

令和 元年 5月 27日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11714

研究課題名(和文) 唾液腺幹細胞様細胞・器官共存培養系による新規唾液腺再生療法の確立

研究課題名(英文) Study of salivary gland regeneration by stem-like cell and organ culture.

研究代表者

平木 昭光(Hiraki, Akimitsu)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：60404034

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)：分化、発育能が高い胎齢12.5日のマウス胎子の顎下腺原基を用いて器官培養を行い、放射線を単照射してその顎下腺に傷害を加え、その回復についての研究を行った。EGFとFGF7/10をはじめとする増殖因子は、正常顎下腺の発育や機能を促進させると共に、障害を受けた顎下腺において、低下した発育と機能を回復させる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線療法は口腔癌の標準治療の1つで、その有効性は高く必要不可欠なものである。しかし効果とは反面、晩期障害として口腔乾燥が高頻度で出現し、治療の遂行や治療後のQOLに大きな影響を及ぼす。唾液腺の機能低下は重要な問題であるが、修復・再生の確立は得られていない。その障害された唾液腺の修復・再生のメカニズムを解明することは、口腔乾燥という合併症を軽減し、QOLの向上が期待される点で学術的・社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：We investigated the involvement of some growth factors, such as EGF, FGF, KGF and HGF, in growth and regeneration in irradiated salivary gland. These growth factors promote branching morphogenesis and amylase expression in salivary gland of embryonic day 12.5 mouse. We suggested EGF and FGF7/10 could recover decreased ability of growth and functions of irradiated salivary gland.

研究分野：外科系歯学

キーワード：唾液腺 再生 分化

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

1. 研究開始当初の背景

高齢化とともに癌の罹患率は上昇し、日本における大きな社会問題となっている。高齢のため手術を回避し、放射線治療を選択する機会が増加することが予想される。しかし、放射線により照射野にある唾液腺が傷害されることによって生じる口腔乾燥により、治療後のQOLの低下が懸念される。唾液腺の残存機能を標的とした塩酸セベメリンやピロカルピン塩酸塩などの唾液分泌促進薬が臨床応用されているものの対症療法が中心で、その効果には限界があるのが現状である。

近年、iPS細胞による臓器再生の研究が進み、肝臓や腎臓などの立体臓器の再生が確立されつつある (cell stem cell 2013, Nature Communications 2013)。唾液腺においては器官原基法によって再生し、マウスの体内で機能したとの報告 (Nature Communications 2013) はあるものの、それ以降大きな進展はない。唾液腺は多彩な細胞より構成されている組織学的特異性や唾液腺幹細胞が同定されていないことなどが原因と考えられる。しかし、これらの細胞の起源とされる幹細胞を同定、分離、培養することによって、唾液腺再生への道が開けると考えられた。

申請者は以前より、低カルシウム無血清培地を作成し、ヒトやマウスの唾液腺組織から未分化で均一な唾液腺幹細胞様細胞を分離・培養できることを確認していた。その細胞は高カルシウム濃度環境下やEGF刺激によって2次的に腺管様配列を誘導でき、機能的には分化マーカーであるアミラーゼのタンパクおよび遺伝子レベルでの発現増加が認められた。形態学的には電子顕微鏡による超微構造の成熟変化を確認された。つまりその唾液腺細胞は形態的、機能的に分化誘導が示唆され、唾液腺幹細胞の性質を持つ可能性を示唆した (J.Cell.Physiol 2002)。

また、マウス胎児顎下腺原基の器官培養を行い、その分子形成に関与する増殖因子について報告した (Developmental Dynamics.2003)。

これらの唾液腺培養の技術を用いて、唾液腺機能の分化と修復・再生法の開発についての研究を予定した。

2. 研究の目的

分離培養した唾液腺幹細胞様細胞や器官培養法を用いて、放射線照射による唾液腺の生物学的変化や修復、再生機構を明らかにする。

本研究の目的

放射線が唾液腺の分化・増殖に及ぼす生物学的変化の解明

唾液腺器官培養と唾液腺幹細胞様細胞を用いた放射線障害唾液腺の修復・再生法の確立

3. 研究の方法

i) 顎下腺器官培養

胎齢12.5日のマウス (CL57BL/6) 胎子の顎下腺原基を摘出して器官培養を行う。2種類の外植片 (顎下腺原基と舌下腺原基を含んだもの それらに舌筋の一部を含んだもの) を作製して、DMEM/F12培地にて器官培養を行う。

