



## PRESS RELEASE

### ヒト iPS 細胞から唾液腺オルガノイドの作製に成功 -口腔乾燥症の治療や唾液腺疾患モデルへの応用に期待-

#### 本研究成果のポイント

- ヒト iPS 細胞<sup>[1]</sup>から作出した唾液腺オルガノイド<sup>[2]</sup>は構造的にも機能的にもヒト唾液腺組織に極めて近い性格を示しました。
- 免疫不全マウスに同所移植した唾液腺オルガノイドは導管の接続と成熟した唾液腺への分化を示しました。
- 新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）に暴露した唾液腺オルガノイドでは、感染細胞の中でウイルスが複製していることが確認されました。
- 唾液腺オルガノイドは、新型コロナウイルスの唾液腺感染メカニズムの解析に適したモデルとなることが明らかとなりました。
- 唾液腺オルガノイドは、唾液分泌障害に対する再生医療、薬剤開発および唾液腺疾患モデルとしての応用が期待されます。

昭和大学（東京都品川区、学長：久光正）歯学部口腔病態診断科学講座口腔病理学部門の田中準一講師、美島健二教授、国立感染症研究所の泉福英信室長（現：日本大学松戸歯学部教授）と鶴見大学歯学部病理学講座の斎藤一郎教授（現：株式会社クレインサイエンス代表）らを中心とした共同研究グループは、ヒト iPS 細胞から唾液腺オルガノイドの作製に成功しました。本研究成果は、これまで昭和大学を中心とした研究グループがマウス ES 細胞<sup>[3]</sup>より作出した唾液腺オルガノイド（*Nat Commun.* 2018）に引き続いて行われた世界に先駆けた成果となります。

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、ヒト iPS 細胞から誘導した口腔粘膜上皮から唾液腺の分化過程を段階的に再現し、三次元的な唾液腺器官の再生に成功しました。今回、iPS 細胞から誘導した唾液腺原基（唾液腺オルガノイド）は、形態学的な特徴や遺伝子発現解析からもヒト胎生期の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免疫不全マウスに、誘導唾液腺を同所性移植することにより、唾液腺オルガノイド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。

今回得られた唾液腺オルガノイドは、唾液腺発生メカニズムの解析はもとより、唾液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。本成果は英国の科学雑誌『*Nature Cell Biology*』（10 月 17 日付：日本時間 10 月 18 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<sup>[4]</sup>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、齶蝕、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が、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。

これまで昭和大学を中心とした研究グループは、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ていました (*Nat Commun.* 2018)。

今回、共同研究グループはマウス唾液腺オルガノイドの作製方法を応用することにより、試験管内でヒト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) ヒト iPS 細胞から唾液腺オルガノイドを誘導

唾液腺は胎生期の原始口腔粘膜から発生することが知られているため、まずヒト iPS 細胞から原始口腔粘膜の誘導を試みました。その結果、iPS 細胞の細胞凝集塊を TGF $\beta$  のインヒビター存在下で浮遊培養することでヒト iPS 細胞から効率よく非神経系の外胚葉である原始口腔粘膜が誘導されることが明らかとなりました。さらに唾液腺の分化に重要と考えられている成長因子である FGF7 と FGF10 を作用させ、長期間浮遊培養を継続しました。分化誘導開始後約 60 日で細胞凝集塊の中に唾液腺と類似した分枝構造を持った組織が発生することがわかりました。さらにこの構造を単離し培養を継続することで分枝構造をもつ組織だけを培養することができました (図 1)。

