The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

学位論文

唾液腺再生を目指した iPS 細胞の応用

大阪大学大学院歯学研究科　統合機能口腔科学専攻

高次脳口腔機能学講座　顎口腔機能治療学教室

（主任: 阪井　丘芳　教授）

小野　瞳

緒　言

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、齲蝕、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[1)]、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[2, 3, 4)]。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[5, 6)]、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。さらに唾液腺組織は上皮組織と間葉組織からなる複雑な形態を持つことから、iPS 細胞から三次元的な立体構造を有する臓器を再生させるのは困難であるのが現状である。本研究は iPS 細胞が再生に関わる作用を探究するために、iPS 細胞と唾液腺細胞の共培養モデルを用いて行った。将来的に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

本研究は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会および遺伝子組み換え実験安全委員会の審査を受け、承認を得て行われた（承認番号: 動歯-25-004-0、3395、3390）。

1. 実験動物

ICR 系妊娠マウス（日本 SLC 株式会社）の胎仔を用いて、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の規定に基づいて実験を行った。

2. 唾液腺の採取、培養

胎生 13.5 日齢（以下、E13.5）の胎仔を摘出し、実体顕微鏡 Stemi2000-CS（Carl Zeiss）で確認しながら、胎仔の下顎下縁に平行に口角と頸部に切開を加え、下顎を摘出した。さらに、下顎から舌を摘出し、舌に付着している 2 つの唾液腺を採取した。胎仔唾液腺を TrypeLE（Life Technologies）を用いて単細胞に分離した後、Way らの方法に準じて培養を行った[7]。96 穴ディッシュ（Thermo scientific）の中央の窪みをマトリジェル（BD Biosciences）200 µl でみたし、その上に唾液腺細胞を含んだ細胞懸濁液を添加した。150 µg/ml ビタミン C（Sigma-Aldrich）と 50 µg/ml トランスフェリン（Sigma-Aldrich）を添加した 200 µl の DMEM/F12 培地（Life Technologies）を細胞懸濁液の上から添加し、ディッシュを満たし、37℃、5% CO_2 条件下で 96 時間培養し、再構成唾液腺（図 1）を形成した。

3. iPS 細胞

理研 CELL BANK より購入した、緑色蛍光タンパク質（GFP; Green fluorescence protein）を恒常的に発現するマウス胃上皮細胞由来のマウス iPS 細胞株（APS0006: iPS-Stm-FB/gfp-99-3）を用いた。iPS 細胞は Embryo Max® 0.1% Gelatin Solution（Millipore）でコートを行った 6 well plate（Corning）上に播種し（4.0×10^5 個/well）、ESGRO COMPLETE PLUS SERUM-FREE CLONAL GRADE MEDEUM（Millipore）を用いて培養した。細胞は Embryo Max® D-PBS（Millipore）にて洗浄し、Accutase cell detachment（Millipore）にてディッシュから剥離させて回収した。

4. 蛍光免疫組織染色

再構成唾液腺を、4%パラホルムアルデヒド（PFA; Paraformaldehyde）（Alfa Aesar）、5%スクロース（Wako Pure Chemical）で固定を行い、パラフィン切片を作成した。パラフィン切片はキシレンでパラフィンを溶解させた後、抗原賦活化液 H（三菱化学メディエンス）を用いて抗原賦活化処理を行った。リン酸緩衝液（Cambrex Corporation）にて洗浄し、VECTOR® M.O.M. immunodetection Kit（VECTOR Laboratories Inc.）を用いてブロッキングした。一次抗体として抗 GFP 抗体（MBL）（1:100）、抗 E-cadherin 抗体（BD Biosciences）（1:100）、抗 Sox2 抗体（Santa Cruz）（1:100）、抗 AQP5 抗体（Alomone）（1:100）、

抗 PCNA 抗体（BD Biosciences）（1:100）を室温にて 3 時間反応させた。Cy2、Cy3、Cy5（Jackson）（1:100）と結合した二次抗体を反応させ、Dapi（Thermo scientific）（1:1000）で核染色を行い、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 SP8（Leica）により観察した。

5. 唾液腺細胞の抽出（セルソーティング）

マトリジェル上で培養した唾液腺細胞から作製した再構成唾液腺から唾液腺細胞のみを抽出するため、再構成唾液腺周囲のマトリジェルを Cell recovery solution（BD bioscience）で溶解し、リン酸緩衝液にて洗浄を行った。その後 TrypeLE を用いて単細胞に分離した後、ビタミン C とトランスフェリンを添加した DMEM/F12 培地で洗浄を行い、セルストレイナー（FALCON）に通した後、細胞の回収を行った。回収した細胞は Facs Aria（BD bioscience）を用いて GFP で蛍光標識を行った iPS 細胞と分離し、唾液腺細胞の抽出を行った。

6. Quantitave real time RT-PCR による定量的遺伝子発現解析

5. で回収したそれぞれの唾液腺細胞から Pure Link® RNA Mini Kit（Life Technologies）を使用して全 RNA を抽出し、DNase 処理を行った。Genomic DNA の混入を防ぐため、DNase I（Roche）を用いた。Prime Script® RT reagent Kit（Takara Bio Inc.）を用いて mRNA と特異的な cDNA の合成を行った。遺

伝子発現の定量は My iQ^{TM} single-color real-time PCR Detection System（BIORAD）を用いて SYBR Green PCR protocol に従った。用いたプライマーは表 1 に示す通りである。目的遺伝子の発現量はハウスキーピング遺伝子である Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）遺伝子を内部標準物質として補正した。

7. アポトーシス細胞の検出

アポトーシス細胞の検出のために TUNEL 法による蛍光免疫染色で確認を行った。TUNEL 法は、4%PFA にて 1 時間固定し、洗浄後浸透化液（0.1%クエン酸ナトリウム、0.1% Toriton-X）に浸漬した後、In Situ Cell Death Detection Kit（Roche Diagnostics）のプロトコールに従い TUNEL 反応液を加え 1 時間反応させた。その後、E-cadherin、GFP を共染色し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 SP8（Leica）により観察した。

8. ウェスタンブロッティング

5. で回収した細胞を PBS （BIO-RAD）にて洗浄し、RIPA lysis buffer: 500 mM Tris-HCl buffer（pH 7.6）、 150 mM NaCl 1%、Nonident、0.5% Sodium Deoxy cholate、0.1% SDS、Protease Inhibitor Cocktail （Nacalai） を用いて溶解した。細胞溶解液を 15,000 rpm、10 分間、4℃で遠心分離し、回収した上清に 2×Laemmli sample buffer: 62.5 mM Tris-HCl pH6.8、

