

令和元年6月19日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11459

研究課題名(和文) 唾液腺腫瘍組織発生における多様性獲得機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the acquisition mechanism of heterogeneity in salivary gland tumorigenesis

研究代表者

入江 太朗 (Irie, Tarou)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：00317570

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は唾液腺腫瘍組織発生における多様性獲得機構を解析するモデルマウスの作製に取り組んできた。現在、最も遺伝子変位の悪影響がないゲノム部位に腫瘍を引き起こす仕組みを組み込んだ遺伝子を導入したマウスが完成し、交配を進めている所である。ヒト正常唾液腺細胞株を用いた腫瘍原性遺伝子の役割解析では唾液腺細胞の種類(分化)に依存してその役割が異なる可能性が明らかとなった。新たに完成した遺伝子変異マウスが今後唾液腺腫瘍組織発生の研究に大きな役割を果たすことが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唾液腺腫瘍は極めて多彩な組織像を呈する上、30種類以上の腫瘍型や種々の亜型が存在しており、病理診断上の鑑別診断を困難にしている。病理診断は治療方針決定や予後判定に重要であることから、唾液腺腫瘍組織発生における多様性獲得機構の理解に立脚した唾液腺腫瘍の新たな疾患概念構築への貢献が、本研究成果の学術的・社会的意義である。

研究成果の概要(英文)：Our investigations focus on improvement of mouse model for elucidation of the acquisition mechanism of heterogeneity in salivary gland tumorigenesis. Now new mouse model that salivary gland tumor-driven transgene inserted into Rosa26 locus in the mouse genome is completed. Our observations that has been made clear by investigations of role of salivary gland tumor-driven gene in human normal salivary glands cell lines are that this gene may play a dual role in salivary gland tumorigenesis in cell specific manner. Our new mouse model play a key role in research for salivary gland tumorigenesis.

研究分野：病理学

キーワード：唾液腺腫瘍 腫瘍組織発生 疾患モデルマウス 多様性 病理診断 唾液腺腫瘍分類

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

唾液腺腫瘍は臨床病理学的には頭頸部腫瘍の約 5~6%を占め、そのうち約 40%は悪性腫瘍である。唾液腺腫瘍の大部分は上皮性腫瘍であるが、極めて多彩な組織像を呈する上、30 種類以上の腫瘍型や種々の亜型が存在しており、さらに分類が異なる腫瘍型にもかかわらず部分的に共通した組織像を有することから、病理診断上の鑑別診断を困難にしている。唾液腺腫瘍における病理診断は治療方針決定や予後判定に重要であることから、唾液腺腫瘍の組織発生における多様性獲得機構の詳細な理解に立脚した新たな唾液腺腫瘍の疾患概念の構築は、治療成績と患者の QOL 向上に対して大きな意義を持つと考えられる。

唾液腺腫瘍の組織型は多彩ではあるものの、大きく 3 つの組織構築パターンに大別される。管腔側細胞(導管上皮/腺房細胞)よりなるもの、管腔側細胞と非管腔側細胞(筋上皮/基底細胞)よりなるものと非管腔側細胞のみからなるものである。現在の癌幹細胞の概念は、「クローナル進化」の考え方が一般的となりつつあるが、これは単一のクローンに由来する細胞集団の中で遺伝子変異の蓄積によりさらに別の形質を獲得したクローンが選択されていくと言う概念であり、これは分化方向が規定された異なる癌幹細胞が階層化を成すことを意味する。我々は「クローナル進化」の概念を唾液腺腫瘍の組織構築パターンに応用し、唾液腺腫瘍の多様性は分化方向が規定された異なる腫瘍幹細胞に基づいており、それぞれの腫瘍幹細胞は階層化を成すという仮説を立てた。最近では乳癌において管腔側細胞のみあるいは非管腔形成細胞のみに腫瘍原性遺伝子変異を発現させることにより組織型の多様性や生物学的悪性度を制御し得ることが明らかにされていることから唾液腺腫瘍においても同様の検証が可能であることが期待された。

