



マウス ES 細胞から機能的な唾液腺器官の再生に成功 -唾液分泌障害への応用に期待-

本研究成果のポイント

- マウス ES 細胞から誘導した口腔粘膜上皮に *Sox9* と *Foxc1* 遺伝子を共発現することにより三次元的に機能的な唾液腺器官の再生に成功しました。
- マウス唾液腺への同所移植により、再生唾液腺に唾液分泌能があることを明らかにしました。

昭和大学(学長 小出良平)の美島健二教授(歯学部 口腔病態診断科学講座 口腔病理学部門)、田中準一助教(歯学部 口腔病態診断科学講座 口腔病理学部門)と理化学研究所(理事長 松本紘)の辻孝チームリーダー(生命機能科学研究センター 器官誘導研究チーム)らを中心とした共同研究グループは、マウス ES 細胞^[1]から唾液分泌能を有する唾液腺器官の再生に成功しました。

外分泌腺組織^[2]の1つである唾液腺は、口腔内に唾液を分泌する組織です。唾液は消化作用、抗菌作用および口腔粘膜の保護作用などを有し、口腔内環境の維持に重要な役割を果たしています。近年、唾液分泌低下による口腔乾燥症患者の増加が指摘され、症状の重篤な場合には、著しいQOL (Quality Of Life) の低下をもたらすことが懸念されています。

共同研究グループは、マウスの唾液腺発生過程の解析により、唾液腺原基の形成に重要な2つの遺伝子 (*Sox9*, *Foxc1*) を同定しました。そして、これらの遺伝子をES細胞から誘導した口腔粘膜上皮に遺伝子導入することにより、三次元的な唾液腺器官の再生に成功しました。今回、ES細胞から誘導した唾液腺原基(誘導唾液腺原基)は、形態学的な特徴や遺伝子発現解析からも胎生期唾液腺原基に類似していました。また、大唾液腺の1つである耳下腺を摘出したマウスに、誘導唾液腺を同所性移植することにより、誘導唾液腺の導管と残存唾液腺の導管が接続することが確認されました。さらに、唾液分泌促進薬や味覚刺激により神経経路を介して、誘導唾液腺から口腔内へ唾液が分泌されることが確認されました。

今回得られた誘導唾液腺は、唾液腺発生メカニズムの解析はもとより、唾液腺分泌障害に対する再生医療や唾液腺疾患解析、創薬スクリーニングの有用なツールとなることが期待されます。本成果は英国のオンライン科学雑誌『*Nature Communications*』に英国東部時間10月11日に掲載されます。

1. 研究の背景

唾液は消化作用、抗菌作用、粘膜保護作用および食塊形成作用などを有し、これらの機能を介して口腔内はもとより全身の環境および機能の維持に重要な役割を果たしています。唾液分泌低下により種々の障害が生じることが知られていますが、その中でも難治性の自己免疫疾患であるシェーグレン症候群^[3]や頭頸部癌の放射線治療後などにみられる重篤な唾液分泌障害は、齲蝕、口腔内感染症、摂食嚥下障害および誤嚥性肺炎などの一因となり、著しいQOLの低下をもたらす原因となることが示唆されています。これらの対処法の現状としては、人工唾液の使用や残存する腺房細胞の分泌を促進するムスカリン性アセチルコリン受容体アゴニストなどの服用があげられます。一方、腺組織障害が高度で症状が重篤な症例では、これらの治療法が奏功しない場合も認められることより、より効果的な治療法として失われた腺組織を再生する再生医療の応用が期待されています。

近年の研究によって、オルガノイド^[4]とよばれる三次元的な組織構築と臓器特有の機能を持った細胞凝集塊が、ES細胞やiPS細胞^[5]などの多能性幹細胞から分化誘導されることが分かっています。この多能性幹細胞由来オルガノイドは、再生医療や疾患解析の強力なツールとして期待されています。多能性幹細胞由来オルガノイドに関する報告としては、脳、下垂体、腸管、腎臓オルガノイドなどがあげられますが、唾液腺、乳腺や涙腺などの外分泌腺オルガノイドについての分化誘導方法は、いまだ確立されていませんでした。