2% SDS、25% glycerol、0.01%BPB（BIO-RAD）を添加し、さらに 5% 2-Mercaptoethanol（BIO-RAD）を加えて試料とした。ミニプロティアン Tetra レディーゲルセル（BIO-RAD）を用いて、試料を電気泳動し、トランスブロット Turbo 転写システム（BIO-RAD）にて PVDF メンブレン（BIO-RAD）に転写した。転写したメンブレンを 0.05% Tween を含む PBS（PBST）で洗浄後、スキムミルクでブロッキングを行った。一次抗体反応はウサギ抗 Tubulin 抗体（Cell signaling）（1: 1000）、ウサギ抗 Erk1/2 抗体（Cell signaling）（1:1000）、ウサギ抗 Akt 抗体（Cell signaling）（1: 1000）、ウサギ抗リン酸化特異的 Erk1/2 抗体（Cell signaling）（1: 2000）、ウサギ抗リン酸化特異的 Akt 抗体（Cell signaling）（1:2000）を使用した。反応終了後、PBST で洗浄し、二次抗体反応は HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体（1:1000）を使用した。メンブレンの発光反応は Clarity Western ECL Substrate（BIO-RAD）を用いて行い、シグナルを Versa doc イメージングシステム（BIO-RAD）にて検出した。

9．統計分析

実験結果は平均±標準誤差（S.E.）で表し、t 検定を用いた 2 群間の比較と Bonferroni 検定を用いた多重比較検定を行った。

結　果

1. 再構成唾液腺におけるiPS細胞の局在

唾液腺細胞のみを単培養すると、24時間で細胞の集合が進み、96時間で再構成唾液腺（Regenerated salivary gland: 以下SGとする）を形成した（図1）。iPS細胞と唾液腺細胞を共培養すると同様に細胞の集合が進み、球状の上皮組織が主体となる腺房様集合体をより多く含んだ再構成唾液腺（以下iSGとする）を形成した。iSGにおけるiPS細胞の局在を位相差像と上皮マーカーであるE-cadherinの免疫組織染色像で確認すると、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（図2 A、B）。以上の結果より、唾液腺細胞のみで腺房様集合体は構成され、さらにiPS細胞は唾液腺細胞と均一に混ざり合うことはなく、iPS細胞のみで集合して唾液腺上皮細胞の周囲に存在していることが示された。

2. iPS細胞と唾液腺細胞の共培養により作成した再構成唾液腺の形態学的比較

100%の唾液腺細胞の単培養により作成した再構成唾液腺（SG）、総細胞数の5%を占めるiPS細胞と95%を占める唾液腺細胞を共培養した再構成唾液腺（5％iSG）、総細胞数の20％を占めるiPS細胞と80%を占める唾液腺細胞を共培養した再構成唾液腺（20％iSG）で形態学的比較を行った（図 3）。大きさを定量化するために再構成唾液腺全体を二次的に計測した面積を統計的に評価すると、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（図 3B）。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（図 3C）。E-cadherinの免疫組織染色像を用いて2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（図 3D）。

3. 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では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た（図 4A）。再構成唾液腺におけるSox2は、SGでは間葉由来組織にも発現しているが、iSGでは上皮由来組織の核に発現していた（図 4B）。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の*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（図 6A）。*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*、*Klf4*の遺伝子発現を確認すると、iSGでは*c-Myc*、*Nanog*の発現減少、*Klf4*の発現増加を認めた（図 6B-D）。また唾液腺の水チャネルであるAQP5（Aquaporin5）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発現が上昇した（図 5A）。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（図 5B）。RT-PCRでもiSGにおける*Aqp5*の遺伝子発現は増加していた（図 6E）。*Aqp5*と同様に唾液腺マーカーの一つとして知られている消化酵素*Amy*（Amylase）、腺組織にみられるムスカリン受容体である*M3R*（Muscarinic acetylcholine

receptor 3）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（図 6F、G）。

4. iPS細胞が誘導する再構成唾液腺における分子機構の解析

iPS細胞との共培養による腺房様集合体の形態形成の変化に細胞増殖とアポトーシスが関与しているかどうかを検証するため、PCNAの発現とTUNEL染色によるアポトーシス細胞の発現を確認した。SGに比べてiSGの腺房様集合体のPCNA発現は減少し、細胞増殖は有意に抑制されていた（図 7A）。TUNEL染色においてアポトーシス細胞はSGとiSGの腺房様集合体には発現が認められなかったものの、iSGにおいては間葉由来組織にアポトーシスが認められた（図 7B）。また細胞増殖、分化、腺房形態形成に重要であるAktとErk1/2のリン酸化活性をウエスタンブロッティングで解析を行ったところ、SGに比べてiSGはAktとErk1/2のいずれもリン酸化活性が低下していた（図 8）。

考　察

唾液は耳下腺、顎下腺、舌下腺のような三大唾液腺と小唾液腺により分泌され、酵素、タンパク質、糖タンパクを含んでおり、消化作用、抗菌作用、緩衝作用、味覚作用、歯の再石灰化作用、組織修復作用など多くの生理作用を有している [8)]。放射線治療やシェーグレン症候群により唾液腺の腺房細胞が損傷されると唾液分泌量が減少するが [9)]、すべての細胞が不可逆的な変化をするのではなく、生体唾液腺に存在する幹細胞が、分化増殖することで唾液分泌能を回復させることが確認されている [10,11)]。

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として、幹細胞を臓器障害モデル動物に移植すると治癒力が亢進し治療効果を示すという研究報告が散見される [12)]。幹細胞そのものが臓器の一部に分化し、機能を回復することを示す一方で、幹細胞が障害部位に集積し、種々のサイトカインを分泌することで障害を緩和することも明らかになりつつある [4,13)]。唾液腺組織においても、骨髄由来細胞中の幹細胞に唾液腺の再構築能があることが報告されており、これらの細胞から分泌される液性因子が残存腺組織の再生や維持に関与しているとされている [13)]。幹細胞の一つである iPS 細胞は、患者個人から採取が可能であること、また倫理面でも問題が少ないことから移植細胞のソースとして様々な分野で細胞治療を目指した研究が進められている [14,15)]。しかしながら、iPS 細胞が産生するサイトカインや細胞外マトリックス等が再生因子として周囲細胞へ与える影響に

関してはほとんど明らかにされていない[16]。今回、iPS 細胞と唾液腺細胞を共培養することで、iPS 細胞が唾液腺細胞に与える作用についての検討を行った。

唾液腺細胞の単培養（SG）と iPS 細胞との共培養（iSG）のいずれも腺房様集合体を多く含む再構成唾液腺を形成した（図 1、2）。動物モデルを用いた唾液分泌障害の治療実験では、胎仔唾液腺細胞移入による分泌能の回復が報告されている[12]。今回、形成した再構成唾液腺は、胎仔唾液腺と同様の形態を有し、腺房様集合体は AQP5 を発現していることから、唾液分泌能を獲得する可能性がある。さらに、SG に比べて iSG では、小さい腺房様集合体を数多く含む再構成唾液腺を形成した（図 3）。唾液腺は胎生期の分枝形態形成により上皮組織の表面積を増やし唾液の分泌能を高めている[17]。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唾液腺が形成される可能性が示された。