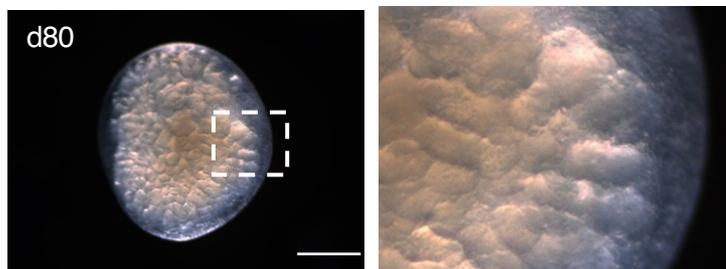


図 1: ヒト iPS 細胞から誘導された分枝構造を示す唾液腺オルガノイド

組織学的な解析の結果、この分枝構造を示す組織は胎生期唾液腺と非常に類似した構造を持ち、唾液腺の構成細胞である導管細胞、基底細胞、腺房細胞、筋上皮細胞が極性を保って配列していました (図 2)。

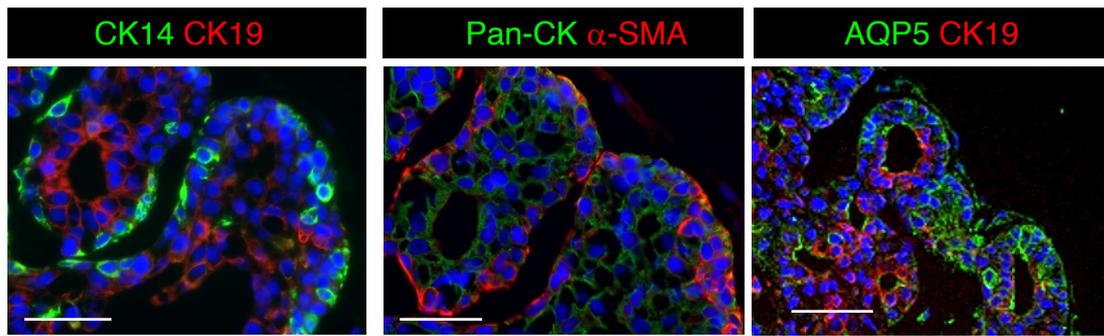


図 2: 唾液腺オルガノイドは、CK19 陽性の導管 (左図. 赤)、 $\alpha$ -SMA 陽性の筋上皮細胞 (中図. 赤)、AQP5 陽性の腺房細胞 (右図. 緑) が配列しており胎生期唾液腺組織に類似していました。

さらに詳細な解析として、RNA-sequence およびシングルセル RNA-sequence を行った結果、誘導した唾液腺オルガノイドは唾液腺特異的な遺伝子を発現し、他の外分泌腺組織 (膵臓、涙腺) などのマーカー遺伝子の発現は認められませんでした。これらの結果から、ヒト iPS 細胞から分化誘導された組織は胎生期唾液腺と非常に類似した組織であることが示され、ヒト唾液腺オルガノイドが誘導されていることが明らかとなりました。

2) 唾液腺オルガノイドは耳下腺切除マウスへの同所移植により周囲組織との関係を保って生着

次にこの唾液腺オルガノイドが、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、耳下腺を完全に切除した免疫不全マウスへの同所移植を行いました。この際、耳下腺の排出導管と唾液腺オルガノイドが接続するようにガイド糸を用いて移植を行いました。移植後1ヶ月で唾液腺オルガノイドは、移植部位に生着し、移植前の唾液腺オルガノイドと比較して成熟した唾液腺へと分化しました。さらに移植した唾液腺オルガノイド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構築されていることが明らかとなりました (図 3)。