ii) 放射線照射量を決定

0, 1, 5, 10Gyの4段階に分けて顎下腺器官培養組織に単照射し、使用する照射量を決定する。

iii) 顎下腺器官培養と発育

外植片 および 舌筋 に関し、放射線照射の発育に関する検討を行う。

iv) 顎下腺器官培養組織の機能的変化

アミラーゼタンパク、AQP5を唾液腺の機能マーカーとして用いて検討を行う。

v) 障害唾液腺の機能低下に関連するタンパクの同定

網羅的タンパク解析・定量を行うか、もしくは再生、修復に関連する増殖因子を検索する。

vi) 顎下腺器官培養組織を用いた唾液腺機能低下関連タンパクの作用

同定した唾液腺機能低下関連タンパクを障害唾液腺に刺激し、その反応を検索する。

4. 研究成果

I. 放射線が唾液腺の分化・増殖に及ぼす生物学的変化の解析

i) 顎下腺器官培養と発育

胎齢12.5日のマウス (CL57BL/6) 胎子の顎下腺原基を摘出し、2種類の外植片 (顎下腺原基と舌下腺原基を含んだもの それらに舌筋の一部を含んだもの) を作製して、DMEM/F12培地にて器官培養をおこなった。

器官培養を行いながら、1日おきに分枝形成数 (唾液腺小葉の形成数) を計測した (図1)。外植片 A、外植片 Bともに培養開始4日に最大となった。外植片 Aでは培養開始日と比較して約10倍の増加を示し (図2)、舌筋が付着したが外植片 Bでは培養開始日と比較して約40倍の発育を示した (図3)。

図1 分枝形成数

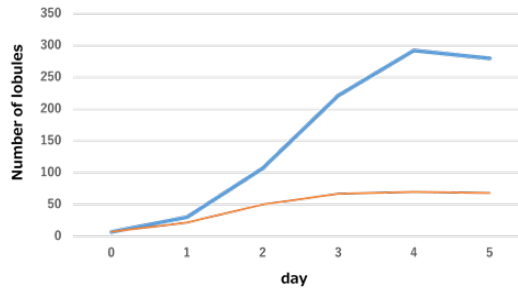


図2 外植片 の分枝形成像

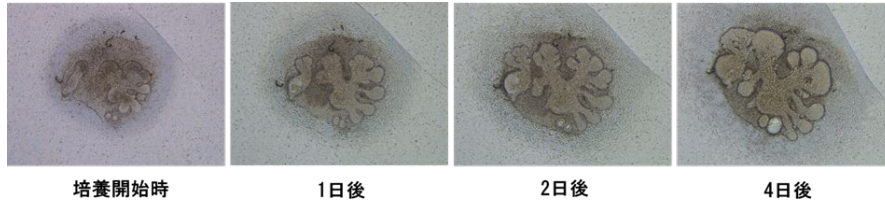
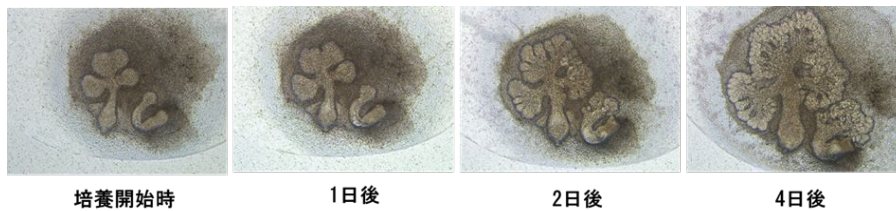


図3 外植片 の分枝形成像



ii) 放射線照射量を決定

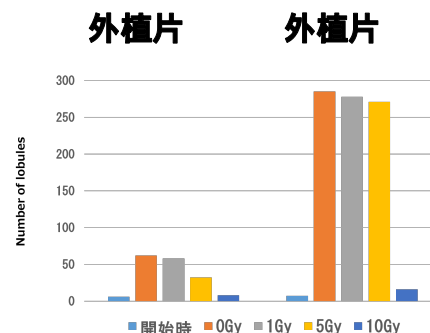
0, 1.0, 5, 10 Gy の 4 段階に分けて 2 種類の唾液腺器官培養組織（外植片、）に単照射し、4 日後に分枝形成数の測定を行った。

外植片 では 0Gy, 1.0Gy 照射では分枝形成数はほぼ同数で、培養開始時から約 10 倍の発育を示し、放射線照射の影響は認めなかった。5.0Gy 照射では培養開始時の約 5 倍、10Gy 照射では分枝形成数はほとんど増加しなかった（約 1 倍）（図 4）。