そこで、共同研究グループは唾液腺発生過程を詳細に解析し、試験管内で唾液腺発生過程を再現することによりES細胞から唾液腺オルガノイドを分化誘導することを目指しました。

2. 研究手法と成果

1) 唾液腺初期発生に重要な転写因子の同定

マウスの大唾液腺組織の1つである顎下腺組織は、胎生11.5日に口腔粘膜上皮の肥厚として発生し、その後上皮・間葉相互作用により上皮の陥入と分岐を繰り返し成熟した唾液腺へと分化します。この段階を *in vitro* で再現することで、ES細胞より三次元的に唾液腺原基の誘導が可能となると考えられます。そこで、共同研究グループは、胎生期マウスの唾液腺発生初期における遺伝子発現を網羅的に解析することにより、唾液腺原基特異的な転写因子^[6]としてSox9とFoxc1を見出し、それらの転写因子が唾液腺の形態形成に関わっていることを明らかにしました(図1a, b)。

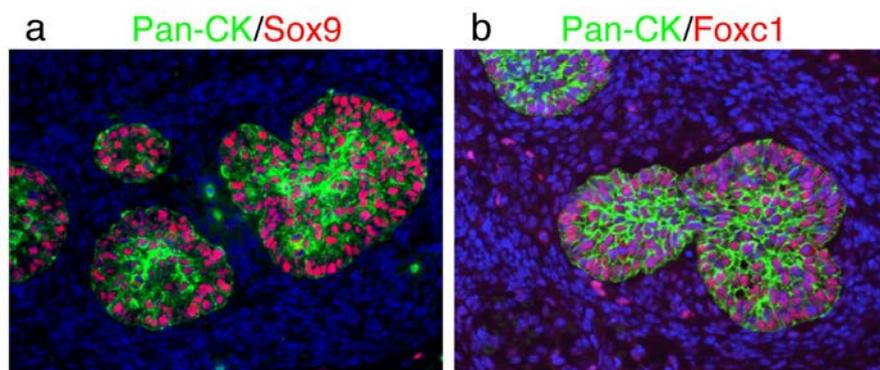


図1: 胎生13日マウス唾液腺での発現解析

- a: 唾液腺上皮細胞(緑)にSox9の発現(赤)が認められる。
- b: 唾液腺上皮細胞(緑)にFoxc1の発現(赤)が認められる。

2) ES細胞より誘導した口腔粘膜上皮から唾液腺組織の誘導

ES細胞の細胞凝集塊を口腔粘膜に分化誘導し、唾液腺の初期発生に重要と考えられた2つの転写因子、*Sox9*と*Foxc1*を過剰発現させました(図2)。

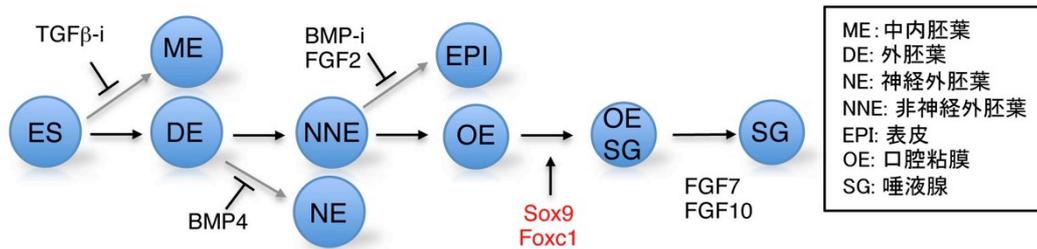


図2: ES細胞から唾液腺への分化誘導過程

ES細胞を口腔粘膜へ分化誘導しアデノウイルスを用いて*Sox9*と*Foxc1*遺伝子を過剰発現させた。

分化誘導開始23日後に、ES細胞の細胞凝集塊より胎生期唾液腺に類似した房状構造の突出が認められました(図3a)。この房状構造は唾液腺を形成する導管細胞、腺房細胞、筋上皮細胞が規則正しく配列し、胎生期の唾液腺に類似した構造を持っていました(図3b)。