再構成唾液腺中の唾液腺細胞の分化を評価するため、未分化マーカーと唾液腺マーカーにおけるタンパク質の発現の確認を免疫組織染色で行った。また、抽出した唾液腺細胞を RT-PCR 法によって遺伝子発現を解析した（図 4-6）。過去の研究において未分化マーカーである *Sox2*、*c-Myc*、*Nanog* の遺伝子発現は顎下腺の発達が進むにつれて減少し、*Klf4* は増加することが報告されている[18]。さらに、唾液腺マーカーである水チャネル *Aqp5* は E14.5 頃から遺伝子発現を開始し、発達に伴い増加を認めるとされている[19, 20]。免疫組織染色の局在と RT-PCR の遺伝子発現の変化では、SG と比べて、iSG 中の唾液腺細胞の未分化マーカーが低下していた。つまり iPS 細胞は再構成唾液腺中の唾液腺細胞に、形態変化に伴う分化を誘導することが示唆された。今回検討を行った再構成唾液腺は E13.5 の唾液腺を 4

日間培養したものである。Amy や M3R は出生後以降に発現を開始することから、再構成唾液腺中の唾液腺細胞では Amy と M3R の遺伝子発現を認めなかったことも推測できる（図 6F、G）。

iPS 細胞が唾液腺細胞に与える影響に関して、細胞増殖とアポトーシスの検討を行なった。SG に比べて iSG では細胞増殖マーカーである PCNA の発現が減少していた（図 7A）。TUNEL 染色では iSG と SG のいずれの腺房様集合体にもアポトーシス細胞の発現は認められなかったが、iSG の間葉組織由来部分では軽度に増加していた（図 7B）。発生段階の胎仔唾液腺におけるアポトーシスも間葉組織の一部に認められることから[21)]、間葉組織由来部分のアポトーシス細胞が増加することで、上皮組織から構成される腺房様集合体の大きさに影響を与えた可能性が示唆された。さらに Erk1/2 と Akt のリン酸化活性をウエスタンブロッティングで確認したところ、SG と比較して iSG では Erk1/2 と Akt のいずれもリン酸化活性が低下していた（図 8）。細胞内で機能しているシグナル伝達経路の中で、細胞の分化増殖と最も密接に関連しているものの一つとして、Erk-MAPK 経路の増殖シグナル経路と PI3K-Akt 経路の生存シグナル経路が挙げられる[22)]。iPS 細胞はそれらを介して唾液腺細胞の増殖およびアポトーシスに作用し、形態形成に影響を与えている可能性が示唆された（図 9）。

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機能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、唾液腺分泌障害に対する新たな治療戦略として応用が期待される。

謝　辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただきご鞭撻を賜りました大阪大学歯学研究科　高次脳口腔機能学講座　阪井丘芳教授に深甚なる謝意を表します。そして本研究の遂行にあたり、御懇厚なる御助言を賜りました東北大学歯学研究科　分子・再生歯科補綴学分野　江草 宏教授に心より感謝申しあげます。さらに、本研究を行うにあたり多大なるご協力とご教示をいただきました The Children's Hospital of Philadelphia Research Institute　宇佐美 悠先生に深謝申し上げます。最後に、本研究に対し多大なるご協力を頂きました高次脳口腔機能学講座　顎口腔機能学教室の皆様に厚く御礼申し上げます。

図説明

図 1　唾液腺細胞の単培養により作成した再構成唾液腺（SG）

再構成唾液腺 0 時間、24 時間、96 時間後の位相差顕微鏡像を示す。

スケールバーは 0.5 mm を表す。再構成唾液腺は腺房様集合体から構成されている。

図 2　唾液腺細胞と iPS 細胞の共培養により作成した再構成唾液腺（iSG）

（A）位相差顕微鏡像における iPS 細胞の局在

GFP（緑色蛍光）、PCM（位相差顕微鏡像）、GFP/PCM（GFP と PCM の重ね合わせ像）を示す。80%の唾液腺細胞と 20%の iPS 細胞との共培養によって作成した再構成唾液腺を示す。スケールバーは 25 μm を表す。

（B）免疫組織染色

GFP（緑色蛍光）、E-cadherin（赤色蛍光）、GFP/E-cadherin（GFP と E-cadherin の重ね合わせ像）を示す。スケールバーは 25 μm を表す。

図 3　iPS 細胞と唾液腺細胞の共培養により作成した再構成唾液腺（SG、iSG）の形態学的比較

SG は 100%の唾液腺細胞の単培養により作成した再構成唾液腺、5%iSG は 95%の唾液腺細胞と 5%の iPS 細胞の共培養により作成した再構成唾液腺、

20%iSG は 80%の唾液腺細胞と 20%の iPS 細胞の共培養により作成した再構成唾液腺を示している。

（A）iPS 細胞の含有率の増加に伴う、再構成唾液腺の変化を示す。

上段は PCM で、下段は免疫組織染色による GFP と E-cadherin の重ね合わせ像を示す。

（B）再構成唾液腺の大きさの比較

位相差顕微鏡像を用いて再構成唾液腺の面積を計測した。

値は平均値および標準誤差（S.E.M）を示す（n=3）。

（C）腺房様集合体の数の比較

位相差顕微鏡像を用いて単位面積当たりの再構成唾液腺に含まれる腺房様集合体の数を計数した。値は平均値および標準誤差（S.E.M）を示す（n=3）。

＊: P＜0.05、＊＊: P＜0.01 vs control

（D）腺房様集合体の大きさの比較

E-cadherin 抗体を用いて、赤色単独で染色された上皮組織を腺房様集合体と判断し、腺房様集合体の長径を計測した。値は平均値および標準誤差（S.E.M）を示す（n=24）。＊: P＜0.05、＊＊: P＜0.01 vs control

図 4　正常胎仔唾液腺と再構成唾液腺における Sox2 のタンパク質発現とその局在

（A）正常胎仔唾液腺における Sox2 のタンパク質発現と局在

Sox2（シアン）、E-cadherin（赤）、Sox2/E-cadherin（Sox2 と E-cadherin との重ね合わせ像）を示す。図中に e; epithelium（上皮由来組織）、m; mesenchyme（間葉由来組織）、b; bud（腺房）、d; duct（導管）を示し、スケールバーは 25 μm を表す。

（B）再構成唾液腺（SG、20％iSG）における Sox2 のタンパク質発現と局在

Sox2（シアン）、Sox2/GFP/E-cadherin（Sox2（シアン）・GFP（緑）・E-cadherin（赤）との重ね合わせ像）を示す。スケールバーは 25 μm を表す。

図 5　正常胎仔唾液腺と再構成唾液腺における AQP5 のタンパク質発現とその局在

（A）正常胎仔唾液腺における AQP5 のタンパク質発現と局在

AQP5（白）、AQP5/GFP/E-cadherin （AQP5（白）・GFP（緑）・E-cadherin（赤）との重ね合わせ像）を示す。図中に e; epithelium（上皮由来組織）、m; mesenchyme（間葉由来組織）、b; bud（腺房）、d; duct（導管）を示し、スケールバーは 25 μm を表す。