### 2. 研究の目的

正常な唾液腺組織において、特定の唾液腺細胞のみを人為的に腫瘍化し、唾液腺腫瘍に特徴的な多様性に富む組織構築の形成過程を詳細に病理組織学的に捉えることを可能とする腫瘍発生モデル構築を目指して、任意の唾液腺構成細胞が時期・由来細胞特異的に腫瘍原性遺伝子 Plag1 を発現するコンディショナルトランスジェニックマウスを作出する。このマウスを用いて「正常な唾液腺組織内において、特定の細胞のみが遺伝子変異を生じて腫瘍組織を形成する」現実の腫瘍発生様式を完全に再現し、腫瘍幹細胞の起源の違いにより個々の唾液腺腫瘍の組織型の多様性が制御可能であることを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

- (1) 起源の異なる腫瘍幹細胞を含むことが予想される特定の唾液腺細胞群において時期特異的に腫瘍原性遺伝子 Plag1 を過剰発現するコンディショナルトランスジェニックマウスの作出  
唾液腺組織において腺房細胞に分化し得る腫瘍幹細胞を含むことが予想される SOX9 陽性細胞群に腫瘍化を引き起こすトランスジェニックマウスの作出

Plag1 をコンディショナルに過剰発現するトランスジェニックマウス (CAG-Z-EGFP-Plag1 Tg mouse) と SOX9 CreER マウスの交配により作製する。

唾液腺組織において非管腔細胞の基底細胞と筋上皮細胞に分化し得る腫瘍幹細胞を含むことが予想される Keratin 14 陽性細胞群に腫瘍化を引き起こすトランスジェニックマウスの作出

CAG-Z-EGFP-Plag1 Tg mouse と Keratin 14 Cre マウスの交配により作製する。

唾液腺組織において筋上皮細胞に分化し得る腫瘍幹細胞を含むことが予想される MYH11 陽性細胞群に腫瘍化を引き起こすトランスジェニックマウスの作出

CAG-Z-EGFP-Plag1 Tg mouse と Myh11 CreER マウスの交配により作製する。

唾液腺組織において全ての構成細胞の全腫瘍幹細胞を含むと考えられる CAG 陽性細胞群に腫瘍化を引き起こすトランスジェニックマウスの作出

CAG-Z-EGFP-Plag1 Tg mouse と CAG CreER マウスの交配により作製する。

- (2) 正常唾液腺細胞における Plag1 遺伝子の役割の検討

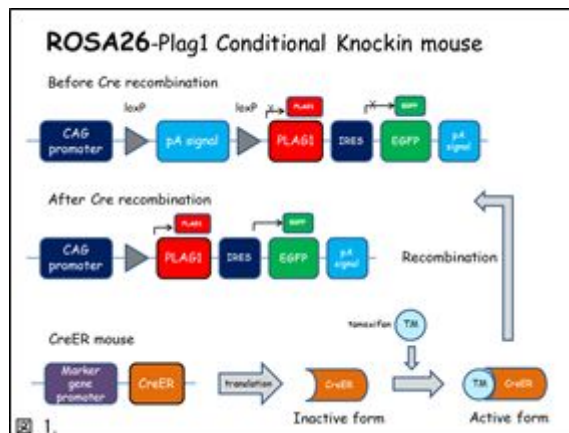
正常唾液腺腺房細胞株(NS-SV-AC)、正常唾液腺導管上皮細胞株(NS-SV-DC)と正常唾液腺筋上皮細胞株(NS-SV-MC)を用いて Plag1 遺伝子過剰発現細胞株を作成し、正常唾液腺細胞株との機能的比較により Plag1 遺伝子の正常唾液腺細胞における働きを明らかにする。

### 4. 研究成果

- (1) 起源の異なる腫瘍幹細胞を含むことが予想される特定の唾液腺細胞群において時期特異的に腫瘍原性遺伝子 Plag1 を過剰発現するコンディショナルトランスジェニックマウスの作出について

