

Title	唾液腺再生を目指したiPS細胞の応用
Author(s)	小野, 瞳
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52349
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (小野 瞳)

論文題名 唾液腺再生を目指したiPS細胞の応用

論文内容の要旨

【研究目的】

唾液腺は唾液を分泌することで、口腔内はもとより全身の健康を維持しており、唾液分泌が減少すると様々な障害が生じる。放射線治療やシェーグレン症候群に伴う重篤な唾液分泌障害は、齶蝕、歯周病だけでなく、感染症、嚥下障害をはじめとする口腔機能障害を引き起こし、QOLの低下をもたらす。これらの対症療法として、人工唾液や保湿剤の使用、唾液分泌刺激薬などの服用があげられるが、現在のところ腺機能を回復させる根本的な治療法はなく、唾液腺組織そのものを修復する再生医療の確立が期待されている。

近年、再生医学研究の分野では、臓器再生を目的としてiPS細胞やES細胞、間葉系幹細胞などの多能性幹細胞を用いた研究が飛躍的な進歩を遂げてきた。幹細胞を特定の細胞に分化誘導し、生体外で構築した組織を欠損部に移植する再生医療が報告されている一方で、幹細胞自体を分化させるのではなく、幹細胞が発現するサイトカインや細胞外マトリックス等の再生因子の利用も注目され始めている。iPS細胞でも同様に、分化誘導を目指した研究が推進されているが、iPS細胞由来の再生因子の発現や周囲組織に与える影響については詳細には報告されていない。本研究はiPS細胞由来の再生因子を用いて唾液腺の再生を実現することを目標として、iPS細胞の唾液腺細胞に対する作用とその分子機構について検討を行った。

【材料と方法】

1. iPS細胞と唾液腺細胞の共培養で作成した再構成唾液腺の形態学的比較

ICR系妊娠マウスから胎生13.5日齢の胎仔を摘出し、実体顕微鏡で確認しながら唾液腺を採取した。TrypLE®で唾液腺を単細胞に分離した後、GFPを恒常的に発現するiPS細胞と混和させ、Wayらの方法に準じて96時間培養を行った。唾液腺細胞のみの単培養によって形成された再構成唾液腺(以下SGとする)と、iPS細胞と共培養によって形成された再構成唾液腺(以下iSGとする)の形態学的比較を、光学顕微鏡像とパラフィン切片による免疫組織染色法により行った。なおiSGは、iPS細胞：唾液腺細胞=5%：95%で混和した5%iSGと、iPS細胞：唾液腺細胞=20%：80%で混和した20%iSGを用いて検討を行った。

2. 再構成唾液腺中の唾液腺細胞における分化マーカーの発現比較

再構成唾液腺中の唾液腺細胞の分化を調べるため、免疫組織染色法にて再構成唾液腺における未分化マーカーSox2と水チャネルAQP5 (Aquaporin5) の発現と局在を確認した。さらに、再構成唾液腺をTrypLE®で単細胞にし、GFPの蛍光標識によりFACS Aria®でセルソーティングを行い、唾液腺細胞の抽出を行った。それらの唾液腺細胞を用いて、未分化マーカーである*Sox2*、*c-Myc*、*Nanog*、*Klf4*の遺伝子発現と、唾液腺への分化マーカーとして*Aqp5*、*Amy* (*Amylase*)、*M3R* (*Muscarinic acetylcholine receptor 3*) の遺伝子発現をリアルタイムRT-PCR法により解析した。

3. iPS細胞が誘導する再構成唾液腺形成における分子機構の解析

iPS細胞の共培養による細胞増殖とアポトーシスの関与を検証するため、再構成唾液腺におけるPCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) の発現とTUNEL染色によるアポトーシス細胞の発現を免疫組織染色により確認した。さらにセ

ルソーティングでiPS細胞を除いた、唾液腺細胞のErk1/2とAktのリン酸化活性を、Western blotting法を用いて解析した。

【結果】

1. iPS細胞と唾液腺細胞の共培養で作成した再構成唾液腺の形態学的比較

SGと同様に、iSGも腺房様集合体を多く含む再構成唾液腺を形成した。iSGにおけるiPS細胞の局在を確認すると、唾液腺細胞のみで構成される腺房様集合体の周囲にiPS細胞が分布していた。SGとiSGにおける形態学的比較のため再構成唾液腺全体の大きさを二次元的な面積で評価すると、SG、5%iSG、20%iSGそれぞれの大きさに有意な差は認められなかった。さらに再構成唾液腺中における腺房様集合体の数を計測すると、5%iSG、20%iSGはSGと比較して単位面積あたりの腺房様集合体数に有意な増加を認めた。E-cadherinの免疫組織染色像を用いて二次元的に腺房様集合体の長径を測定すると、5%iSG、20%iSGはSGと比較して腺房様集合体が有意に縮小していた。iSGは小さい腺房様集合体を数多く含む再構成唾液腺の形態であることから、iPS細胞と共培養することで唾液分泌に有利な腺房形態を有する再構成唾液腺を形成することが明らかになった。

