

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19790

研究課題名(和文) 脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた、放射線による唾液腺障害の回復に関する研究

研究課題名(英文) Salivary gland regeneration after radiation damage by using adipose tissue derived stem cell

研究代表者

林 和彦 (Kazuhiko, Hayashi)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：70718981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪組織由来間葉系幹細胞(ADSC)を用いて放射線性唾液腺障害の回復をはかることを第一の目的とした。最初に放射線性唾液腺障害モデルマウスの作成を行い、照射線量依存性に唾液分泌低下が起こることを確認した。放射線照射後に唾液腺へADSCの投与をしても唾液分泌低下の改善はみられず、当初の予想とは反したものの、唾液腺障害の一因として神経障害の可能性を予想外に見出した。今後は神経障害の観点からの唾液腺機能改善の研究をしていきたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：The primary objective was to recover radiation salivary gland injury using adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (ADSC). First, we prepared radiation-induced salivary gland disorder model mice, and confirmed that salivary secretion was reduced due to irradiation dose. Administration of ADSC to the salivary glands after irradiation did not improve salivary secretion reduction, but contrary to the initial expectation. However, we unexpectedly found the possibility of neuropathy as a cause of salivary gland injury. We would like to study the improvement of salivary gland function from the viewpoint of neuropathy.

研究分野：放射線科学

キーワード：放射線治療 唾液腺障害 脂肪組織由来幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 頭頸部は呼吸や摂食嚥下、発声に関わる重要な部位であり、その頭頸部癌は全癌患者のうち約5%を占める。頭頸部癌に対する根治療法としては手術と抗がん剤、放射線治療が挙げられるが、このうち手術は上記機能の低下をもたらす術後の生活の質を著しく低下させるため、放射線治療の占める割合が大きい。放射線治療によって生じる重大な有害事象の一つとして、唾液分泌障害が挙げられる。これは唾液分泌を行う耳下腺、顎下腺、舌下腺に放射線が照射されることで生じる。放射線治療開始から数週間後に口渇感や嚥下困難感が出現し、放射線治療終了後も回復せず後遺症として遺残することが少なくない。唾液分泌障害は口渇感のみならず、誤嚥や齲歯、体重減少といったリスクを上昇させる。この唾液分泌障害の発生を回避するため、三次元原体照射法や強度変調放射線治療法などを用いて唾液腺への放射線照射量を減らす試みがこれまでなされているが、原発巣やリンパ節転移部位がそもそも唾液腺に近接していることも多いため、満足のいく結果は得られていない。現状では唾液分泌障害に対する対処法としては、唾液分泌促進薬(セビメリン塩酸塩水和物や塩酸ピロカルピン)による対症療法しか存在しない。

(2) 近年、骨芽細胞、脂肪細胞、筋細胞、軟骨細胞などに分化する能力をもつ間葉系幹細胞を用いた骨や心筋などの再生医療が注目を集めている。間葉系幹細胞は骨髓や臍帯血、脂肪組織などから採取可能であるが、そのうち脂肪組織由来間葉系幹細胞(ADSC)は安全かつ容易に、大量に採取できる点で優れている。ADSCは既に臨床において手術による骨欠損部位の骨再生(Lendeckel S et al. *J Craniomaxillofac Surg* 2004;32:370-3)やクローン病患者の瘻孔改善(Garcia-Olmo D et al. *Dis Colon Rectum* 2005; 48: 1416-23)、放射線治療後の慢性消化管潰瘍の改善(Rigotti G et al. *Plast Reconstr Surg* 2007;119:1409-22)、閉塞性硬化症の血流改善(Sanz-Ruiz R et al. *Cell transplant* 2009;153:245-254)などに用いられ、良好な結果が示され始めている。このADSCを放射線照射後のマウス唾液腺に注入すると、唾液分泌障害が一部改善したという結果が既に報告されている(Kojima T et al. *The Laryngoscope*. 2011;121:1864-69)。また骨髓由来間葉系幹細胞を用いた同種の研究でも、放射線照射によって障害された唾液腺が分泌機能を回復したことが報告されている。(Lim et al. *Oral Oncology*. 2013;49:136-43、Lin C-Y et al. *J Dental Research*. 2011;90:341-6)。

2. 研究の目的

頭頸部癌における根治的放射線治療の副作用としての唾液腺分泌障害を脂肪組織由

来間葉系幹細胞(ADSC)を用いて回復させる方法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)放射線性唾液腺障害モデルマウスの作成
C57B6Lマウス(メス、6週齢)をソムノペンチルで不動化し、顎部領域以外を鉛ブロックで遮蔽し、0 Gy, 5 Gy, 10 Gyの放射線照射を行った。照射後4週間後に唾液量を測定した。唾液測定は、マウスをソムノペンチルで不動化した後に塩酸ピロカルピンを投与し、20分間に流出する唾液を脱脂綿へ吸収させ、その重量を測定した。唾液指数は、唾液量(mg)/体重(g)と定義した。

