

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20621

研究課題名(和文) 萎縮顎下腺再生過程のin vitroにおける基礎的研究

研究課題名(英文) The fundamental research about the regeneration process of the submandibular gland in vitro.

研究代表者

白土 博司 (SHIRATSUCHI, Hiroshi)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：50710844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：ラット萎縮顎下腺を用いたスフェロイド培養にて、ラット生体外での唾液腺再生細胞の培養が可能となった。またラット顎下腺再生過程における細胞骨格変化とTGF-betaの相関を明らかにした。TGF-betaは顎下腺再生過程において存在する導管様構造物に局在を認めた。今後、スフェロイド培養系を用いて、唾液腺再生過程で種々のタンパク質の関与解析ができる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to evaluate the cell formation by using in vitro investigation for the salivary gland's cell. This study enabled us to assess the roles of the various proteins during regeneration of the submandibular gland. Additionally, the correlation between cytoskeleton and TGF-beta was detected in this study. TGF-beta was detected around the duct-like-structures during regeneration process. The result indicated that TGF-beta contributed the rat submandibular regeneration.

研究分野：口腔外科学、唾液腺の再生

キーワード：Salivary gland Atrophy Regeneration in vitro Aquaporin TGF-beta Cytoskeleton Duct ligation

1. 研究開始当初の背景

(1) 国内・国外の研究動向及び位置づけ

再生医療が全盛の昨今、唾液腺再生に関してはなかなか端緒を見つけれないのが現状である。その理由の一つに唾液腺組織の複雑さがある。唾液は腺房細胞にて産生されたのち、介在部導管、顆粒管(げっ歯類に特有)線状部導管を経て排泄導管が口腔内に開口する。また、介在部導管と腺房細胞は筋上皮細胞で覆われており、唾液分泌に密接に関与している。

現在、唾液腺再生医療に寄与する基礎的研究の1つとして唾液腺の主導管を結紮することによって作成する萎縮・再生実験動物モデルが有用であり、三大唾液腺組織で多少の違いはあるものの、一様のコンセンサスが得られている。

ラット顎下腺主導管結紮・解除を例にとると、先ず顕著で広範な腺房細胞の萎縮が始まり、小葉内導管の拡張と結合組織の増生が起きる。その後の結紮解除により、腺房細胞の再生が始まり、正常な顎下腺本来の構造に修復される。この腺房細胞の再生過程では、残存した腺房細胞の増殖以外の経路が存在するという報告(Takahashi S et al 2001, J Histo Cyto, 49,1557-1564)があり、そのoriginについて不明な部分が数多く残っている。

これまで、腺房細胞への再生能をもつ細胞は、介在部導管の上皮(Burgess KI et al 1996, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod)、導管様構造物の上皮(Tamarin A 1971 J Ultras Res, Takahashi et al 1992, Arch Histol Cytol, Takahashi S et al 1998, Int J Exp Pathol,)、あるいはterminal tubule cell(Hanks et al. 1971, Am J Anat)などに存在すると報告されている。

しかしながらそれらを構成する細胞がどのように増殖し、腺房細胞に分化するかについては未だ不明な点が多い。再生医療に繋がる基礎実験としてこの再生モデルは非常に有用なツールであり、今なお多くの研究者が使用している。

(2) 着想に至った経緯

われわれはこれまでラット顎下腺結紮モデルを用いてその再生過程における細胞外基質の変化を解析してきた(Ueda K et al. 2009, Int J Oral Maxillofac Surg 38,79-84、上田浩一郎 2008, 日大歯学 82, 139-146)。

再生過程における Tenascin, Fibronectin, laminin, type と collagen の局在を検索では、Tenascin と Fibronectin が導管様構造に観察され、laminin と type collagen は導管様構造と残存腺房細胞、新しく形成された腺房細胞周囲に肥厚した強い反応として認められた。このことは、ラット顎下腺再生過程において細胞外基質には drastic な変化が生じていることを表し、その変化は腺房細胞の再生に重要な役割を果たしていること

が示唆された。

この研究に引き続きわれわれは、同一の動物モデルを用い、Small Rho GTPase および β -catenin の局在変化について検討を行った(Shiratsuchi H et al. 2012, J Mol Hist 41,751-759)。その結果、腺房細胞再生、導管組織再生の両者に細胞骨格変化が関与しており、その細胞骨格変化は、腺房細胞では RhoA および RhoC によって、導管様構造物や介在部導管では Rac1 および β -catenin によって、それぞれ調節されていることが明らかになった。

しかしながら、これまで用いた萎縮・再生モデルではタンパクの機能解析が不十分であり、*in vitro* の系による解析が必要である。

現在まで、再生過程を検索できる *in vitro* の系は確立されておらず、今回の研究では *in vitro* の実験系を先ず確立し、さらにその系を利用して、これまで蓄積した *in vivo* でのタンパクの局在データを機能面で検証することを目的とする。

