

論 文 内 容 要 旨

Identification of Wnt-dependent Aquaporin 3-positive progenitor cells in salivary gland

(唾液腺における WNT 依存的 AQP3 陽性新規前駆細胞の同定)

主指導教員：岡本 哲治 教授
(医歯薬保健学研究科 分子口腔医学・顎顔面外科学)

副指導教員：栗原 英見 教授
(医歯薬保健学研究科 歯周病態学)

副指導教員：虎谷 茂昭 准教授
(医歯薬保健学研究科 分子口腔医学・顎顔面外科学)

廣田 傑

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【目的】唾液腺は唾液を産生する腺房細胞と、輸送・分泌する導管細胞から構成され、口腔機能の恒常性を保つために重要な役割を担っている。加齢変化や頭頸部癌における放射線治療の副作用によって起こる唾液腺萎縮に対する根治的治療法は開発されていない。先行研究で、Wnt シグナルを介した胎生期唾液腺の形態形成制御機構について明らかにされている。しかし、成体唾液腺の維持、再生における Wnt シグナルの役割については明らかではない。そこで本研究では、成体唾液腺由来の唾液腺オルガノイド培養法を確立し、唾液腺細胞の増殖、分化、および組織修復能における Wnt シグナルの機能を明らかにすることで、唾液腺再生モデルの開発を目指した。

【方法】成体マウス（12 週齢、雌）より顎下腺を摘出し、剪刀で細かく切り刻みコラゲナーゼ、Dispase 処理によって上皮を単離後、DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) と HamF12 培地を 1:1 の比率で混合した DF 培地に EGF (Epidermal Growth Factor)、FGF (Fibroblast growth factor)-1、FGF-7 を添加した条件下でマトリゲル内で三次元培養し、形成されたオルガノイドについて免疫染色法や RT (Real-time)-quantitative PCR (qPCR) 法にて既知の幹/前駆細胞マーカーである CD49f、CD117、や分化マーカー、Aqp (Aquaporin) 5 (腺房)、Krt (Keratin) 19 (導管) の発現を検討した。唾液腺オルガノイドに Wnt シグナルの活性化因子である R-spondin1 を作用させ、EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) の取り込みによる細胞増殖能、幹細胞マーカーや分化マーカーの発現を評価した。R-spondin1 は、LGR4-6 と結合し、Wnt 受容体である Frizzled の分解に関わる ZNRF3 の機能を阻害し Wnt シグナルの活性化を誘導することが知られている。作成した唾液腺オルガノイドを、顎下腺排泄導管をマイクロバスキュラークリップにより 1 週間結紮する、導管結紮唾液腺傷害（唾液腺傷害）モデルへ移植し、移植片の生着・分化について免疫染色で評価した。さらに、R-spondin1 依存的に発現上昇する遺伝子についてマイクロアレイで網羅的に発現解析を行い、2 倍以上の発現上昇を認めた遺伝子群の中から、以下に示すスクリーニングを行った。まず、CHIR (GSK3B 阻害剤) 処理による Wnt/ β -カテニン経路活性でも同様に発現上昇をするものであり、かつ免疫染色による唾液腺オルガノイドの細胞膜表面に発現を認めた新規の Wnt 標的遺伝子を同定した。同定した標的遺伝子の唾液腺オルガノイドでの発現細胞の局在や、傷害モデル唾液腺における発現を RT-qPCR 法と免疫染色法にて解析した。そして、唾液腺オルガノイドからフローサイトメトリーによる標的遺伝子発現細胞を単離し、オルガノイド培養法を用いて細胞特性の解析を行った。

【結果】成体唾液腺由来上皮細胞は単一細胞から唾液腺様のオルガノイドを形成し、1 年以上の長期培養・継代維持が可能であった。唾液腺オルガノイドには Aqp5 陽性細胞、Krt19 陽性細胞が認められた。R-spondin1 は、オルガノイドサイズの増大と細胞増殖の活性化を誘導し、さらに上記各種分化マーカーの発現、および既知の唾液腺幹細胞マーカー群の発現を低下させた。唾液腺オルガノイドを傷害モデル唾液腺に移植したところ、R-spondin1 誘導オルガノイド (RSPO1-オルガノイド) のみ生着を認めた。さらに、マイクロアレイにて RSPO1-オルガノイドで発現上昇する遺伝子を解析し新たに Aquaporin3 (Aqp3) を同定し

た。RSPO1-オルガノイドのうち、Aqp3 陽性オルガノイドは多房性構造を、陰性オルガノイドは球形構造を示し、陽性オルガノイドのサイズは有意に増大していた。成体正常唾液腺において、Aqp3 陽性細胞は導管部にごく少数存在し、傷害モデル唾液腺の導管部で Aqp3 陽性細胞数は著しく増加した。唾液腺オルガノイドでの Aqp3 陽性細胞の局在は、既知の唾液腺幹/前駆細胞マーカーである CD49f は基底細胞層に発現しているのに対し、Aqp3 は基底層直上の細胞層に発現していた。一方で、同じく既知の幹/前駆細胞マーカーである Sca-1 (Stem cell antigen-1) もまた基底層直上の細胞層に発現し、Sca-1 陽性細胞の一部は Aqp3 を共発現していたため、フローサイトメトリーにより Sca-1 陽性細胞を単離することで Aqp3 陽性細胞を唾液腺オルガノイドから単離することができた。単離した細胞をオルガノイド培養すると多数のオルガノイドを形成した。

【結論】成体マウスの顎下腺より長期間、継代・維持可能で、多分化能を有する唾液腺オルガノイドを作成することに成功した。R-spondin1 はオルガノイドの増殖を促進し、脱分化を誘導するとともに、一部の幹細胞マーカーの発現を減少させたことから Wnt 依存的な新規唾液腺前駆細胞の存在が示唆された。また、RSPO1-オルガノイドのみ傷害モデル唾液腺に生着したことから、新規唾液腺前駆細胞の組織再生・修復への関与が示唆された。さらに、Wnt 依存的に唾液腺細胞で発現が増加する標的遺伝子として Aqp3 を同定し、Aqp3 陽性オルガノイドは高い増殖能を有すること、傷害モデル唾液腺にも Aqp3 陽性細胞が増加することから、Aqp3 陽性細胞は唾液腺の組織再生・修復に関与する新規の Wnt 依存的唾液腺前駆細胞であると考えられた。