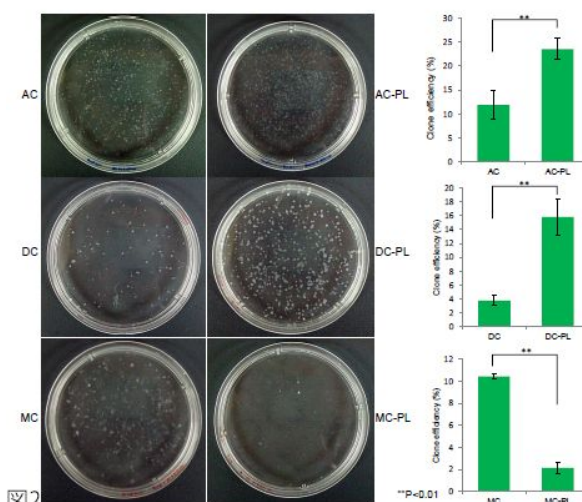
Plag1 遺伝子をコンディショナルに過剰発現するトランスジェニックマウスと上記の - の交配により、それぞれのプロモーター特異的に Cre ないし CreER を発現し、かつ Plag1 遺伝子過剰発現のための導入遺伝子の両者をそれぞれヘテロに有するマウスの作出には成功した。Cre を発現するマウスについてはそのまま、CreER を発現するマウスに対しては生後 10 日前後で tamoxifen を投与し長期経過観察を行ったが、唾液腺腫瘍の発生はいずれも確認できなかった。そのため、Plag1 遺伝子過剰発現のための導入遺伝子をホモで有し、Cre ないし CreER 遺伝子をヘテロに有するマウスの作製に取り組んだ。SOX9 のプロモータで

CreER が誘導されるトランスジェニックマウス、Keratin 14 のプロモーターで Cre を発現するトランスジェニックマウスと CAG プロモーターで CreER が発現するトランスジェニックマウスについては、それらの遺伝子をヘテロに有し、Plag1 遺伝子過剰発現のためのトランス遺伝子をホモで有するマウスを作製した。いずれも少なくとも 10 ヶ月以上の経過観察を行ったがそれらのマウスに唾液腺腫瘍の発生は確認されなかった。我々が作製した CAG-Z-EGFP-Plag1 Tg mouse においてトランス遺伝子のゲノム挿入位置やコピー数が腫瘍組織発生の効率に悪影響を与えている可能性を考慮し、セーフ・ハーバー部位とされる Rosa 26 locus に PLAG1 遺伝子のノックインコンストラクトを挿入した遺伝子改変マウス(図 1)の作製に取り組んだ。現在、この遺伝子改変マウスが完成し、上記 3 . (1) の - の交配を進めている所である。



## (2) 正常唾液腺細胞における Plag1 遺伝子の役割の検討

PLAG1 遺伝子の正常唾液腺細胞における機能的役割を明らかにするためにヒト正常唾液腺腺房細胞株(NS-SV-AC)、-導管細胞株(NS-SV-DC)と-筋上皮細胞株(NS-SV-MC)にレンチウイルスを用いて PLAG1 遺伝子を導入し PLAG1 定常過剰発現細胞株(NS-L-SV-AC-PL, NS-L-SV-DC-PL, NS-L-SV-MC-PL)を樹立した。その影響について検討を行った。PLAG1 遺伝子の導入はいずれの細胞の形態にも影響を与えなかったが、NS-L-SV-AC-PL と NS-L-SV-DC-PL のコロニー形成を亢進したが、NS-L-SV-MC-PL のコロニー形成を抑制した(図 2)。また PLAG1 遺伝子過剰発現により NS-L-SV-AC-PL と NS-L-SV-MC-PL の遊走を亢進し、NS-L-SV-DC-PL の遊走を抑制した。PLAG1 遺伝子は正常唾液腺組織においては細胞種依存性にその働きが異なる可能性がより確実となった。



## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Tanaka J, Ogawa M, Hojo H, Kawashima Y, Mabuchi Y, Hata K, Nakamura S, Yasuhara R, Takamatsu K, Irié T, Fukada T, Sakai T, Inoue T, Nishimura R, Ohara O, Saito I, Ohba S, Tsuji T, Mishima K. Generation of orthotopically functional salivary gland from embryonic stem cells. Nature communications, 査読有, 9(1):4216, 2018. doi: 10.1038/s41467-018-06469-7.

Koyama T, Uzawa K, Yamano Y, Miyamoto I, Hiroshima K, Kimura Y, Irié T, Kasamatsu A, Endo-Sakamoto Y, Ito H, Tanzawa H. An unusual case of focal cemento-osseous dysplasia occupying nearly the entire maxillary sinus and arising from adjacent tissue of fused teeth. J Oral Maxillofac Surg Med Pathol, 査読有, 30:336-341, 2018.

