

令和元年6月12日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11490

研究課題名(和文)唾液腺組織再生における低酸素応答の役割：新規組織再生法の開発

研究課題名(英文) Role of the hypoxic response of regeneration in salivary gland

研究代表者

笠原 正貴 (Kasahara, Masataka)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：30328265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：唾液腺欠損を治療するために、全身性に低酸素応答を誘発させたPHD2ノックアウトマウスから得られた脂肪組織を使用して脂肪由来幹細胞を初代培養した。低酸素環境下の培養でも、タモキシフェン投与による低酸素応答ONの条件下でも、増殖能が有意に増加したことが確認された。生体為害性がなく、薬物や成長因子、脂肪由来幹細胞を保持しつつ、適度な速度で吸収される足場を開発することとした。生体為害性のない、足場としてのatelocollagen/gelatin複合体の作製に成功した。本研究成果は、英文誌において発表した(Dental Materials Journal, 36, 429-437, 2017)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唾液腺は再生力が弱く、病的障害や外科的傷害を受けた唾液腺は通常、萎縮もしくは消失する過程をたどる。申請者は、低酸素応答は血管形成の促進や酸素環境の改善を図ることから、低酸素応答を制御することにより、唾液腺組織の再生が期待できると考えた。

低酸素応答を惹起させた脂肪由来幹細胞を唾液腺欠損部位に局所適用することで、副作用のない組織再生法を開発することが本研究の目的である。低酸素応答下での脂肪由来幹細胞の増殖能が増加したこと、足場としての毒性のないatelocollagen/gelatin複合体を新しく開発したこと、両者に組み合わせによって、困難な唾液腺組織再生を促す可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aim to evaluate tissue regeneration abilities of stem cells, such as adipose tissue-derived stem cells isolated from PHD2 conditional knockout mice and potential applications for stem cell therapy. We evaluated the effects of PHD2 knockout on adipose tissue-derived stem cells behaviors and regeneration abilities. We confirmed the cells growth and proliferation under the hypoxic condition. we have developed an easier way to fabricate atelocollagen/gelatin (ACG) sponge with lyophilization technique. The highlight of this method is no using toxic crosslinking reagents and no further washing to remove residual toxic substances compared with previous published methods. Thus, this ACG sponge has no toxic effects for the cells. We have already reported (Dental Materials Journal, 36, 429-437, 2017).

研究分野：薬理学

キーワード：低酸素応答 組織再生 唾液腺

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

### 1. 研究開始当初の背景

低酸素状態に対する生体反応(低酸素応答)は、主に転写因子 hypoxia inducible factor (HIF) によって制御されているが、その HIF もまた“低酸素センサー”であるプロリン水酸化酵素 (PHD2) によって負に制御されているため (Minamishima et al, Blood 2008)、PHD2 が失活した細胞では HIF が活性化し、低酸素応答が恒常的に観察されるようになる (Minamishima and Kaelin, Science 2010)。HIF はエリスロポエチン (EPO) による造血を誘導し、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) や platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide (PDGFRB)、さらに basic fibroblast growth factor (bFGF) などの発現を誘導する。その結果、血管形成が促進され、最終的に酸素環境を改善する作用がある (Rey and Semenza, Cardiovasc Res, 86, 236-242, 2010)。PHD 阻害薬を用いた研究において申請者らは、極めて生命予後の悪い乳酸アシドーシスに対して、肝臓の低酸素応答を起動することで、マウスの生存率を著明に改善する機構を明らかにした (Suhara\*, Hishiki\*, Kasahara\*, ..., Minamishima, PNAS 2015. \*Equally contributed)。また、PHD 阻害薬の全身投与により、皮弁壊死の予防に有用であることを示した報告もある (Takaku et al, PLoS One, 7, e4296, 2012)。

唾液腺は再生力が弱く、病的障害や外科的傷害を受けた唾液腺は通常、萎縮もしくは消失する過程をたどる。申請者はこれまでに、細胞内酸素濃度センサー-PHD2 を阻害することによる、臓器の恒常的な低酸素応答機構について研究を行ってきた。低酸素応答は血管形成の促進や酸素環境の改善を図ることから、低酸素応答を制御することにより、唾液腺組織の再生が期待できると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究目的は以下の3課題である。