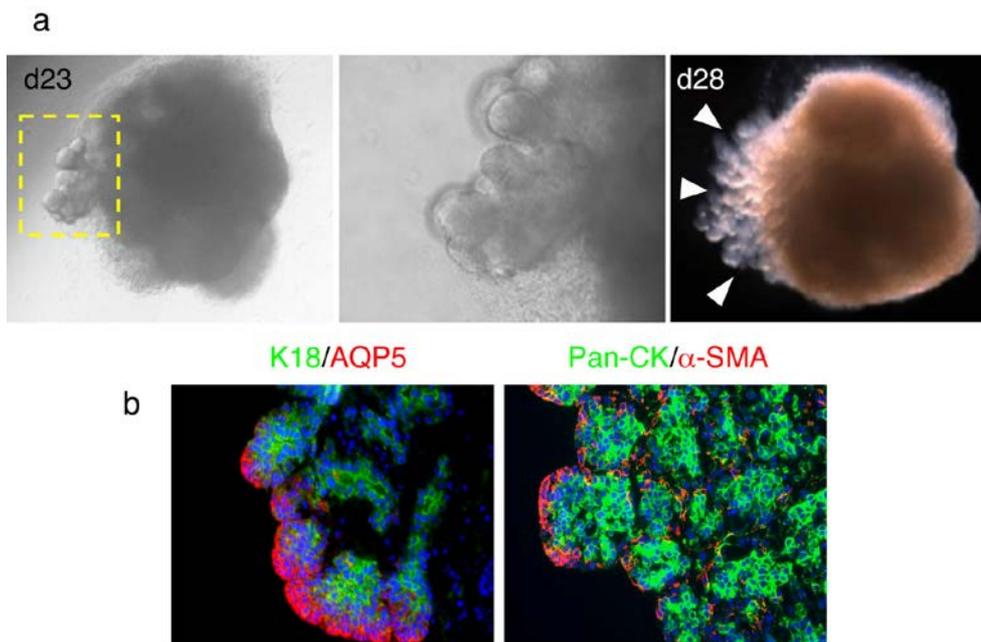


図3: ES細胞より誘導された口腔粘膜上皮より突出する房状の唾液腺様構造

a: ES細胞の凝集塊から枝分かれ構造を持つ組織が外方へ突出している(矢頭)。

b: 突出した房状の構造物は、K18陽性の導管(左図. 緑)、AQP5陽性の腺房(左図. 赤)、 α -SMA陽性の筋上皮細胞(右図. 赤)が配列しており胎生期唾液腺組織に類似していた。

さらに、この構造を単離し網羅的に遺伝子発現を比較したところ、胎生期の唾液腺に類似した発現プロファイルを示し、誘導した唾液腺原基(誘導唾液腺: induced salivary gland rudiment, iSG)は胎生期唾液腺と非常に近い性質を持つことが明らかとなりました。

3) マウスの口腔内に同所移植した誘導唾液腺(iSG)の組織構築の解析

誘導された唾液腺組織が、機能的にも唾液腺同様の特徴を有しているか否かを検証する目的で、マウス口腔内への同所移植モデルを用いて iSG の唾液分泌能を解析しました。すなわち、大唾液腺（耳下腺、舌下腺、顎下腺）すべてを摘出したマウスへ iSG の移植を行いました。この際、耳下腺の排出導管と iSG の上皮組織が接続するようにガイド毛を用いて移植を行いました（図 4 a）。移植後 1 ヶ月で iSG は、移植部位に生着し、移植前の iSG から成熟した唾液腺へと発生しました（図 4 b, d）。さらに移植した iSG は宿主マウスの排出導管と接続し、口腔内への唾液分泌経路が再構築されていることが明らかとなりました（図 4 c）。