Bin BH, Bhin J, Takaishia M, Toyoshima K, Kawamata S, Ito K, Hara T, Watanabe T, Irié T, Takagishi T, Lee SH, Jung HS, Rho S, Seo J, Choi DH, Hwang D, Koseki H, Ohara O, Sano S, Tsuji T, Mishima K, Fukada T. Requirement of zinc transporter ZIP10 for epidermal development: implication of the ZIP10-p63 axis in epithelial homeostasis. Proc Natl Acad Sci U S A, 査読有, 114(46):12243-12248, 2017. doi: 10.1073/pnas.1710726114.

Ohashi W, Kimura S, Iwanaga T, Furusawa Y, Irié T, Izumi H, Watanabe T, Hijikata A, Hara T, Ohara O, Koseki H, Sato T, Robine S, Mori H, Hattori Y, Watarai H, Mishima K, Ohno H, Hase K, Fukada T. Zinc Transporter SLC39A7/ZIP7 Promotes Intestinal Epithelial Self-Renewal by Resolving ER Stress. PLoS Genet, 査読有, 12(10):e1006349.

doi: 10.1371/journal.pgen.1006349, 2016.

〔学会発表〕(計 7 件)

小笠原 正人, 首藤 政親, 田中 ゆき, 亀田 健治, 入江 太郎, 山下 雅大, 田村 晴希, 山田 ありさ, ミトコンドリア蛋白 Prohibitin1 の翻訳後修飾による脂肪滴およびその関連蛋白の変化, 日本ミトコンドリア学会, 2018

入江 太郎, 田中 準一, 安原 理佳, 福島 美和子, 河野 葉子, 美島 健二, Recurrent sialadenoma papilliferum of the buccal mucosa, 日本病理学会, 2017

安原 理佳, 田中 準一, 川嶋 章弘, 福島 美和子, 入江 太郎, 関沢 明彦, 美島 健二, 脂肪幹細胞を活用した唾液腺再生メカニズムの解析, 日本病理学会, 2017

田中 準一, 大庭 伸助, 北條 宏徳, 馬淵 洋, 安原 理佳, 入江 太郎, 福島 美和子, 河野 葉子, 美島 健二, 唾液腺初期発生における転写因子の機能解析, 日本病理学会, 2017

田中 準一, 馬淵 洋, 安原 理佳, 入江 太郎, 福島 美和子, 河野 葉子, 美島 健二, Sox9 を介したマウス唾液腺組織幹細胞の機能解析, 日本病理学会, 2016

安原 理佳, 田中 準一, 福島 美和子, 入江 太郎, 河野 葉子, 美島 健二, 唾液腺由来筋上皮細胞の単離と性質解析, 日本病理学会, 2016

入江 太郎, 安原 理佳, 田中 準一, 福島 美和子, 河野 葉子, 東 雅之, 美島 健二, Role of pleomorphic adenoma gene 1 (PLAG1) in normal salivary gland cells, 日本病理学会, 2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.iwate-med.ac.jp/education/gakubu\\_in/dent\\_kouza/kokubyori/](http://www.iwate-med.ac.jp/education/gakubu_in/dent_kouza/kokubyori/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 美島 健二

ローマ字氏名: MISHIMA, Kenji

所属研究機関名: 昭和大学

部局名: 歯学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 50275343

研究分担者氏名: 安原 理佳

ローマ字氏名: YASUHARA, Rika

所属研究機関名: 昭和大学

部局名: 歯学部

職名: 講師

研究者番号(8桁): 20453649

研究分担者氏名: 田中 準一

ローマ字氏名: TANAKA, Junichi

所属研究機関名: 昭和大学

部局名: 歯学部

職名: 助教

研究者番号(8桁): 40710166

研究分担者氏名: 深田 俊幸

ローマ字氏名: FUKADA, Toshiyuki

所属研究機関名: 徳島文理大学

部局名：薬学部  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：70373363

研究分担者氏名：福島 美和子  
ローマ字氏名：FUKUSHIMA, Miwako  
所属研究機関名：昭和大学  
部局名：歯学部  
職名：助教  
研究者番号（8桁）：90548273

(2)研究協力者  
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。