#### (1) PHD 阻害薬が顎下腺組織の低酸素応答に及ぼす影響

顎下腺管から逆行性に PHD 阻害薬 (FG4592) を投与し、顎下腺組織における低酸素応答機構を明らかにする。低酸素応答によって活性化される、代謝反応 (解糖系) に関わる酵素群やトランスポーターの遺伝子発現量、さらには低酸素応答によって誘導される VEGF や PDGFRB、bFGF などの遺伝子発現量を Real-time RT-PCR で評価し、顎下腺組織における低酸素応答を検証する。

#### (2) PHD 阻害薬が顎下腺組織の創傷治癒に及ぼす影響

ラット顎下腺に円形の欠損を与えた『顎下腺創傷治癒モデル』を用いて、PHD 阻害薬 (FG4592) が顎下腺組織の創傷治癒に及ぼす影響ならびにそのメカニズムを明らかにする。組織再生に関わるマーカー (線維芽細胞、筋上皮細胞、導管上皮細胞、幹細胞など) の遺伝子発現量、さらにマイクロダイセクションにより唾液腺組織を腺房細胞と導管細胞とに分け遺伝子発現を解析し、低酸素応答による顎下腺組織再生の特性を明らかにする。

#### (3) 顎下腺損傷部位に適用した bFGF や EGF と PHD 阻害薬との協力作用

顎下腺損傷部位への『bFGF または EGF—コラーゲン複合体の適用』と、PHD 阻害薬 (FG4592) の導管逆行性投与による『顎下腺組織—低酸素応答 ON』の組み合わせが、唾液腺組織再生において有効かどうかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 当初の研究計画

##### ラット顎下腺の“低酸素応答活性化モデル”の作製

本研究を実施するにあたり、ラット顎下腺の“低酸素応答活性化モデル”を確立する。そのモデルにおいて活性化する酵素群やトランスポーター、誘導される遺伝子発現量を解析する。

##### PHD 阻害薬が顎下腺の創傷治癒に及ぼす影響の解析

PHD 阻害薬 (FG4592) が顎下腺組織の創傷治癒に及ぼす影響ならびにそのメカニズムを解析する。

##### 顎下腺損傷部位に適用した bFGF や EGF と PHD 阻害薬との協力作用の検討

顎下腺損傷部位への bFGF または EGF—コラーゲン複合体の適用と、PHD 阻害薬 (FG4592) の組み合わせが、唾液腺組織再生において有効かどうかを検討する。

#### (2) 実際の研究方法

ラット顎下腺における「低酸素応答活性化モデル」の作製を行う前に、タモキシフェン投与により全身性に低酸素応答を発現させた PHD2 ノックアウトマウス (PHD2 flox/flox; Cre-ER) を用いて、低酸素応答が唾液腺を含む各臓器に発現するかどうか、またそのメカニズムを検証することとした。

PHD2 ノックアウトマウスから得られた脂肪由来幹細胞を用い、その分化能の検討と低酸素応答 (タモキシフェン投与による低酸素応答 ON、低酸素環境下の培養) による増殖能の検討を行った。

bFGF または EGF とコラーゲンを組み合わせてラット顎下腺損傷部位に適用することで、幹細胞や筋上皮細胞、腺房細胞の増殖や分化が促進するかどうかを検証した。

脂肪由来幹細胞を局所に適用するための足場の開発を行った。

#### 4. 研究成果

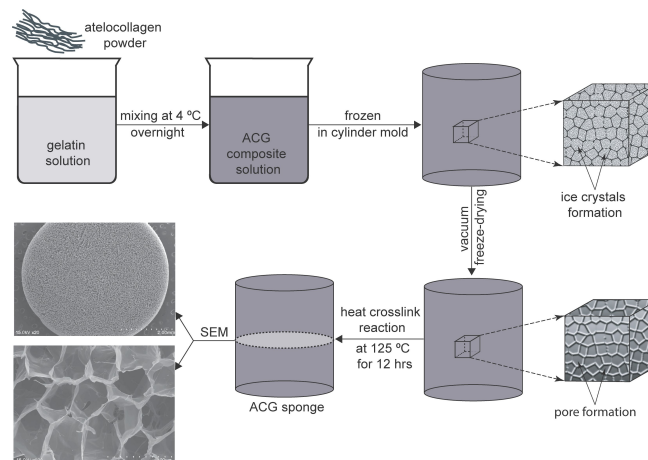
(1) 低酸素応答時に増加する転写因子 HIF1、HIF2 を検出するために、ウエスタンブロッティング法における条件検討を行った。まず RCC4 細胞および 786-0 細胞を用いて検討を行った。その結果、HIF1、HIF2 とともに検出できることを確認した。次に 12 時間 1% 酸素下に培養した HeLa 細胞を用いて検討を行った。その結果、低酸素状態に置かれた HeLa 細胞から、HIF1、HIF2 が検出されることを確認できた。すなわち、HIF1、HIF2 の抗体が機能していることを確認できた。