（B）再構成唾液腺（SG、20％iSG）における AQP5 のタンパク質発現と局在

AQP5（白）、AQP5/GFP/E-cadherin （AQP5（白）・GFP（緑）・E-cadherin（赤）との重ね合わせ像）を示す。スケールバーは 25 μm を表す。

図 6　再構成唾液腺（SG、iSG）における分化マーカーの遺伝子発現の解析

未分化マーカーである *Sox2*（A）、*c-Myc*（B）、*Nanog*（C）、*Klf4*（D）の遺伝子発現と、唾液腺への分化マーカーとして *Aqp5*（E）、*Amy*（F）、*M3R*（G）の遺伝子発現の変化をリアルタイム RT-PCR で確認した。SG 中の唾液腺細胞の遺伝子発現量を基準値とし、iSG の相対発現量を示す。値は平均値および標準誤差（S.E.M）を示す（n = 3）。＊＊: P＜0.01 vs control

図 7　iPS 細胞の共培養による唾液腺細胞の細胞増殖とアポトーシスへの影響

（A）PCNA のタンパク質発現とその局在

HE 染色、PCNA（ピンク）、PCNA/GFP/Dapi（PCNA（ピンク）・GFP（緑）・Dapi（青）との重ね合わせ像）を示す。図中に e; epithelium（上皮）、i; iPS 細胞を示し、スケールバーは 25 μm を表す。

（B）TUNEL 染色による唾液腺細胞のアポトーシスの発現とその局在

HE 染色、TUNEL 陽性細胞（シアン）、TUNEL 陽性細胞/GFP/E-cadherin（TUNEL 陽性細胞（シアン）・GFP（緑）・E-cadherin（赤）との重ね合わせ像）を示す。図中に e; epithelium（上皮由来組織）、m; mesenchyme（間葉由来組織）、i; iPS 細胞を示し、スケールバーは 25 μm を表す。

図 8　iPS 細胞の共培養による唾液腺細胞の Erk1/2 と Akt のリン酸化活性の変化

抗リン酸化特異的 Erk1/2 抗体、抗 Erk1/2 抗体、抗リン酸化特異的 Akt 抗体、抗 Akt 抗体を用いたウエスタンブロッティングによりリン酸化 Erk1/2、Erk1/2、リン酸化 Akt、Akt を検出した（1、2、3、4 段目）。同じ膜をリプローブして抗 Tubulin 抗体を用い、Tubulin が一定であることを確認した。同一の実験を 3 度行い、代表的な結果を本図中に示す。

図 9　iPS 細胞による再構成唾液腺の形態的変化とその分子機構について

唾液腺細胞の単培養（SG）に比べて iPS 細胞と共培養（iSG）では、小さい腺房様集合体を数多く含む再構成唾液腺を形成した。また再構成唾液腺中における唾液腺細胞は Sox2 の発現低下と AQP5 の発現増加を示した。さらに唾液腺上皮細胞の増殖低下ならびに唾液腺間葉細胞のアポトーシスの増加を認めた。それらの分子機構は Erk1/2 と Akt を介したシグナル伝達経路の関与が示唆された。

引用文献

1) Angelova Volponi, A., Kawasaki, M. & Sharpe, P.T. (2013) Adult human gingival epithelial cells as a source for whole-tooth bioengineering. *J Dent Res,* **92,** 329-334.
2) Issa, J.P.M., Tiossi, R., Mello, A.S.D.S., Lopes, R.A., Sala, M.A., Matteo, D. & Iyomasa, M.M. (2007) PRP: A Possibility in Regenerative Therapy. *Int. J. Morphol.,* **25,** 587-590.
3) Bendall, S.C., Stewart, M.H., Menendez, P., George, D., Vijayaragavan, K., Werbowetski-Ogilvie, T., Ramos-Mejia, V., Rouleau, A., Yang, J., Bosse, M., Lajoie, G. & Bhatia, M. (2007) IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in vitro. *Nature,* **448,** 1015-1021.
4) Ide, C., Nakai, Y., Nakano, N., Seo, T.B., Yamada, Y., Endo, K., Noda, T., Saito, F., Suzuki, Y., Fukushima, M. & Nakatani, T. (2010) Bone marrow stromal cell transplantation for treatment of sub-acute spinal cord injury in the rat. *Brain Res,* **1332,** 32-47.
5) Takebe, T., Sekine, K., Enomura, M., Koike, H., Kimura, M., Ogaeri, T., Zhang, R.R., Ueno, Y., Zheng, Y.W., Koike, N., Aoyama, S., Adachi, Y. & Taniguchi, H. (2013) Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature,* **499,** 481-484.
6) Eiraku, M., Watanabe, K., Matsuo-Takasaki, M., Kawada, M., Yonemura, S., Matsumura, M., Wataya, T., Nishiyama, A., Muguruma, K. & Sasai, Y. (2008) Self-organized formation of polarized cortical tissues from ESCs and its active manipulation by extrinsic signals. *Cell Stem Cell,* **3,** 519-532.
7) Wei, C., Larsen, M., Hoffman, M.P. & Yamada, K.M. (2007) Self-organization and branching morphogenesis of primary salivary epithelial cells. *Tissue Eng,* **13,** 721-735.
8) Humphrey, S.P. & Williamson, R.T. (2001) A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent,* **85,** 162-171.
9) Jensen, S.B., Pedersen, A.M., Reibel, J. & Nauntofte, B. (2003) Xerostomia and hypofunction of the salivary glands in cancer therapy. *Support Care Cancer,* **11,** 207-225.
10) Gorjup, E., Danner, S., Rotter, N., Habermann, J., Brassat, U., Brummendorf, T.H., Wien, S., Meyerhans, A., Wollenberg, B., Kruse, C. & Von Briesen, H. (2009) Glandular tissue from human pancreas and salivary gland yields similar

