

平成 22 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19592331

研究課題名(和文)

正常唾液腺培養細胞の維持と放射線照射唾液腺への移植による唾液腺再生の試み

研究課題名(英文)

Establishment of immortalized normal salivary glands epithelial cells and regeneration of salivary gland for post-irradiation

研究代表者

野口 一馬 (NOGUCHI KAZUMA)

兵庫医科大学 医学部 講師

研究者番号：50309473

研究成果の概要(和文)：

本研究は正常唾液腺培養細胞の長期培養を目指した培養法の開発と放射線照射後の萎縮腺組織への唾液腺細胞の移植による再生治療の可能性を検討することを目的とした。ヒト顎下腺より得られた正常細胞は、継代を続けていくと8継代目に細胞増殖速度が急速に低下する。これは細胞培養により p16 が増加した結果、RB 経路が停止する細胞老化であることを明らかにした。そこで、われわれは本培養細胞に mutant CDK4, cyclinD1, human Telomerase Reverse Transcriptase(hTERT)の3つの遺伝子を導入することで不死化に成功した。本培養細胞を放射線照射により唾液腺を破壊したヌードマウスに対し移植を試みたが、唾液腺は再生しなかった。さらにヒトの放射線治療後の唾液腺が再生のニッチとなりうるかを免疫組織学的に検討したところ、放射線照射後の唾液腺にはEGFが発現しておらず、唾液腺細胞を再生させるためのニッチとしては不十分であることが確認され、現在考えられている細胞移植による唾液腺再生は困難であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：

In individualized countries the majority of patients with head and neck cancer are treated with radiation therapy. Exposure of the major salivary glands to the ionizing radiation induced fibrosis fatty degeneration of the gland tissue and atrophy of the saliva-producing acinar cells. Saliva production is decreased in correlation with the irradiation dose and the gland volume exposed to the radiation field. Current management of radiation induced xerostomia includes the administration of saliva substitutes and sialogogues. Based on the principles of tissue engineering, we investigated the feasibility of engineering human salivary gland tissue for the treatment of salivary gland hypofunction. There are two major mechanisms that cause the limited life span of primary culture cells. One is the telomere-based senescence, and the other is telomere-independent senescence, which is thought to be controlled by the Rb/p16 and p53 pathways. To elucidate the regeneration of normal salivary gland cell, we established immortalized human salivary gland epithelial cell (hSalEC)s transduced with non-viral human gene (mutant Cdk4, cyclin D1, and hTERT). By Cdk4 and cyclinD1 transduction in combination with hTERT, we here established novel hSalEC cell line. This is a first report of successful establishment of hSalEC cells immortalization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：唾液腺・放射線・口腔乾燥・再生医療

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌に対する放射線治療やシェーグレン症候群により唾液腺の萎縮が引き起こされる。萎縮した唾液腺は十分な唾液を産生できないため、患者は日常的に粘膜の炎症を引き起こし、慢性的な疼痛、会話や食事の障害を訴える。口腔乾燥症の治療には、唾液様の成分を外から補う人工唾液や残存する腺組織からの分泌を促進する各種薬剤が用いられてきたが、症状の緩和にはつながっていない。高齢化社会を迎え、口腔乾燥はQOLの低下をもたらすものと考えられている。そのため、唾液腺そのものの修復もしくは再生を目指して正常唾液腺細胞を用いた実験が進められている。正常唾液腺細胞は腫瘍細胞と異なり、長期間培養することは非常に困難とされていたが、最近、種々の増殖因子を加えた低カルシウム濃度無血清培地を用いることでヒト唾液腺から未分化上皮細胞を得ることが可能となった。

2. 研究の目的

われわれはこの方法を改良し、正常唾液腺培養細胞を作成し、樹立した正常唾液腺培養細胞の腺組織への分化誘導とシグナル伝達経路の解析、さらには放射線照射後の萎縮腺組織への唾液腺細胞の移植による再生治療の可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト口腔がん頸部郭清後の顎下腺より正常唾液腺細胞を採取し、MCDB153を基礎培地としてEGF、インスリン、デキサメタゾンを経験的な濃度で添加し、最も適切な添加濃度を見出し、長期培養を試みた。