2. 再構成唾液腺中の唾液腺細胞における分化マーカーの発現比較

顎下腺の発達過程における未分化マーカーSox2の局在を免疫組織染色で確認した。Sox2は、E13.5の胎仔唾液腺間葉組織に発現するが、発達が進むと上皮組織へ移行し、成体では導管上皮細胞の核に特異的な発現を認める。再構成唾液腺におけるSox2は、SGでは唾液腺間葉由来の組織にも発現しているが、iSGでは唾液腺上皮由来組織の核に発現していた。さらに再構成唾液腺を単細胞にし、セルソーティングした唾液腺細胞におけるSox2の遺伝子発現をRT-PCRで確認すると、SGに比べてiSGではSox2の遺伝子発現は有意に減少した。Sox2と同様に幹細胞における未分化能維持に働くとされている*c-Myc*、*Nanog*、*Klf2*の遺伝子発現を確認すると、iSGでは*c-Myc*、*Nanog*の発現減少、*Klf2*の発現増加を認めた。また唾液腺の水チャネルであるAQP5の発現を免疫組織染色で確認すると、E15.5では発現を認め、発達が進むにつれて唾液腺の細胞膜に特異的な発現が上昇する。再構成唾液腺でも同様に、SGに比べてiSGではAQP5が腺房様集合体の細胞膜に明瞭に発現していた。RT-PCRでもiSGにおける*Aqp5*の遺伝子発現は増加していた。正常の唾液腺において出生後発現が認められるとされている、*Amy*、*M3R1*に関しては、SG、iSGのいずれにおいても発現は認められなかった。以上の結果から、iPS細胞は再構成唾液腺中の唾液腺細胞に対して形態変化を伴う分化を誘導することが示唆された。

3. iPS細胞が誘導する再構成唾液腺形成における分子機構の解析

iPS細胞と共培養により腺房様集合体の形態が変化するメカニズムを検証するため、PCNAとTUNEL染色で確認したところ、SGに比べてiSGの唾液腺上皮由来の腺房様集合体における細胞増殖は有意に減少し、唾液腺間葉由来の組織にはアポトーシス細胞が認められた。また細胞増殖、分化、腺房形態形成に重要であるErk1/2とAktのリン酸化を解析したところ、SGに比べてiSGはErk1/2とAktのいずれもリン酸化活性が低下していた。iPS細胞によりAktとErk1/2の活性が低下し、細胞増殖が抑制されアポトーシスが増加することで再構成唾液腺の形態形成に影響を与えている可能性が示された。

【結論および考察】

本研究からiPS細胞と共培養することで、より分化した形態と特性を有する再構成唾液腺が形成され、その形態形成には唾液腺細胞のErk1/2とAktを介した細胞増殖の低下とアポトーシスの増加が関与していることが明らかになった。本研究によりiPS細胞が唾液腺細胞の発達・分化に影響を与えている可能性が示された。さらなるメカニズムの解明により、iPS細胞の再生因子を用いた唾液腺再生が実現可能となり、臓器障害に対する新たな治療戦略として応用が期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (小 野 瞳)	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教授 阪井 丘芳
	副 査 教授 山城 隆
	副 査 准教授 小川 裕三
	副 査 講師 中澤 光博
論文審査の結果の要旨	
<p>本研究は、唾液腺の再生医療を実現するために、iPS 細胞が唾液腺の形成に与える作用を検討したものである。</p> <p>その結果、iPS 細胞と共培養することで、より分化した形態と特性を有する再構成唾液腺が形成され、その形態形成には唾液腺細胞の Erk1/2 と Akt を介した細胞増殖の低下とアポトーシスの増加が関与していることが示唆された。</p> <p>これらの知見は、今後の再生研究に対し、有用な情報を提供するものであり博士(歯学)の学位授与に値するものである。</p>	