stem cell populations. *Eur J Cell Biol,* **88,** 409-421.
11) Ihrler, S., Zietz, C., Sendelhofert, A., Lang, S., Blasenbreu-Vogt, S. & Lohrs, U. (2002) A morphogenetic concept of salivary duct regeneration and metaplasia. *Virchows Arch,* **440,** 519-526.
12) Ogawa, M., Oshima, M., Imamura, A., Sekine, Y., Ishida, K., Yamashita, K., Nakajima, K., Hirayama, M., Tachikawa, T. & Tsuji, T. (2013) Functional salivary gland regeneration by transplantation of a bioengineered organ germ. *Nat Commun,* **4,** 2498.
13) Sumita, Y., Liu, Y., Khalili, S., Maria, O.M., Xia, D., Key, S., Cotrim, A.P., Mezey, E. & Tran, S.D. (2011) Bone marrow-derived cells rescue salivary gland function in mice with head and neck irradiation. *Int J Biochem Cell Biol,* **43,** 80-87.
14) Banas, A., Teratani, T., Yamamoto, Y., Tokuhara, M., Takeshita, F., Osaki, M., Kawamata, M., Kato, T., Okochi, H. & Ochiya, T. (2008) IFATS collection: in vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury. *Stem Cells,* **26,** 2705-2712.
15) Vanikar, A.V., Trivedi, H.L., Gopal, S.C., Kumar, A. & Dave, S.D. (2014) Pre-transplant co-infusion of donor-adipose tissue derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells may help in achieving tolerance in living donor renal transplantation. *Ren Fail,* **36,** 457-460.
16) Chen, L., Mizutani, A., Kasai, T., Yan, T., Jin, G., Vaidyanath, A., Ya, B., El-Aarag, Liu, Y., Kudoh, T., Salomon, D.S., Fu, L. & Seno, M. (2014) Mouse induced pluripotent stem cell microenvironment generates epithelial-mesenchymal transition in mouse Lewis lung cancer cells. *Am J Cancer Res,* **4,** 800-88.
17) Fata, J.E., Werb, Z. & Bissell, M.J. (2004) Regulation of mammary gland branching morphogenesis by the extracellular matrix and its remodeling enzymes. *Breast Cancer Res,* **6,** 1-11.
18) Isabelle, M.a.L. & Hoffman, M.P. (2010) Epithelial Stem/Progenitor Cells in the Embryonic Mouse Submandibular Gland. *Front Oral Biol,* **14,** 90-106.
19) Pan, Y., Iwata, F., Wang, D., Muraguchi, M., Ooga, K., Ohmoto, Y., Takai, M., Cho, G., Kang, J., Shono, M., Li, X.J., Okamura, K., Mori, T. & Ishikawa, Y. (2009) Identification of aquaporin-5 and lipid rafts in human resting saliva and their release into cevimeline-stimulated saliva. *Biochim Biophys Acta,* **1790,** 49-56.
20) Larsen, H.S., Aure, M.H., Peters, S.B., Larsen, M., Messelt, E.B. & Kanli Galtung, H. (2011) Localization of AQP5 during development of the mouse submandibular salivary gland. *J Mol Histol,* **42,** 71-81.

21) Hoffman, M.P. (2002) Gene expression profiles of mouse submandibular gland development: FGFR1 regulates branching morphogenesis in vitro through BMP- and FGF-dependent mechanisms. *Dev Growth Differ,* **129,** 5767-5778.
22) Aksamitiene, E., Kiyatkin, A. & Kholodenko, B.N. (2012) Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. *Biochem Soc Trans,* **40,** 139-146.

表１　リアルタイム PCR に用いたプライマー

遺伝子	プライマー
Sox2	5’-GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAAGAGG-3’ 5’-TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG-3’
c-Myc	5’-CAGAGGAGGAACGAGCTGAAGCGC-3’ 5’-TTATGCACCAGAGTTTCGAAGCTGTTCG-3’
Nanog	5’-AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG-3’ 5’-CAACCACTGGTTTTTCTGCCACCG-3’
Klf4	5’-CACCATGGACCCGGGCGTGGCTGCCAGAAA-3’ 5’-TTAGGCTGTTCTTTTCCGGGGCCACGA-3’
Aqp5	5’-TGGAGCAGGCATCCTGTACT-3’ 5’-CGTGGAGGAGAAGATGCAGA-3’
Amy	5’-GGATGGAGAAAAGATGTCCTAC-3’ 5’-CATCACCCGTGTGAAACC-3’
M3R	5’-TCGGTAGAGCGGACTGGACA -3’ 5’-TCCACTGAGCAAGTCAGAAGTGAAG -3’
Gapdh	5'-CCATCACCATCTTCCAGGAG-3' 5'-GCATGGACTGTGGTCATGAG-3'