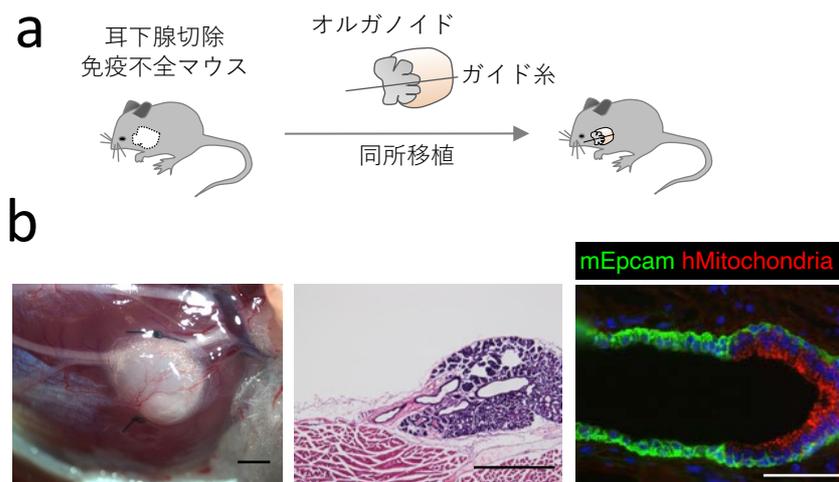


図 3: 唾液腺オルガノイドの同所移植

a: ヒト iPS 細胞由来唾液腺オルガノイドを耳下腺切除部位の排出導管部位へ移植しました。

b: 唾液腺オルガノイドは移植後一ヶ月で移植部位に生着し (左図)、HE 染色により成熟した唾液腺組織の構造を示しました (中図)。さらに唾液腺オルガノイド (赤) は宿主の排池部導管 (緑) へ接続していました (右図)。

### ss 唾液腺オルガノイドを用いた SARS-CoV2 感染様式の解析

次にこの唾液腺オルガノイドを用いて新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）の感染実験を行いました。新型コロナウイルス感染者の剖検例の解析により患者唾液腺からコロナウイルスが検出されることが既に報告されています。実際に我々の誘導した唾液腺オルガノイドにも新型コロナウイルスの感染に必要な ACE2、TMPRSS2 が発現していることがわかりました。誘導した唾液腺オルガノイドに新型コロナウイルスを感染させると感染 72 時間後には組織学的に導管の内腔側の細胞に新型コロナウイルスの核蛋白が検出され（図 4a）、電子顕微鏡でも唾液腺オルガノイド内でウイルスの複製が起こっている様子が観察されました（図 4b）。さらにウイルス粒子は培養上清からも検出され、オルガノイドで複製されたウイルス粒子が培養上清へ放出されていることが示されました。

これらの結果は COVID-19 患者の唾液腺組織内でも、同様にウイルスの複製が起き、唾液中にウイルス粒子を放出させている可能性を示唆するものでした。

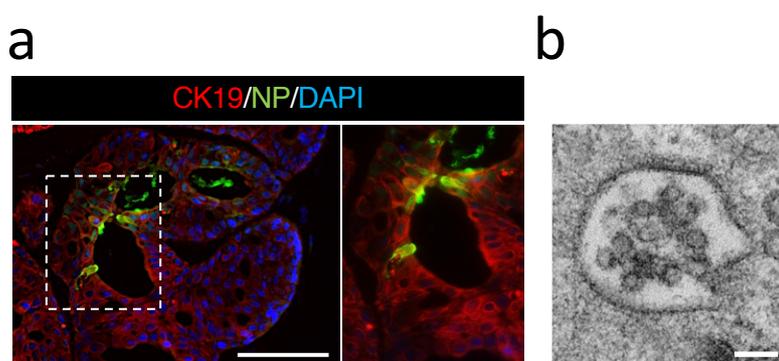


図 4：誘導された唾液腺オルガノイドに新型コロナウイルスを感染させました。

a：感染 72 時間後には CK19 陽性の導管細胞の内側（赤）に新型コロナウイルスの核蛋白が検出されました（NP：緑）。

b：感染 72 時間後の電子顕微鏡像。唾液腺オルガノイドの細胞内にウイルス粒子の集積が認められました。

### 3. 今後の期待

今回の研究ではヒト iPS 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、ヒト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、疾患モデルとして疾患の病因・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。実際に本研究で唾液腺における新型コロナウイルスの感染、および複製を試験管内でモデル化することに成功し、唾液腺がウイルスのリザーバーとなる可能性が明らかとなりました。加えて、この唾液腺オルガノイドを用いて唾液腺腫瘍やシェーグレン症候群などの唾液腺疾患の解析が進展するものと期待されます（図 5）。

