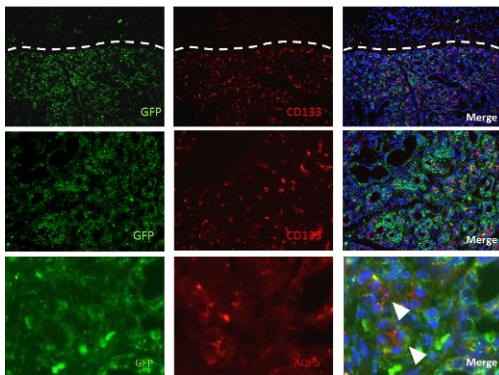


図 5 . CD133 陽性細胞移植後 4 週の再生結節における CD133 および AQP5 の局在

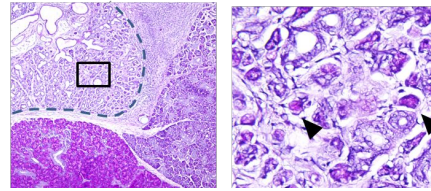


図 6 . CD133 陽性細胞移植後 4 週の再生結節における粘液産生細胞の局在

(6) CD133 陽性細胞と陰性細胞の遺伝子発現比較。

RNA sequence により CD133 陽性細胞と陰性細胞の遺伝子発現プロファイルを作製した。CD133 陽性細胞特異的に発現の高い転写因子を 12 種類同定した。

(7) CD133 陽性細胞と唾液腺原基の遺伝子発現の比較と局在解析

同定された転写因子の中で胎生期唾液腺原基、CD133 陽性細胞ともに高い発現がみられた因子および唾液腺原基のみで発現の高い転写因子に着目した。

唾液腺原基特異的転写因子と CD133 陽性細胞特異的転写因子の局在を Fluorescence in situ hybridization (FISH) を用いて確認した。

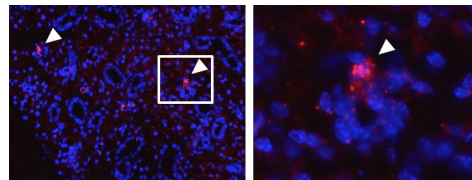


図 7 . 成獣唾液腺における CD133 陽性細胞局在特異的転写因子の局在

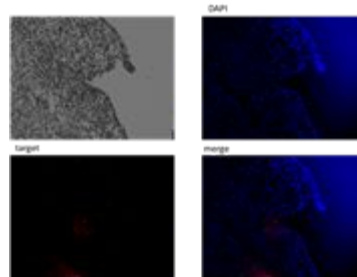


図 8 . 胎生 12 日唾液腺における唾液腺原基特異的転写因子の局在

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 4 件)

Hojyo S, Miyai T, Fujishiro H, Kawamura M, Yasuda T, Hijikata A, Bin BH, Irié T,

Tanaka J, Atsumi T, Murakami M, Nakayama M, Ohara O, Himeno S, Yoshida H, Koseki H, Ikawa T, Mishima K, Fukada T : Zinc transporter SLC39A10/ZIP10 controls humoral immunity by modulating B-cell receptor signal strength. Proc Natl Acad Sci U S A. 111:11786-91, 2014 doi: 10.1073/pnas.1323557111.

Okada S, Irié T, Tanaka J, Yasuhara R, Yamamoto, G, Isobe T, Hokazono C, Tachikawa T, Kohno Y, Mishima K : Potential role of hematopoietic pre-B-cell leukemia transcription factor-interacting protein in oral carcinogenesis J Oral Pathol Med. 2014,;44(2):115-25.doi:10.1111/jop.12210.

Tanaka J, Irié T, Yamamoto G, Yasuhara R, Isobe T, Hokazono C, Tachikawa T, Kohno Y, Mishima K : ANGPTL4 regulates the metastatic potential of oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. ;44(2):126-33, 2015, doi: 10.1111/jop.12212.

Yajima-Himuro S, Oshima M, Yamamoto G, Ogawa M, Furuya M, Tanaka J, Nishii K, Mishima K, Tachikawa T, Tsuji T, Yamamoto M : The junctional epithelium originates from the odontogenic epithelium of an erupted tooth. Sci Rep. 4: 4867, 2014, doi: 10.1038/srep04867.

〔学会発表〕(計 2 件)

第 13 回日本再生医療学会総会、京都、2014 年 3 月 5 日:マウス唾液腺細胞における CD133 陽性細胞の機能解析

田中準一、安原理佳、入江太郎、秋山知恵、河野葉子、美島健二

第 14 回再生医療学会総会、横浜、2015 年 3 月 21 日:マウス唾液腺における幹細胞の同定とその characterization

田中準一、馬淵 洋、安原理佳、入江太郎、深田俊幸、福島美和子、河野葉子、美島健二

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 準一 (TANAKA JUNICHI)

昭和大学歯学部口腔病態診断科学講座口
腔病理学部門・助教

研究者番号: 40710166