0h　　24h　　96h

図1

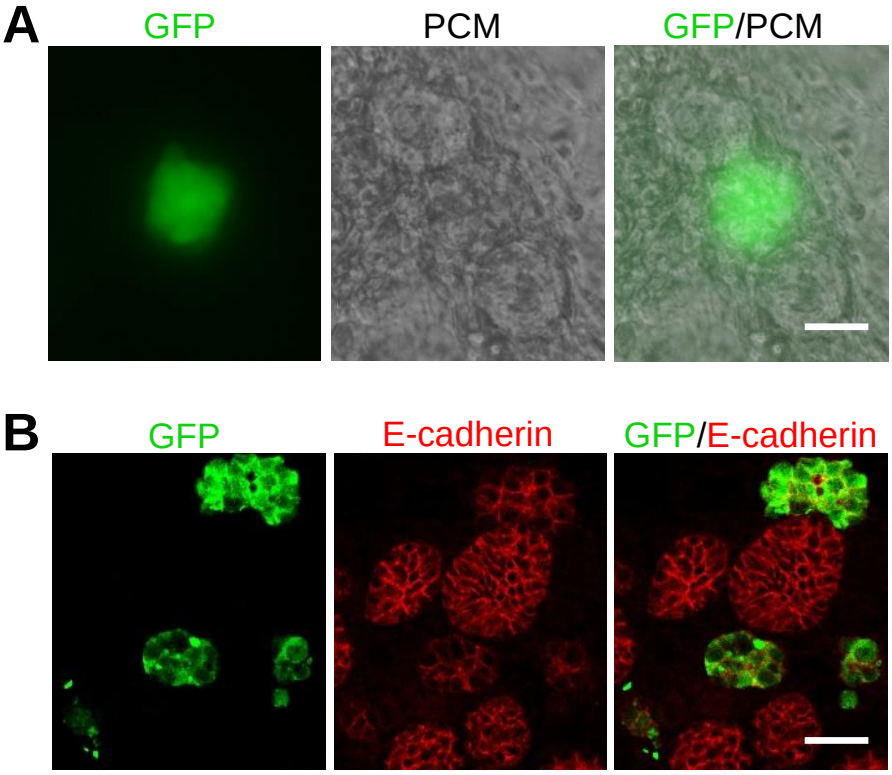

図2

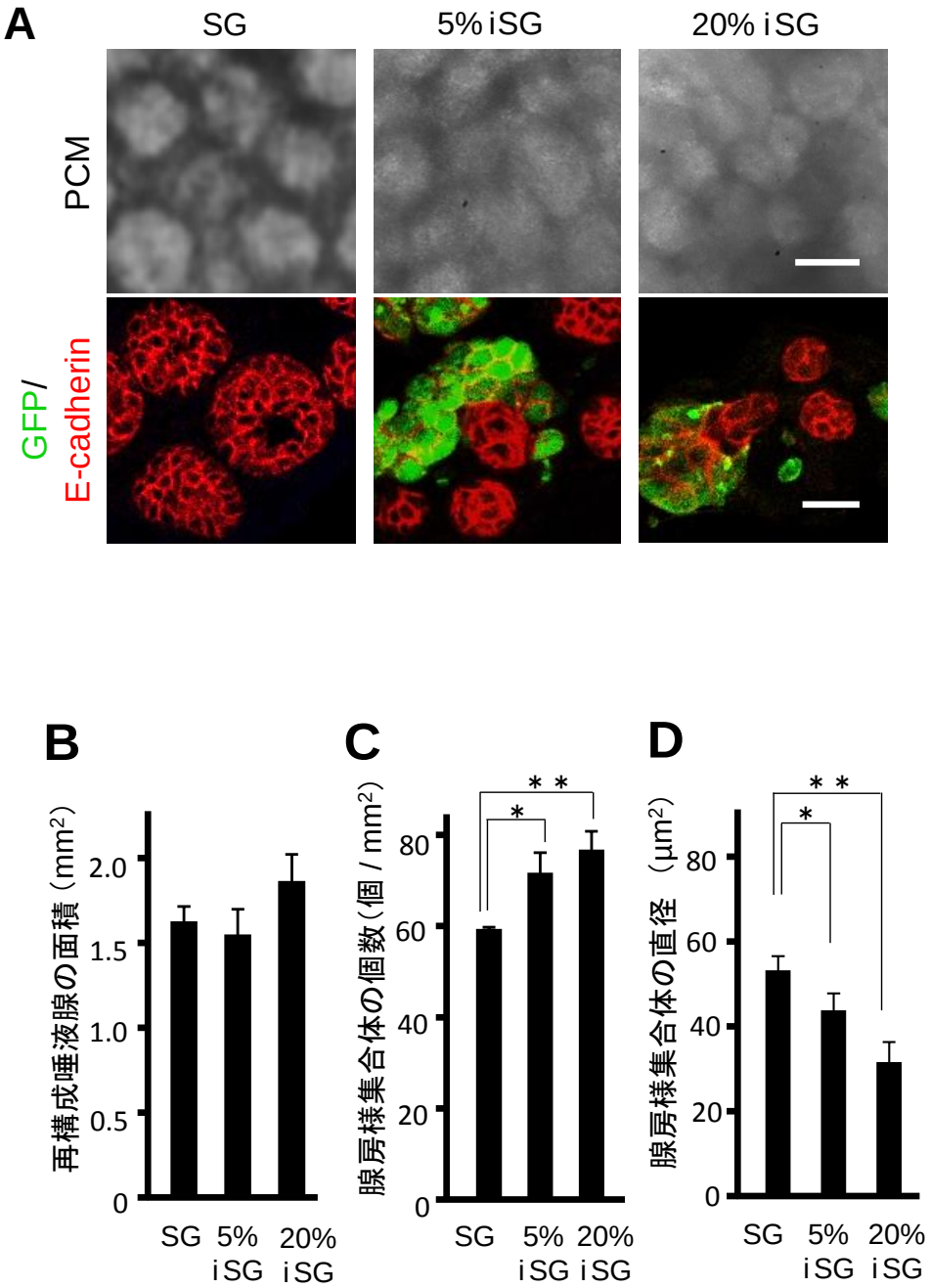
A
SG
5% iSG
20% iSG
PCM
GFP/
E-cadherin
B
再構成唾液腺の面積（mm²）
2.0
1.5
1.0
0.5
0
SG
5% iSG
20% iSG
C
腺房様集合体の個数（個 / mm²）
80
60
40
20
0
*
* *
SG
5% iSG
20% iSG
D
腺房様集合体の直径（μm²）
80
60
40
20
0
*
* *
SG
5% iSG
20% iSG

図3

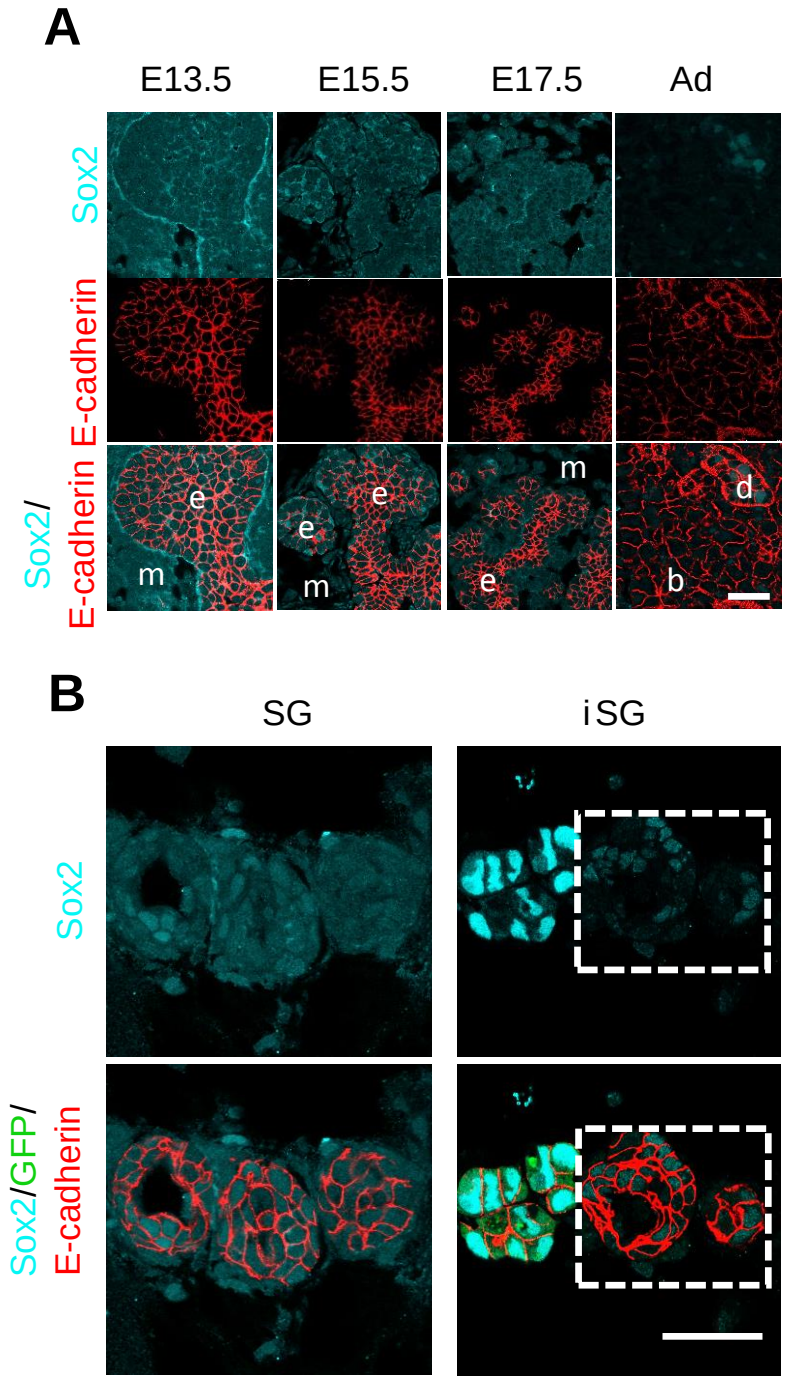
A
E13.5
E15.5
E17.5
Ad
Sox2
E-cadherin
Sox2/
E-cadherin
e
m
e
e
m
m
e
d
b
B
SG
iSG
Sox2
Sox2/GFP/
E-cadherin