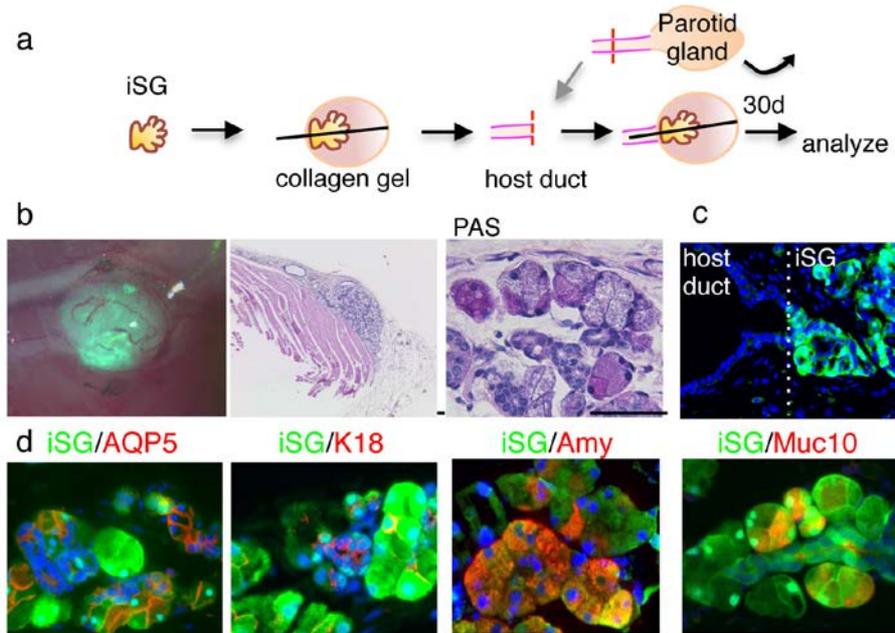


図 4：同所移植した iSG の形態学的解析

- a: ES 細胞から誘導した iSG を耳下腺切除部位の排出導管部位へ移植した。
- b: GFP 発現 ES 細胞より作出された iSG (緑) は移植後一ヶ月で移植部位に生着し、PAS 染色により漿液腺 (透明) と粘液腺 (赤) からなる混合腺の構造を示した。
- c: iSG (緑) は宿主の排池部導管 (GFP 陰性) へ接続していた。
- d: 移植した iSG (緑) には、アクアポリン 5 (AQP5, 赤) 陽性の腺房細胞、K18 (赤) 陽性導管細胞、アミラーゼ (Amy, 赤) 陽性の漿液腺や MUC10 (赤) 陽性の粘液腺からなる成熟した腺房が認められた。

4) マウスの口腔内に同所移植した誘導唾液腺(iSG)の唾液分泌能の解析

移植した iSG は成熟した唾液腺の構築を有していましたが、既存の唾液腺と比較すると、そのサイズが小さな唾液腺でした。そこで、iSG と胎生期マウスの唾液腺間葉組織^[7]を合わせて移植することにより、iSG 単独で移植した場合よりも大きな、iSG に由来する唾液腺を再生することが出来ました。そこで、この再生唾液腺の機能を解析したところ、iSG を移植していないコントロールのマウスでは、大唾液腺全てを摘出しているため、唾液分泌促進薬であるピロカルピン刺激により小唾液腺由来の少量の唾液分泌しか認められなかったのに対して、iSG を移植したマウスにおいては有意に唾液分泌量の増加が認められました（図 5 a）。一方、私たちが食べ物を食べると、舌上にある味蕾が味を感じ、その刺激が脊髄の孤束核に伝わり、

延髄の上・下唾液核を經由して唾液腺へと伝わることによって、唾液腺からの唾液の分泌が促進されます。そこで、実際に iSG が味覚の刺激によって唾液を分泌する機能的な唾液腺であるかを明らかとするため、iSG を移植したマウスの口の中に酸味（クエン酸）の刺激を与えたときの唾液分泌量の解析を行いました。その結果、刺激をしなかった場合と比較し、酸味の刺激を与えた場合に唾液分泌量は有意に増加したことから、神経調節により iSG からの唾液分泌が制御されていることが示されました（図 5b）。また、組織学的解析でも移植した iSG にみられる腺房細胞は、周囲に筋上皮細胞が位置し、その近傍に神経線維の伸長が認められたことから、分泌能を有する基本的な構造を持つことが明らかとなりました（図 5c）。