## ヒト唾液腺オルガノイドの活用

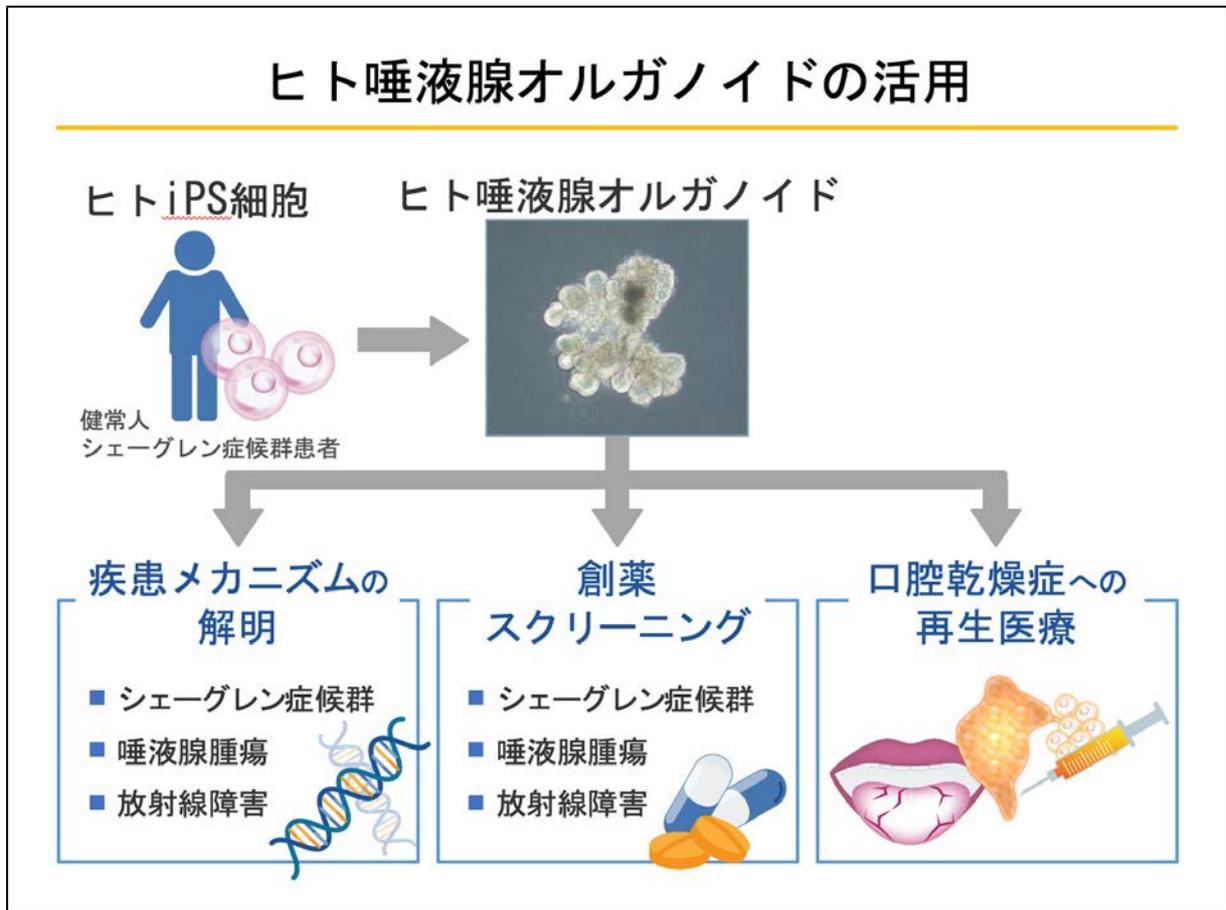


図 5：ヒト唾液腺オルガノイドは唾液腺の再生医療、創薬や疾患モデルとして期待されます。

#### 4. 論文名と著者

“Human induced pluripotent stem cell-derived salivary gland organoids model SARS-CoV-2 infection and replication”