図4

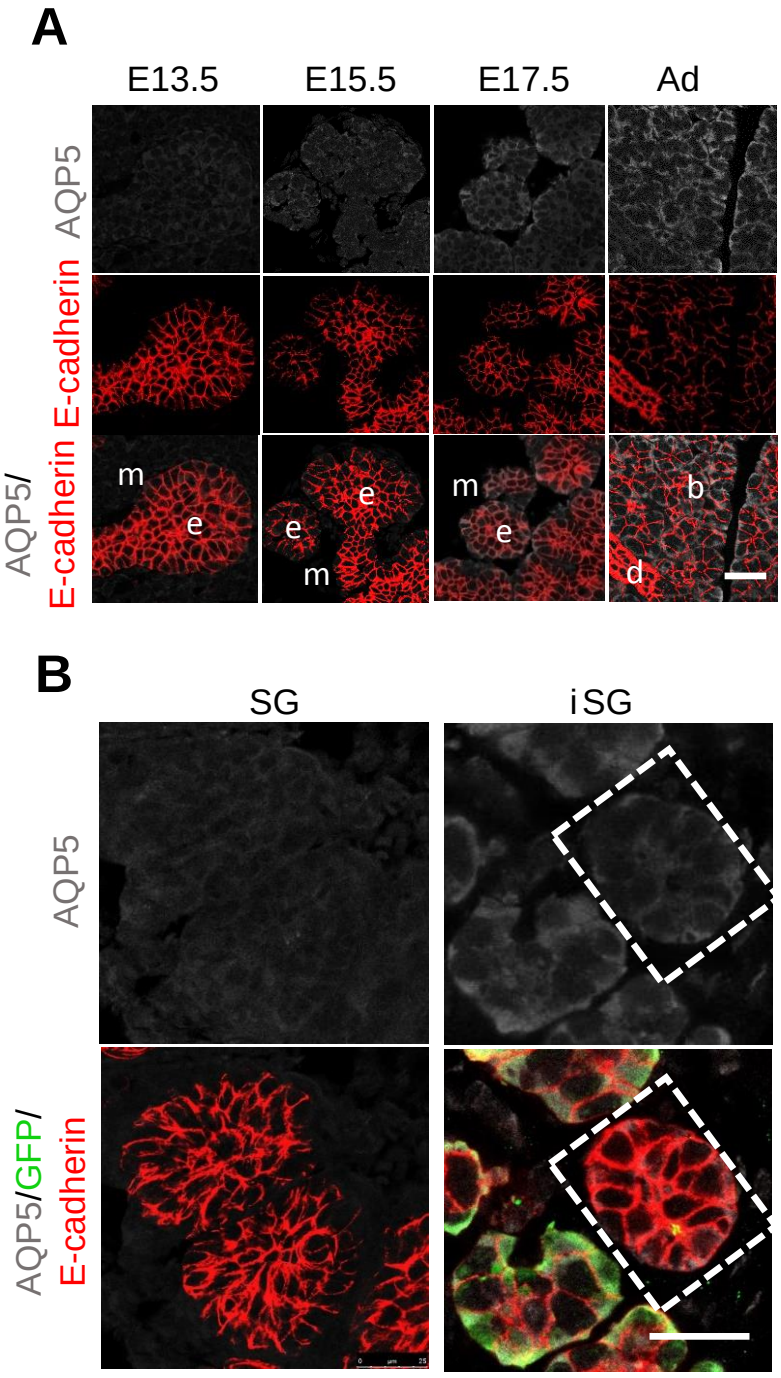
A
E13.5
E15.5
E17.5
Ad
AQP5
E-cadherin
AQP5/
E-cadherin
m
e
e
e
m
m
e
b
d
B
SG
iSG
AQP5
AQP5/GFP/
E-cadherin

図5

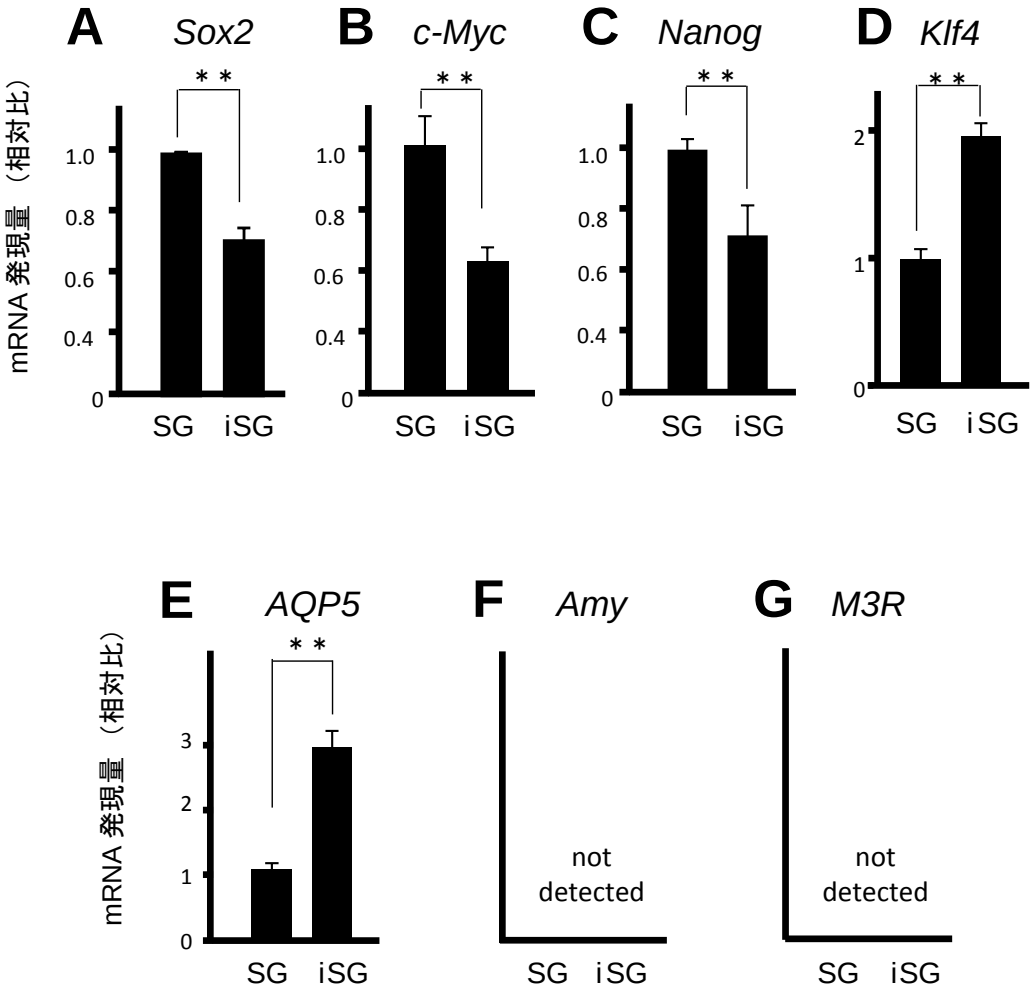
A
Sox2
B
c-Myc
C
Nanog
D
Klf4
mRNA 発現量（相対比）
＊＊
1.0
0.8
0.6
0.4
0
2
1
SG
iSG
E
AQP5
F
Amy
G
M3R
3
not
detected