一方、外植片 では 0Gy, 1.0Gy, 5Gy 照射では分枝形成数はほぼ同数で、培養開始時から約 40 倍の発育を示し、放射線照射の影響は認めなかった。10Gy 照射においては培養開始時の 2 倍の分枝形成数の増加を認めた（図 4）。

このように外移植片 では放射線照射による影響が少なくなっており、舌筋から放出される成長因子などにより、唾液腺としての機能障害を受けにくい可能性が示唆された。

図4 分枝形成数

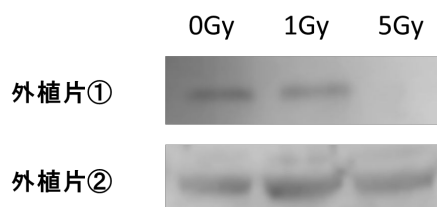


iii) 顎下腺器官培養組織の機能的変化

器官培養組織を溶解し、アミラーゼタンパクをマーカーとしてウエスタンブロット法にて解析した。

外植片 では 1Gy 照射で変化はなかったが、5Gy 照射でアミラーゼタンパクの減少を認めた（図 5）。外植片 では 1Gy, 5Gy 照射共にコントロールと変化はなかった（図 5）。放射線照射 5Gy で外植片 と の差異が認められ、唾液腺周囲の舌（筋肉）や結合組織が唾液腺の分化・増殖・修復に関与している可能性が示唆された。

**図5 アミラーゼタンパク
の発現**



II. 唾液腺の機能低下に関連するタンパクの解析

i) 障害唾液腺の機能低下に関連するタンパクの同定

唾液腺組織の増殖・分化に関連すると考えられている EGF、HGF、KGF、FGF について検討した。

外植片① と ② の組織からタンパクを抽出し、唾液腺組織の増殖・分化に関連すると考えられている EGF、HGF、KGF、FGF について、ウエスタンブロットで解析した。その結果、4 種の成長因子すべてにおいて外植片① より外植片② に多く発現が認められた。唾液腺周囲の筋肉や結合組織から産生される増殖因子や発育した外植片自体からの発現によるものと予想された。

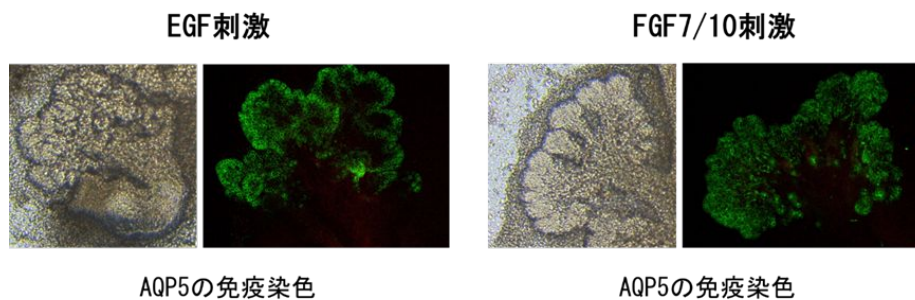
唾液腺障害前後で増殖因子がどのように変化するかを解析した。外植片① と外植片② は共に、それらの増殖因子はタンパク発現が減少していた。また、唾液腺の機能マーカーであるアミラーゼタンパクも同様に発現の減少を認め、障害前後で差異が認められた。しかしながら唾液腺周囲の筋肉や結合組織が付随している外植片② はその影響が少なかった。それらの増殖因子は唾液腺の機能低下に関連する可能性が示唆された。

ii) 顎下腺器官培養組織を用いた唾液腺機能低下関連タンパクの作用

前述の増殖因子の中で再現性が優れている EGF と FGF7/10 の 2 種を、機能低下関連タンパクを作用する実験に用いることとした。また、外因性の増殖因子の影響が明瞭な外植片② を用いて、唾液腺機能低下関連タンパク作用の検討を行った。機能が低下した唾液腺に対し、2 つの増殖因子 (EGF と FGF7/10) にて刺激を行い、72 時間後に試料を採取し、その影響について検討した。

形態学的変化については分枝形成の数は 50% の増加を認めた。機能的変化についてはアミラーゼがタンパク・メッセージレベルでの回復傾向を示し、さらにアクアポリン 5 タンパク発現の増加を示した (図 6)。