(2)放射線照射後の唾液腺幹細胞の割合の測定

マウスの唾液腺へ放射線照射した1ヶ月後にマウスを安楽死させ、マウス顎下腺の中の唾液腺幹細胞の割合を、唾液腺細胞中のc-kit陽性細胞と定義し、フローサイトメトリーを用いて調べた。

(3)ADSCの回収

C57B6Lマウス(メス、6週齢)を炭酸ガスにて安楽死させ、皮下脂肪を剥離し、コラゲナーゼ処理を行い、脂肪細胞を分離した。DMEM/F12にTGF β 、FGFを添加した培地(幹細胞用培地)を用いて培養を行った。フローサイトメトリーで、ADSCのマーカーであるCD90を発現している細胞の割合を解析した。

(4)放射線で障害された唾液腺へADSCを移植し唾液分泌改善するかの確認

C57B6Lマウス(メス、6週齢)をソムノペンチルで不動化し、顎部領域以外を鉛ブロックで遮蔽し、0 Gy, 10 Gyの放射線照射を行った。照射4週間後に唾液測定を行ったのちにADSC100万個を顎下腺内に注入した。照射8週間後に唾液量を測定した。

(5)放射線で障害された唾液腺へグリア細胞株由来神経栄養因子GDNFを注入し唾液分泌改善するかの確認

C57B6Lマウス(メス、6週齢)をソムノペンチルで不動化し、顎部領域以外を鉛ブロックで遮蔽し、0 Gy, 10 Gyの放射線照射を行った。照射4週間後に唾液測定を行ったのちにGDNF 1 μ gを顎下腺内に局所注入した。照射8週間後に唾液量を測定した。

(6)唾液腺内の神経線維の可視化

放射線照射による神経障害で唾液分泌低下が起こるかどうかを検証するために、0 Gy, 10 Gy照射後1ヶ月で、CUBIC法による唾液腺の透明化処理を用いたホールマウント免疫染色法を用いて解析を行った。神経線維を染色するために抗Tubb3抗体を使用した。

4. 研究成果

(1)放射線性唾液腺障害モデルマウス

図1に示すように、唾液指数は線量依存性に低下した。

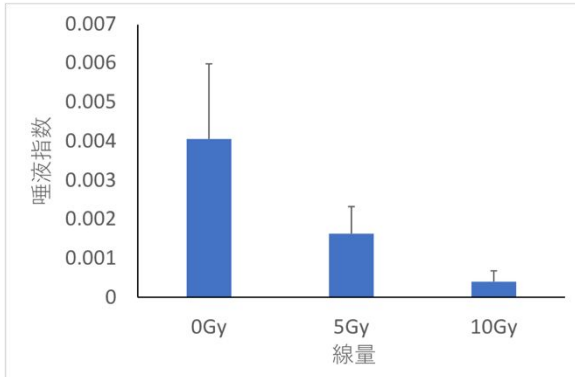


図1. 放射線照射による唾液腺分泌低下

(2) 放射線照射後の唾液腺幹細胞の割合の測定

マウス顎下腺に10 Gy照射後1ヶ月で唾液分泌低下していることを確認後、顎下腺をコラゲナーゼ処理し、フローサイトメトリーでc-kit陽性細胞の割合を解析した。当初は唾液分泌低下が唾液腺幹細胞の減少に起因するのではと考えていたが、実は幹細胞自体は放射線照射後も同程度存在する(非照射唾液腺細胞の0.11%対10Gy照射後唾液腺細胞の0.13%)ことが明らかになった。

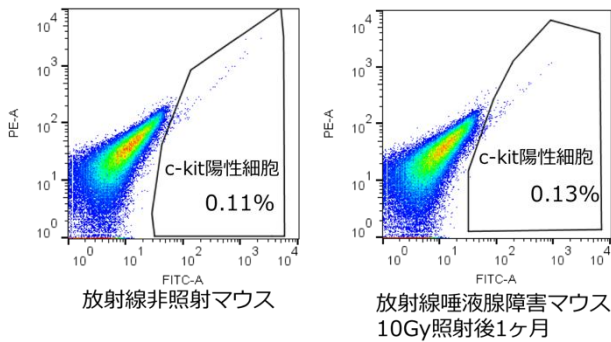


図2. 放射線照射後の唾液腺幹細胞の割合の解析

(3)ADSC の検証

マウス脂肪組織から幹細胞用培地で2週間継代培養したのちに、表面マーカーCD90の発現状況をFACSで測定すると、isotype controlと比較し、CD90陽性分画が70%と高発現であり、この脂肪由来細胞がADSCが濃縮されている細胞集団と言えることが明らかとなった(図3)。