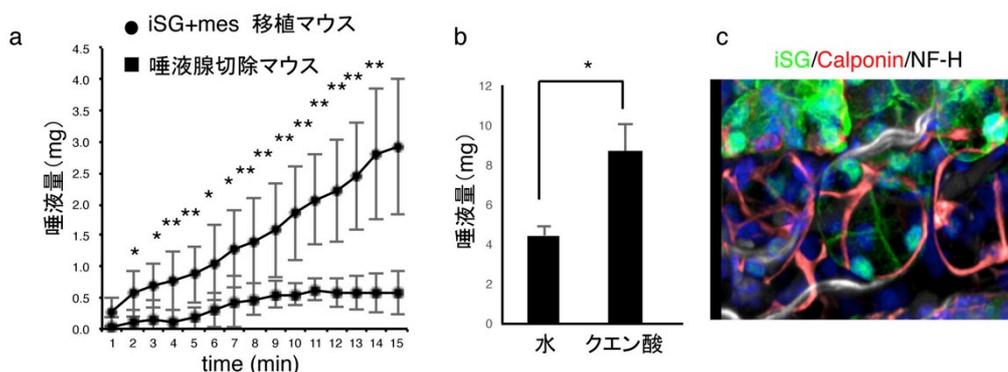


図 5: iSG と間葉組織の移植による iSG 唾液分泌能の解析

- a: 唾液分泌促進薬（ピロカルピン）刺激により iSG 移植マウスでは、コントロールのマウスと比較して有意な唾液分泌量の増加が認められた。
- b: iSG 移植マウスでは、クエン酸の酸味刺激により有意な唾液分泌量の増加が認められた。
- c: 移植した iSG では、GFP 陰性の宿主マウス由来の末梢神経（NF-H 陽性, 白）が伸長していた。また、腺房細胞周囲には、GFP 陽性筋上皮細胞（Calponin 陽性, 赤）の存在が認められた。

5) 誘導唾液腺 (iSG) 由来唾液の成分解析

iSG が分泌する唾液成分をプロテオーム解析により網羅的に分析しました。その結果、本唾液はアミラーゼをはじめとした唾液タンパクの大部分を含み、生理的な唾液に近いことが明らかとなりました。

これらの結果から、マウス ES 細胞から分化誘導した iSG は既存の唾液腺を代替し機能的な器官再生が可能であることが示されました。

3. 今後の期待

今回の研究ではマウス ES 細胞から胎生期唾液腺組織の誘導が可能となりました。本研究で得られた結果は、唾液腺の組織発生の解析はもとより、唾液分泌障害に対する再生医療への応用や薬剤開発、唾液腺腫瘍やシェーグレン症候群などの疾患モデル作出により疾患の病因・病態解析などに有用なツールとなることが期待されます。

一方、今回の成果を臨床応用するためには、ヒト iPS 細胞から唾液腺組織を誘導する必要があります。今後、本研究で得られたこれらの結果は、ヒト唾液腺組織やその他の外分泌腺組織の再生にも有用な知見と考えられ、外分泌腺の再生医療における基盤技術になるものと考えています。

4. 論文名と著者

“Generation of orthotopically functional salivary gland from embryonic stem cells”

Junichi Tanaka¹, Miho Ogawa^{2, 3}, Hironori Hojo⁴, Yusuke Kawashima⁵, Yo Mabuchi⁶, Kenji Hata⁷, Shiro Nakamura⁸, Rika Yasuhara¹, Koki Takamatsu⁹, Tarou Irie^{1, 10}, Toshiyuki Fukada^{1, 11}, Takayoshi Sakai¹², Tomio Inoue⁸, Riko Nishimura⁷, Osamu Ohara^{5, 13}, Ichiro Saito¹⁴, Shinsuke Ohba⁴, Takashi Tsuji^{2, 3†}, and Kenji Mishima^{1*†}. (*corresponding author, †Takashi Tsuji and Kenji Mishima contributed equally last authorship to this work.)