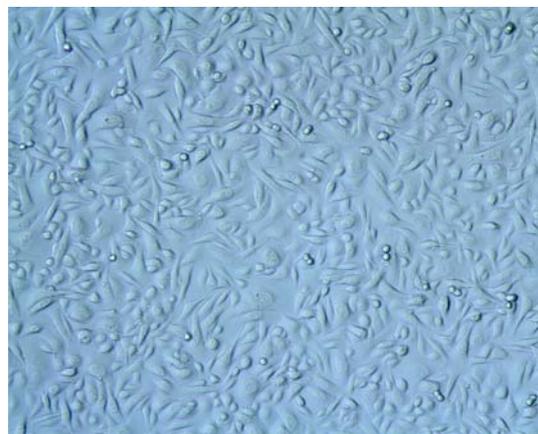
(2) ノードマウスに1Gyの放射線を7日間照射し、人為的に放射線性唾液腺萎縮を引き起こし、そこに上記のヒト正常唾液腺培養細胞をscaffoldとしてマトリゲルを用いて同所性移植を試みた。

(3) ヒト口腔がん患者で放射線治療を行った患者で術後頸部リンパ節転移を来した患者の顎下腺を免疫組織学的に検討し、萎縮顎下腺内に細胞が増殖するために必要なgrowth factorが存在するか否かを確認した。

4. 研究成果

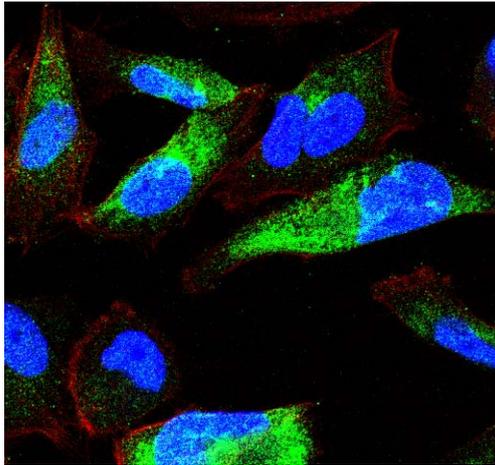
(1) ヒト顎下腺より得られた培養細胞は、乳腺培養細胞なども同様で、EGFなどの増殖因子を添加した低カルシウムの血清培地に

て培養を行っている。インスリンやデキサメタゾンなどの添加物の濃度を変化させ、様々な条件下での長期培養を試みるも培養細胞の形態や性質は安定しているものの、8継代目になると細胞増殖速度が低下し、死滅する。この原因として、正常細胞を培養する際に、いわゆる「カルチャーショック」が生じ、p16が増加した結果、RB経路が停止する、細胞老化であることを明らかにし、これが通常の培養条件では回避不能であることが分かった。そのため、通常の培養ではこの障害を克服することは難しいため、われわれは、新たにヒト正常唾液腺培養細胞の不老化を試みた。大きくp53のmutationがあるHPV16ウイルス遺伝子のE6およびE7とhuman Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT)を、p53のmutationがないようにCDK4, cyclinD1, hTERTの3つの遺伝子を導入し、不老化を試みた。その結果、HPV16E6E7+hTERT, HPV16E7+hTERTでは細胞分裂に従い、空胞化してアポトーシスを生じ、死滅した。しかし、CDK4, cyclinD1, hTERTの3つの遺伝子を導入することで、不老化に成功した。本培養細胞(hSalEC)は現在、30代を経過して順調に増殖している。

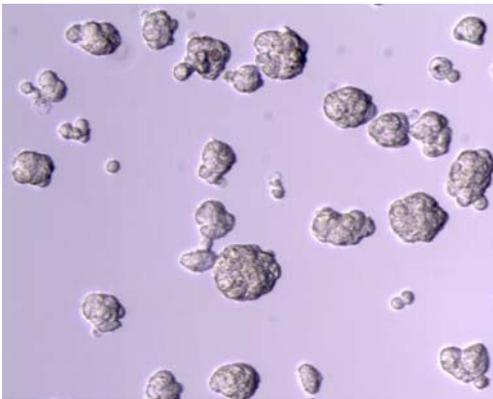


(図1) ヒト顎下腺由来不老化細胞

また、本培養細胞に対し免疫組織染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、図に示すようにEGFレセプターの発現が確認された(青:核、緑:アクチン、赤:EGFR)。