2. 研究の目的

唾液腺排出管閉塞性疾患として位置づけられる唾石症は、口腔外科の臨床において、診断・治療の両面において重要な一角をなす。唾石症では唾液の分泌障害により腺実質の変性、萎縮、壊死が惹起される。その腺実質の萎縮過程や再生の可能性について、われわれはこれまで顎下腺主導管結紮動物実験モデルを用い、唾液腺再生過程での細胞外基質の変化やその関連因子の局在について報告してきた(Ueda K et al. 2009, 2012 Shiratsuchi H et al. 2012)。

今回の研究では、*in vivo* において得てきた知見をもとに、顎下腺主導管結紮により萎縮させた顎下腺から得る細胞懸濁液を培養し、*in vitro* において唾液腺における細胞分化への過程を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物

8週齢の Wister 系雄性ラットを用いた。ラットの顎下腺主導管を静脈麻酔+局所麻酔下で剖出。チタンミニクリップにて結紮を行った。結紮は7日間継続した。結紮解除後、再生0、3、7、11、14日目にそれぞれ顎下腺を摘出し、パラフィン切片と凍結切片を製作した。これらは組織化学および免疫組織化学的検索に供した。

(2) 萎縮顎下腺より細胞懸濁液を製作

上記プロトコルにて萎縮させたラット顎下腺を摘出後、径2mm大になるまで細切。細切した組織をコラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ処理した後、ディスパーゼでさらに分散し細胞懸濁液の調整を行った。96U底プレートでスフェロイド培養を行った。

(3) スフェロイド培養における組織化学・免疫組織化学

【組織化学】

スフェロイド培養にて認められた細胞塊についてパラフィン切片を製作し、H-E 染色、PAS 染色にて形態の観察を行った。

【免疫組織化学】

Aquaporin-5、alpha-SMA、CK18、c-kit を認識する抗体を用いて、それらの局在を免疫組織化学的に解析した。

脱パラ後、抗原賦活を目的に TBE (tris borate EDTA) に 100 、60 分間浸漬。1% BSA-PBS で非特異的反応をブロックしたのち、希釈した 1 次抗体を 4 で over night した後 PBS で洗浄。その後、室温で HRP-標識の 2 次抗体を 60 分間反応させ、PBS で洗浄後、封入し、検鏡した。

(4) ラット顎下腺再生過程での組織化学・免疫組織化学

【組織化学】

再生過程にあるラット顎下腺から製作したパラフィン切片を用い、H-E 染色、PAS 染色を行い、顎下腺の萎縮・再生過程の確認を行った。

【免疫組織化学】

再生過程にある顎下腺から製作したパラフィン切片を用い、alpha-SMA、TGF-beta を認識する抗体を用いて、それらの局在を免疫組織化学的に解析した。免疫組織化学染色は上記(3)と同様に行った。

4. 研究成果

【スフェロイド培養の実施】

Wistar 系ラットについて全身麻酔・局所麻酔下に両側の顎下腺主導管を顎下部より切開を行うことで剖出し、チタンクリップで結紮し閉創。以後、7 日間の主導管結紮持続状態で飼育を行い、術後 7 日で両側顎下腺を摘出。その動物実験プロトコルにより採取した萎縮顎下腺を採取し半割を行い、その一方について凍結切片を製作し、萎縮の程度を確認した。萎縮が確認できた顎下腺から細胞懸濁液を作製し種々の細胞数に調整し、96 穴 U 底プレートに播種した。その結果、細胞の集合塊を形成した。HE および PAS 染色で形態を観察したところ U 底に接している部位に被膜様に細胞が並んでいる様子が確認された。

【スフェロイド培養における免疫組織化学】

上記プロトコルにて得られた集合塊に aquaporin-5 抗体を用い組織化学を行った。その結果、aquaporin-5 陽性の細胞が集合塊の中央部で観察された。

ついで、上記プロトコルにて得られた集合塊中央部に alpha-SMA、CK-18、c-kit 抗体を用い組織化学を行った。alpha-SMA 陽性

の細胞は細胞塊の中央部で観察され、CK-18 は negative study であった。また、c-kit 陽性細胞は細胞塊周囲で部分的に認められた。

【新たな target の探索】

新たな免疫染色の target を探索するため、従来から用いている動物実験モデルに則り、TGF-beta1 についてその局在と萎縮唾液腺再生過程との相関を検討した。TGF-beta1 は再生過程で観察される duct like structure(DLS)の外周に alpha-SMA 陽性を呈する筋上皮細胞の局在と一致して認められた。

DLS は未分化な細胞集団が内在されており、TGF-beta1 は唾液腺再生に寄与していることが示唆された。スフェロイド培養について TGF-beta1 の関与を今後検討する必要があると考えられた。

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 1 件)

T.Yasumitsu, O.Shimizu, H.Shiratsuchi, Y.Miyake, Y.Yonehara. The distributions of aquaporin-5, transforming growth factor-beta1 and laminin in the regeneration of atrophied rat submandibular glands after duct ligation. Journal of Oral Science, 査読有, in press(2018)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

白土 博司 (SHIRATSUCHI, Hiroshi)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：50710844

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()