Junichi Tanaka<sup>1,2\*</sup>, Hidenobu Senpuku<sup>3,4</sup>, Miho Ogawa<sup>5</sup>, Rika Yasuhara<sup>1</sup>, Shintaro Ohnuma<sup>1</sup>, Koki Takamatsu<sup>6</sup>, Takashi Watanabe<sup>7</sup>, Yo Mabuchi<sup>8</sup>, Shiro Nakamura<sup>9</sup>, Shoko Ishida<sup>1</sup>, Tomohiko Sadaoka<sup>10</sup>, Takashi Takaki<sup>11</sup>, Tatsuo Shiota<sup>6</sup>, Toshikazu Shimane<sup>12</sup>, Tomio Inoue<sup>9</sup>, Takayoshi Sakai<sup>13</sup>, Munemasa Mori<sup>2</sup>, Takashi Tsuji<sup>5</sup>, Ichiro Saito<sup>14</sup>, and Kenji Mishima<sup>1\*</sup>.

(\*corresponding author)

<sup>1</sup>, Division of Pathology, Department of Oral Diagnostic Sciences, Showa University School of Dentistry, Tokyo 142-8555, Japan.

<sup>2</sup>, Columbia Center for Human Development and Division of Pulmonary, Allergy, Critical Care, Department of Medicine, Columbia University Irving Medical Center, New York, NY, USA

<sup>3</sup>, Department of Bacteriology I, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640, Japan

<sup>4</sup>, Department of Microbiology and Immunology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba 271-8587, Japan.

<sup>5</sup>, Laboratory for Organ Regeneration, RIKEN Center for Biosystems Dynamics Research (BDR), Kobe, 650-0047, Japan.

<sup>6</sup>, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Showa University School of Dentistry, Tokyo 145-8515, Japan.

<sup>7</sup>, Laboratory for Integrative Genomics, RIKEN Center for Integrative Medical Sciences (IMS), Yokohama 230-0045, Japan.

<sup>8</sup>, Intractable Disease Research Centre, Juntendo University School of Medicine, Tokyo 113-8421, Japan.

<sup>9</sup>, Department of Oral Physiology, Showa University School of Dentistry, Tokyo 142-8555, Japan.

<sup>10</sup>, Division of Clinical Virology, Center for Infectious Diseases, Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe 650-0017, Japan.

<sup>11</sup>, Division of Electron Microscopy, Showa University, Tokyo 142-8555, Japan.

<sup>12</sup>, Head and Neck Oncology Center, Showa University, Tokyo 142-8555, Japan.

<sup>13</sup>, Department of Oral-Facial Disorders, Graduate School of Dentistry, Osaka University, Osaka 565-0871, Japan.

<sup>14</sup>, Department of Pathology, Tsurumi University School of Dental Medicine, Yokohama 230-8501, Japan.

## 5. 論文および雑誌情報等

*Nature Cell biology*

DOI: 10.1038/s41556-022-01007-6.

URL: <https://www.nature.com/articles/s41556-022-01007-6>

## 6. 補足説明

### [1] 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す。

### [2] 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です。

### [3] ES 細胞

胚性幹細胞。受精卵の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 つです。

### [4] 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 つです。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ます。

## 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・本件に関する問い合わせ先>

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

E-mail: [mishima-k@dent.showa-u.ac.jp](mailto:mishima-k@dent.showa-u.ac.jp)

<本件リリース元>

学校法人 昭和大学 総務部 総務課 大学広報係

TEL: 03-3784-8059

E-mail: [press@ofc.showa-u.ac.jp](mailto:press@ofc.showa-u.ac.jp)