「ES細胞からの機能的唾液腺組織の作出」(参考訳)

田中準一¹、小川美帆^{2, 3}、北條宏徳⁴、川島祐介⁵、馬淵洋⁶、波多賢二⁷、中村史朗⁸、安原理佳¹、高松弘貴⁹、入江太朗^{1, 10}、深田俊幸^{1, 11}、阪井丘芳¹²、井上富雄⁸、西村理行⁷、小原収^{5, 13}、斎藤一郎¹⁴、大庭伸介⁴、辻孝^{2, 3}、美島健二¹

- 1, Division of Pathology, Department of Oral Diagnostic Sciences, School of Dentistry, Showa University
- 2, Laboratory for Organ Regeneration, RIKEN Center for Developmental Biology (CDB), RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research (BDR)
- 3, Organ Technologies Inc.
- 4, Clinical Biotechnology, Center for Disease Biology and Integrative Medicine, The University of Tokyo
- 5, Laboratory for Integrative Genomics, RIKEN IMS
- 6, Department of Biochemistry and Biophysics, Graduate School of Health Care Sciences, Tokyo Medical and Dental University
- 7, Department of Molecular and Cellular Biochemistry, Osaka University Graduate School of Dentistry
- 8, Department of Oral Physiology, School of Dentistry, Showa University
- 9, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Showa University
- 10, Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Iwate University
- 11, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University
- 12, Department of Oral-Facial Disorders, Graduate School of Dentistry, Osaka University
- 13, Department of Technology Development, Kazusa DNA Research Institute
- 14, Department of Pathology, Tsurumi University School of Dental Medicine

5. 論文および雑誌情報等

Nature Communications

DOI: 10.1038/s41467-018-06469-7

URL: <http://www.nature.com/ncomms>

6. 補足説明

[1] ES細胞

胚性幹細胞。発生初期に存在する内部細胞塊から作られる細胞であり、あらゆる種類の体細胞へ分化する能力を持つ多能性幹細胞の1つである。

[2] 外分泌腺

唾液、涙液、汗といった分泌液を体外へ放出する器官の総称であり、唾液腺、涙腺、乳腺、汗腺などが外分泌腺に含まれる。

[3] シェーグレン症候群

中年女性に好発する難治性自己免疫疾患の1つである。ドライマウス（口腔乾燥）はシェーグレン症候群の症状のひとつであり、唾液腺の炎症に伴う唾液分泌量低下を生じる。

[4] オルガノイド

培養環境下における、生体内の器官・臓器と極めて類似した組織構築や機能をもった組織構造体のことを示す。

[5] iPS細胞

iPS細胞（人工多能性幹細胞）は皮膚や血液細胞などの体細胞に遺伝子を導入することによって得られるES細胞に類似した性格を持つ多能性幹細胞のことである。

[6] 転写因子

DNAに結合し、特定の遺伝子の活動を制御するたんぱく質のことを示す。1つの転写因子が複数の遺伝子の働きを調節している。

[7] 唾液腺間葉組織

間葉組織とは上皮組織を支持する結合組織であり、胎生期の唾液腺間葉組織は成長因子を分泌していることが知られている。

7. 発表者・機関窓口（※研究内容については発表者にお問い合わせ下さい）

<発表者>

昭和大学歯学部 口腔病態診断科学講座 口腔病理学部門 教授

美島 健二（みしま けんじ）

TEL: 03-3784-8168 FAX: 03-3784-2870

mishima-k@dent.showa-u.ac.jp

（報道担当・問い合わせ先）

学校法人 昭和大学 総務課（広報担当）

TEL: 03-3784-8059 FAX: 03-3784-8012

press@ofc.showa-u.ac.jp

理化学研究所 生命機能科学研究センター

器官誘導研究チーム チームリーダー

辻 孝（つじ たかし）

TEL: 078-306-3447 FAX: 078-306-3449

E-mail: takashi.tsuji@riken.jp

（報道担当・問い合わせ先）

理化学研究所 広報室（報道担当）

TEL: 048-467-9272 FAX: 048-462-4715

ex-press@riken.jp