図6 AQP5 の発現



まとめ

マウス顎下腺器官培養において、隣接する舌を含めて培養を行うと、コントロールと比較して分枝形成 (唾液腺小葉の形成) は増加し、発育が促進された。また、放射線照射によって障害を受けた唾液腺においても、隣接する舌を含めて培養を行うと、分枝形成の低下に対して抑制効果が認められた。さらに唾液腺機能の実験では、放射線照射によって機能マーカーであるアミラーゼタンパクの発現が減少するが、隣接する舌を含めて培養を行うと、その発現低下が抑制された。この隣接する舌には EGF、HGF、KGF、FGF の発現が認められていることから、その増殖因子による作用が考えられた。

放射線照射によって障害を受けた唾液腺に 2 つの増殖因子 (EGF と FGF7/10) にて刺激を行うと、分枝形成が 50% 回復した。また同時に、アミラーゼタンパクと AQP5 の発現が増加し、機能面での回復傾向が示された。

放射線によって唾液腺は傷害され、発育や機能の低下を示すが、EGF と FGF7/10 をはじめとする増殖因子によって、その障害を抑制する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

1. Salivary duct carcinoma treated with cetuximab-based targeted therapy: A case report. Kawahara K, Hiraki A, Yoshida R, Arita H, Matsuoka Y, Yamashita T, Koga K, Nagata M, Hirosue A, Fukuma D, Nakayama H.

Molecular and clinical oncology 4(6) 886-892, 2017. 査読あり.

2. Concurrent chemoradiotherapy with S1 in patients with stage III;IV oral squamous cell carcinoma: A retrospective analysis of nodal classification based on the neck node level. Murakami R, Semba A, Kawahara K, Matsuyama K, Hiraki A, Nagata M, Toya R, Yamashita Y, Oya N, Nakayama H.

Molecular and clinical oncology 4(2) 140-144, 2017. 査読あり.

〔学会発表〕(計 7件)

1. シェーグレン症候群を疑い、精査の結果全身性アミロイドーシスの診断に至った1症例
早見 太善, 中村 拓哉, 廣末 晃之, 永田 将士, 吉田 遼司, 平木 昭光, 篠原 正徳, 中山 秀樹

第26回日本口腔内科学会・第29回日本口腔診断学会 合同学術大会 2016年9月23日~24日

2. 肺転移巣に対するCetuximab併用化学療法が奏効した唾液腺導管癌の1例

川原健太, 吉田遼司, 平木昭光, 有田英生, 廣末晃之, 福間大喜, 中山秀樹

第40回日本頭頸部癌学会 2016年6月9日~10日

3. 口腔癌治療後の口腔乾燥に関する臨床的検討

首藤俊一, 平木昭光, 大林佑子, 安西寛真, 吉住潤子, 佐々木三奈, 橋本憲一郎, 池邊哲郎

第62回日本唾液腺学会学術集会 2017年11月25日

4. 口腔癌治療が唾液量および口腔湿潤度に及ぼす影響について

井殿文菜, 首藤俊一, 平木昭光, 安西寛真, 大林佑子, 池邊哲郎

第44回福岡歯科大学学会総会 2017年12月3日

5. 口腔癌手術後の唾液および口腔内環境の変化に関する検討

安西寛真, 首藤俊一, 大林佑子, 佐々木三奈, 勝俣由里, 吉住潤子, 橋本憲一郎, 池邊哲郎, 平木昭光

第63回日本口腔外科学会総会・学術大会 2018年11月2日~4日

6. 口腔癌治療による口腔内環境の変化について 唾液と口腔乾燥を中心に

安西寛真, 平木昭光, 首藤俊一, 大林佑子, 森志穂美, 勝俣由里, 佐々木三奈, 吉住潤子, 橋本憲一郎, 池邊哲郎

第45回福岡歯科大学学会総会・学術大会 福岡歯科大学 2018年12月9日

7. 歯科衛生士による口腔がん患者周術期口腔機能管理の取り組みとその効果について

田頭美穂, 石丸彩夏, 北向由紀, 常清美佑, 赤嶺利沙, 森紘一郎, 永島勝之, 田中文恵, 勝俣由里, 吉住潤子, 佐々木三奈, 橋本憲一郎, 平木昭光, 池邊哲郎

第37回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 2019年1月24日~25日

〔図書〕(計 1件)

1. お口からはじめましょう からだの健康 (水田祥代 他、共著) P18 - P19

医歯薬出版 2016年

〔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

https://www.fdcnet.ac.jp/col/info/teacher/teacher_general_medical_attendant_medical_dentistry

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：池邊 哲郎

ローマ字氏名：**Tetsuro Ikebe**

所属研究機関名：福岡歯科大学

部局名：口腔歯学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：**20202913**

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。