図6

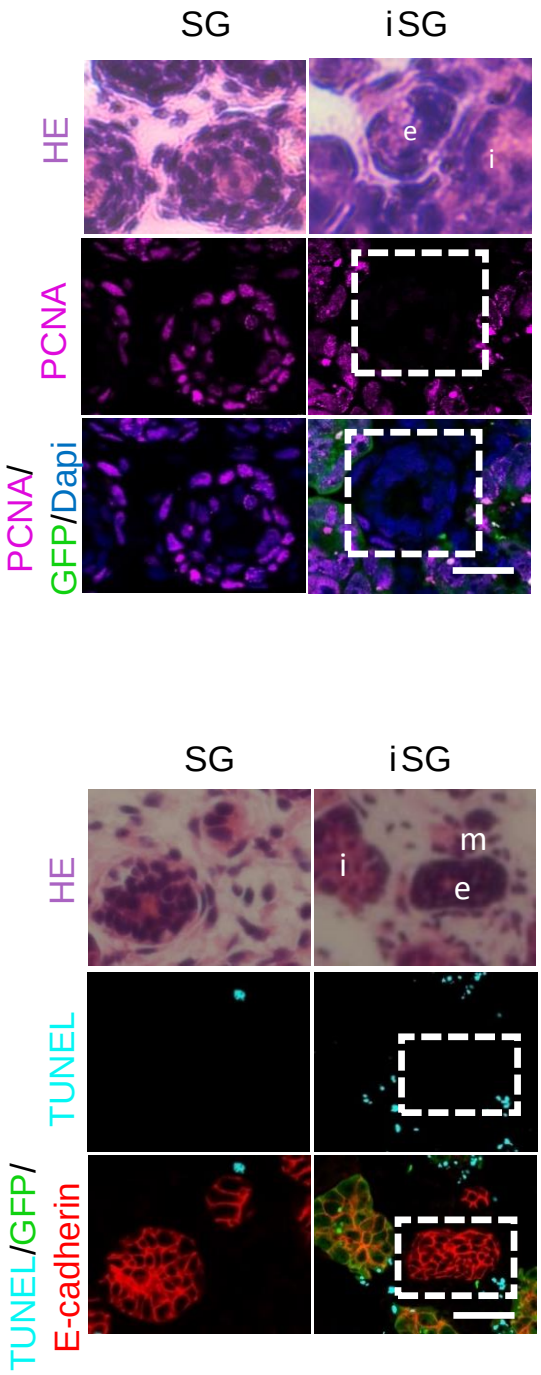
SG
iSG
HE
PCNA
PCNA/
GFP/Dapi
e
i
SG
iSG
HE
TUNEL
TUNEL/GFP/
E-cadherin
i
m
e

図7

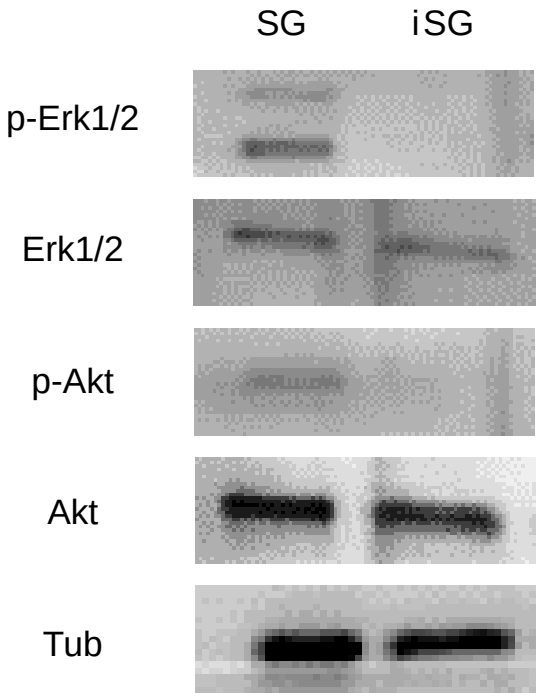

図7

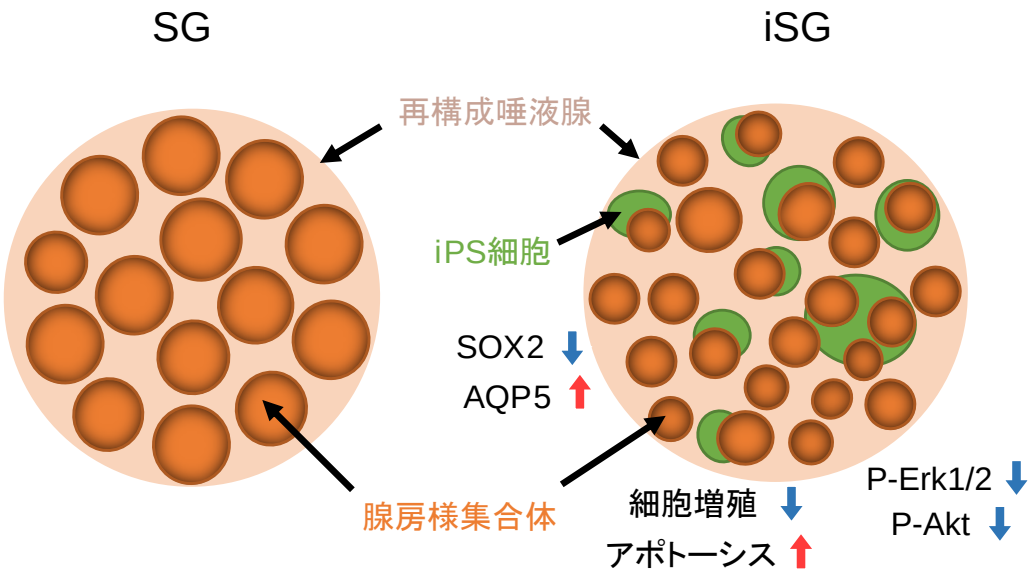
SG
iSG
再構成唾液腺
iPS細胞
SOX2
AQP5
腺房様集合体
細胞増殖
アポトーシス
P-Erk1/2
P-Akt

図8