タモキシフェン投与により全身性に低酸素応答を誘発させた PHD2 ノックアウトマウスから得られた各種臓器（唾液腺、骨髄、脂肪組織、線維組織）の細胞を初代培養した。培地中乳酸値が有意に上昇していることが確認できた。

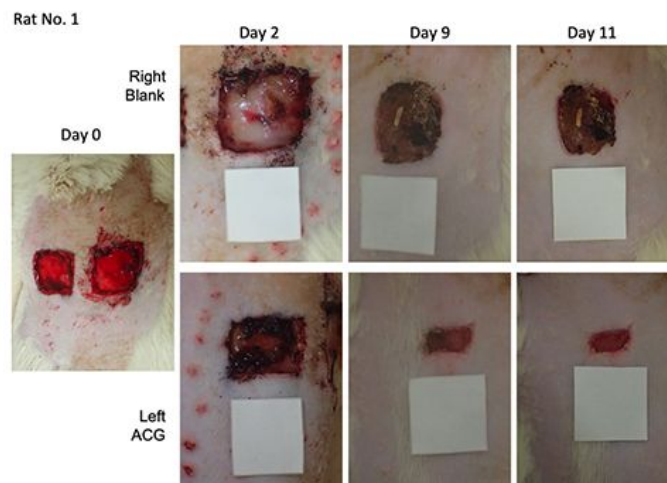
(2) マウス鼠径部の脂肪から採取した脂肪組織を使用して、脂肪由来幹細胞を初代培養した。低酸素環境下の培養でも、タモキシフェン投与による低酸素応答 ON の条件下でも、増殖能が有意に増加したことが確認された。

(3) bFGF または EGF とコラーゲンを組み合わせてラット顎下腺損傷部位に適用することで、幹細胞や筋上皮細胞、腺房細胞の増殖や分化が促進するかどうかを検証した。その結果、幹細胞や筋上皮細胞の増殖や分化が促進することや、腺房細胞と考えられる細胞の増殖を確認し、唾液腺組織再生の可能性が示された。以上の結果を踏まえて、まずは脂肪由来幹細胞を唾液腺損傷部位に局所適用することとした。また、生体為害性がなく、薬物や成長因子、幹細胞を保持しつつ、適度な速度で吸収される足場を開発することとした。

(4) 生体為害性のない、足場としての atelocollagen /gelatin 複合体の作製に成功した (Yang..., Kasahara et al, Dental Materials Journal, 36, 429-437, 2017)。



また、ラット皮膚創傷モデルにおいて、足場としての atelocollagen /gelatin 複合体による創傷治癒促進効果を確認ができた。



以上から、現在、atelocollagen /gelatin 複合体と脂肪由来幹細胞の組み合わせにおいて、脂肪由来幹細胞の増殖能や分化能において検討している。また、今後唾液腺組織、皮膚組織への適用を検討している。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Yang, L., Tanabe, K., Miura, T., Yoshinari, M., Takemoto, S., Shintani, S., Kasahara M: Influence of lyophilization factors and gelatin concentration on pore structures atelocollagen/gelatin sponge biomaterial. Dental Materials Journal, 36:429-437, 2017
2. Kobayashi, F., Abe, H., Kasahara M, Horikawa, T., Matsuzaka, K., Inoue, T: Epidermal growth factor promotes the proliferation and differentiation on progenitor cells during wound healing of rat submandibular glands. Clinical Dentistry and Research, 40:87-94, 2016

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：松坂 賢一

ローマ字氏名：Matsuzaka Kenichi

所属研究機関名：東京歯科大学

部局名：歯学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 70266568

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。