さらに、本培養細胞を用いて、collagen type I 顆粒を scaffold として 3-D 培養を試みたところ、下図に示すように細胞塊を形成することが可能であった。さらに詳細な解析では、本細胞塊は腺房細胞様には分化していなかった。



(2) 本培養細胞を放射線照射後のヌードマウスの顎下腺組織内に移植する手段は、Barka T らの方法 [Barka T, Gresik E and Miyazaki Y. Differentiation of a mouse submandibular gland-derived cell line (SCA) grown on matrigel. Experimental Cell Research 308(2005); 394-406] を応用した。

すなわち、本培養細胞がマトリゲル上で倍殖可能であることを確認した上で、不死化した hSalEC を 5×10^4 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 cells とマトリゲル 0.2mL を混合し、本培養細胞の同所性移植を試みたが、ヌードマウスで生着を認めなかった。また、コントロールとして放射線未照射のヌードマウス顎下腺を Sugito T らの方法 [Sugito T, Kagami H, et al. Transplantation of cultured salivary gland cells into an atrophic salivary gland. Cell Transplantation 13(2004):691-699] で、機械的に結紮し萎縮させ顎下腺に、結紮解除後に本培養細胞とマトリゲルの混合液を同所性移植すると $1 \times$

10^5 cells で移植が可能となった。

(3) 元来、正常唾液腺内には EGF だけでなく、NGF や renin などの growth factor が豊富にあることが知られている。そこで放射線治療後の萎縮した唾液腺にこれらの growth factor が含まれているか否かを免疫組織染色を用いて評価した。すなわち、口腔がん悪性腫瘍患者で放射線治療後の頸部郭清時に採取した顎下腺に対し、EGF および NGF の発現を免疫組織染色にて確認したところ、繊維化し、萎縮した顎下腺には、培養細胞において必須である EGF や NGF が存在しないことが明らかとなった。

以上の結果から、唾液腺培養細胞を一定期間培養し、細胞自体を保存することは可能であり、いくつかの遺伝子を導入することで他の上皮系の幹細胞と同様に不死化することは可能であることが示された。しかし、唾液腺を再生させるという本研究の課題を進めるため放射線照射後の唾液腺に培養細胞を用いて実験的な唾液腺再生を試みたが、放射線照射後の唾液腺組織は唾液腺細胞を再生させるためのニッチとしては不十分であることが確認された。従って、放射線照射後の組織を唾液腺再生に利用することは難しく、むしろ体内の他部位もしくは体外で器官培養を行い、再生唾液腺組織を移植する方針がよいと考えられた。

さらに、本研究より放射線照射後の萎縮した唾液腺を scaffold として利用することは困難であることが明らかとなったが、本培養細胞は機械的に萎縮させた顎下腺に対しては移植可能であったことから、いわゆるニッチが確保されれば、同所性移植は十分可能ではないかと思われた。このことから、加齢による口腔乾燥の解決法の一つのモデルになるのではないかと考え、アンチエイジングに本培養細胞が利用できないかを今後考察していきたいと考えている。

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)

① 野口一馬、清野 透、広本孝史、頭司雄介、田中徳昭、浦出雅裕
ヒト正常唾液腺不死化細胞の樹立
日本歯科評論 査読無 (ただし推薦論文) 68(9), 2008, 39-40

〔学会発表〕 (計 1 件)

① 廣本孝史、野口一馬、頭司雄介、田中徳

昭、浦出雅裕

CDK4, Cyclin D1 および hTERT 遺伝子
導入によるヒト正常唾液腺培養細胞不
死化の試み

日本口腔科学会総会（福岡）

2008年4月17-18日

尚、本学会発表は優秀ポスター賞を受賞
した。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口 一馬 (NOGUCHI KAZUMA)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：50309473

(2) 研究分担者

浦出 雅裕 (URADE MASAHIRO)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：70104883