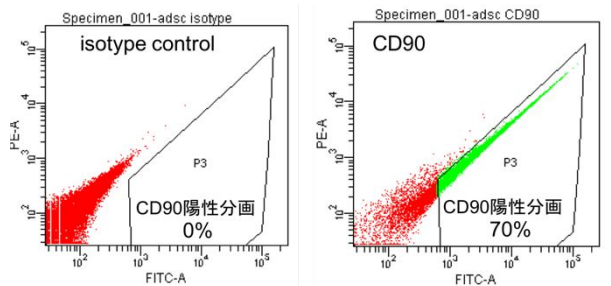


図3. CD90を用いたADSCの検証

(4) 放射線で障害された唾液腺へADSCを移植し唾液分泌改善するかの確認

放射線照射群と放射線照射+ADSC移植群の間に統計的に唾液分泌量の差はなかった(図4)。1回目の実験では観察期間が短いためかとも考えられ、より経過観察期間を長くした2回目の実験も行ったが、唾液分泌量に統計学的な差は認められなかった。以上の結果から、放射線10Gyを照射した後に唾液腺内にADSCを移植しても、唾液腺は明らかな再生・機能改善をみることはできなかった。

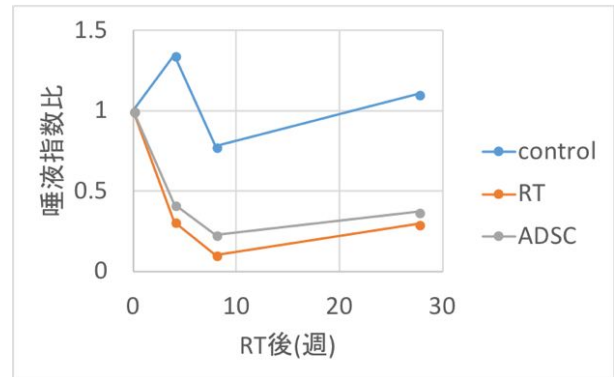
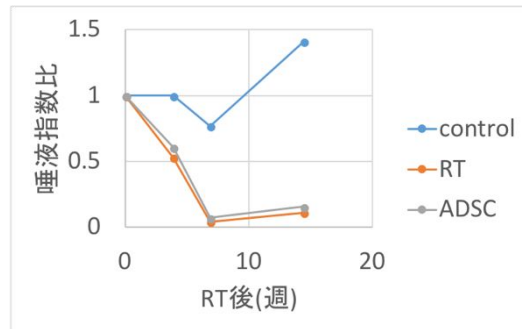


図4. ADSC注入後の唾液分泌量測定(上:実験1回目、下:実験2回目)

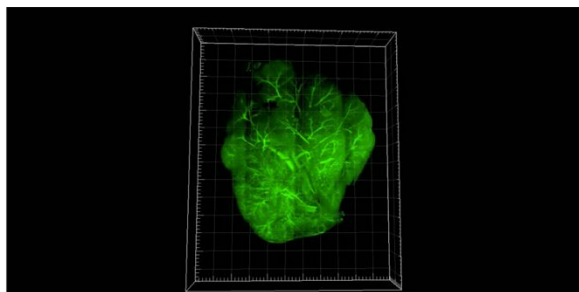
(5) 放射線で障害された唾液腺へグリア細胞株由来神経栄養因子GDNFを注入し唾液分泌改善するかの確認

幹細胞刺激作用の報告のあるGDNFを照射後に唾液腺内に注入することで唾液分泌機能回復が得られるかの検証実験も行なったが、明らかな改善はなかった。

(6)唾液腺内の神経線維の可視化

ホルマウント免疫染色を用いてマウス顎下腺の立体的な神経線維の走行を解析した。結果、非照射の唾液腺に比べ、照射後の唾液腺では神経走行が少なくなっていることが明らかとなった。今後は神経障害に着目した唾液腺障害回復の研究を行なっていく予定である。

非照射



10Gy後2ヶ月

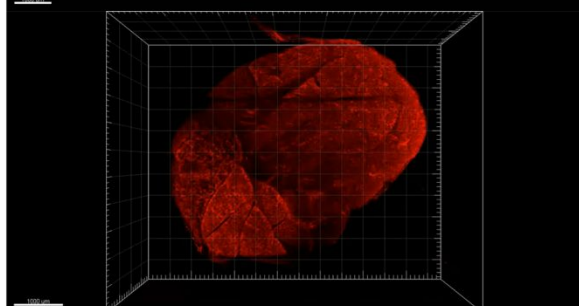


図 5. ホールマウント免疫染色を用いた唾液腺内の神経線維の可視化

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

林 和彦 (HAYASHI, Kazuhiko)
大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員
研究者番号：70718981

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし