

平成21年 6月16日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791536

研究課題名（和文） 唾液腺幹細胞の分離・同定と細胞療法の開発

研究課題名（英文） Isolation and identification of salivary gland stem cell and investigation of stem cell therapy

研究代表者

岸 輝樹（KISHI TERUKI）

横浜市立大学・医学研究科・特別研究員

74480779

研究成果の概要：

ラットの唾液腺細胞を Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) を用いた細胞分離法により Erythroid cell、CD45、ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1)、RT1A (MHC class I) これらの細胞表面マーカーの発現に基づいて唾液腺細胞を回収した。Erythroid cell<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>ICAM-1<sup>+</sup>OX18<sup>+</sup>の細胞画分にコロニー形成能の高く唾液腺の全細胞に分化しうる細胞が含まれていることがわかった。すなわち増殖能の旺盛な唾液腺幹・前駆細胞が含まれている可能性が示唆された。ラット顎下腺細胞をコラーゲンスポンジに播種しラットの下顎歯肉骨膜下に移植した。移植後5週目に組織学的解析により導管様構造がコラーゲンスポンジ内に確認された。自己細胞移植の方法として有用と思われる。またヒト唾液腺についても血清含培地から無血清培地に交換する培養方法で培養が可能であり、唾液腺全細胞に分化しうる細胞の存在が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：唾液腺・幹細胞・口腔乾燥症・移植・再生

## 1. 研究開始当初の背景

唾液腺幹細胞はその存在が示唆されているが実体は不明であり、その特性については未だに明らかにされていない。多種類の唾液腺細胞に分化することができる多分化能と高い増殖能を兼ね備えた唾液腺幹細胞が存在することを世界に先駆けて明らかにしている (Kishi, et al *BBRC*, **340**, p544-552, 2006)。現所属研究室においては、FACSを用いた組織幹細胞の分離法を確

立し (Taniguchi, et al: *Nature Medicine* **2**, 198, 1996)、幹細胞を高い精度で分離・回収し、クローナルな培養系で解析することを実現化している。肝幹細胞 (Taniguchi, et al: *Hepatology* **32**, 1230, 2000.) や膵幹細胞 (Taniguchi, et al: *J Cell Biol* **156**, 173, 2002.)などを次々と同定している。この手法を唾液腺に応用することにより、実体が不明であった唾液腺幹細胞の特性を明らかにすることが可能になること

が期待される。

口腔乾燥症は現在わが国で800万人の罹患者がいるとされ、多くの方がQOLを著しく落としている。その原因の大半がシェーグレン症候群や加齢による腺房の萎縮、頭頸部癌の放射線療法による唾液腺壊死など基質的傷害が原因である。高齢化社会を迎え罹患者数は爆発的に増加していくことが見込まれており、臨床的に新しい根治療法の開発に大きな期待が寄せられている。

## 2. 研究の目的

単離された唾液腺細胞集団の中から、ごく少数存在すると考えられている多分化能(唾液腺を構成する異なった複数の成熟機能細胞に分化する能力)と自己複製能(自己と同様の幹細胞を生み出す能力)を持つ幹細胞をFluorescence Activated Cell Sorting (FACS)とモノクローナル抗体を用いた精度の高い細胞分離法を用いて回収し、その特性解析を試みる。すなわち、純化した唾液腺幹細胞のクローナルな解析により、その多分化能や自己複製能を解明する。その基礎研究をもとに、唾液腺幹/前駆細胞を分離し、口腔粘膜下・顎下腺内・舌等に移植し細胞動態を解析し、唾液腺組織の再構築能や唾液分泌能について評価する。ヒト唾液腺幹細胞についても分離し特性解析を行い、免疫不全(NOD/SCID)マウスへの移植実験により組織再構築能を評価する。すなわち、ヒト唾液腺幹細胞移植を用いた唾液腺再構築法の開発を試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) FACSによる唾液腺幹細胞の分離

ラットの顎下腺を摘出し、氷冷でwash buffer (3% fetal bovin serum (FBS) (MOREGATE)を含むPBS)に浸しながら組織を細切した。その後、組織片をMillex (0.22  $\mu$ m) (MILLIPORE)で濾過滅菌したコラゲナーゼ (新田ゼラチン)/wash buffer (0.75mg/ml)に移し、ピペッティングした。セル ストレイナー (40  $\mu$ m) (BD Falcon)で濾過した細胞懸濁液を遠心(1300rpm, 4°C, 3分間)し、上清を取り除いた後、顎下腺細胞を回収した。回収した細胞はwash bufferで洗浄し、再度遠心した。洗浄は2回行った。

biotin 標識抗ラット CD45 及び erythroid cells (EC)抗体 (PharMingen)を加え、氷中で30分間反応させた。wash bufferで洗浄後、allophycocyanin-Cy7 (APC-Cy7) 標識 streptavidin (PharMingen)、fluorescein isothiocyanate (FITC)標識抗ラット RT1A 抗体 (OX18 : クローン) (PharMingen)、phycoerythrin (PE) 標識抗ラット CD54 (ICAM-1)抗体 (PharMingen)を加え、再び氷中で30分間反応させた。反応後、wash buffer

で洗浄し、propidium iodide (PI) (0.3  $\mu$ g/ml) (SIGMA)を添加した。蛍光標識された細胞は、MoFlo (DakoCytomation)を用いて解析し画分化した。画分化にあたり、各ゲートの設定には、蛍光標識抗体と反応させていない細胞をネガティブコントロールとして用いた。また、解析には Summit V4.0 (DakoCytomation)を使用した。各細胞画分から回収された細胞を200cells/mm<sup>2</sup>の密度で播種し培養した。培養後、コロニー数をカウントし形成されたコロニーについて顎下腺細胞の分化マーカーでRT-PCRと免疫化学染色で解析した。

### (2) 細胞移植による生体内における唾液腺組織の再構築法の開発

(1)と同様の方法でラット顎下腺の細胞懸濁液を採取し、コラーゲンスポンジ(テルモ)に22Gの注射針で細胞を注入し30分37°Cでインキュベーションした。顎下腺を切除されたラットの下顎歯肉を切開し骨膜を剥離し骨膜下にコラーゲンスポンジを移植し5週間後に摘出し切片を作成した。HE染色と免疫化学染色で解析を行った。

### (3) ヒト唾液腺細胞のクローナルな培養系の確立

ヒト舌下腺と顎下腺を缺で細切後コラゲナーゼ入りトリプシンEDTA液で37°C90分インキュベーションした。40  $\mu$ mメッシュで濾過し細胞懸濁液として唾液腺細胞を回収した。培養条件を決めるため培地を10%FBS DMEM/F12培地と無血清培地、播種密度を高密度(10000cells/cm<sup>2</sup>)、低密度(1000 cells/cm<sup>2</sup>)の条件に振り分けコロニーを観察した。さらに形成されたコロニーについてRT-PCRと免疫化学染色で解析した。

## 4. 研究成果

### (1) FACSによる唾液腺幹細胞の分離

PI<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>EC<sup>-</sup>細胞画分をICAM-1とOX18の発現強度に基づいて、ICAM-1<sup>+</sup>OX18<sup>+</sup>、ICAM-1<sup>+</sup>OX18<sup>-</sup>、ICAM-1<sup>-</sup>OX18<sup>+</sup>、ICAM-1<sup>-</sup>OX18<sup>-</sup>細胞画分の四つに画分化した(Fig1)。Erythroid cell<sup>-</sup>CD45<sup>-</sup>ICAM-1<sup>+</sup>RT1-A<sup>+</sup>の細胞画分にコロニー形成能の高い細胞が含まれていることがわかった(Fig2)。さらに、この細胞画分から得られた単一細胞由来のコロニーが、腺房細胞の分化マーカーであるaquaporin5(AQP5)、導管細胞の分化マーカーであるcytokeratin18(CK18)、S100 protein、筋上皮細胞の分化マーカーであるsmooth muscle actin (SMA)を発現していることがRT-PCR、免疫染色の解析によりわかった。

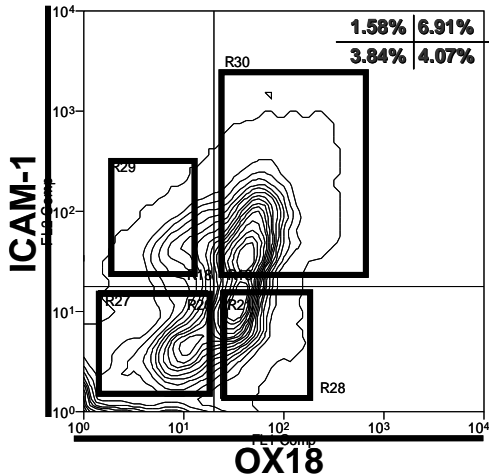
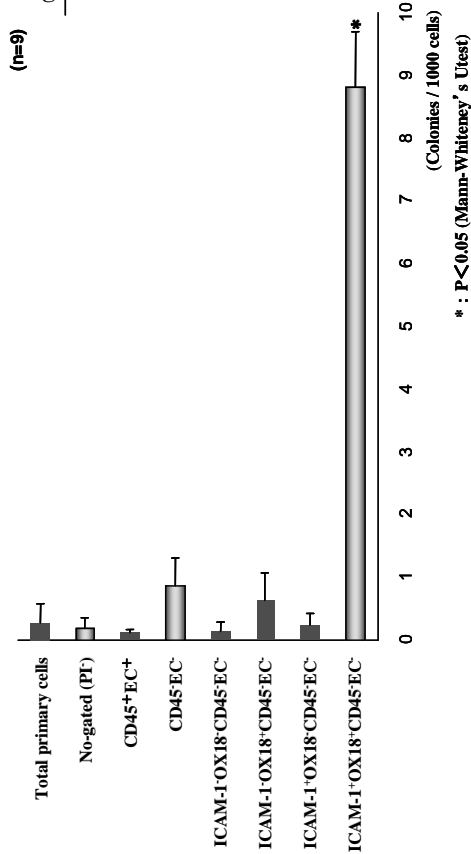


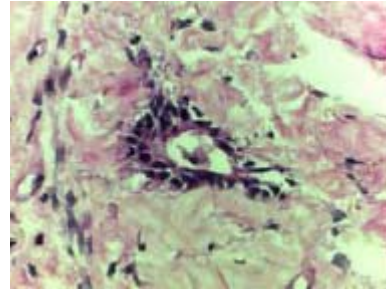
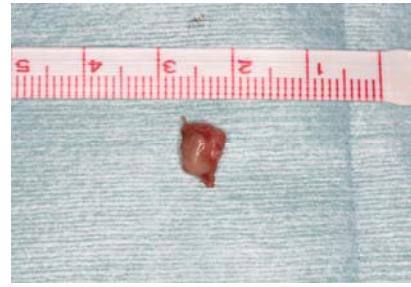
Fig2



(2) 細胞移植による生体内における唾液腺組織の再構築法の開発

移植後 5 週目に組織学的解析により導管様構造がコラーゲンスポンジ内に確認され (Fig3)、CK18、S100、などの導管細胞マーカーが確認された。この方法は自己細胞移植の方法として有用となる可能性が高い。

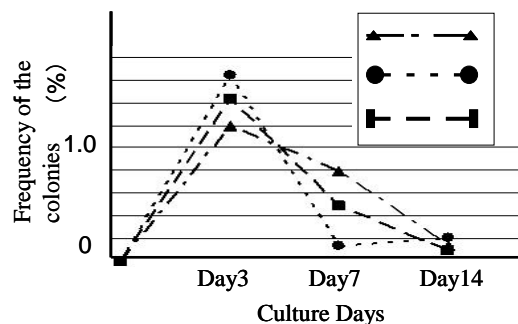
Fig3



(3) ヒト唾液腺細胞のクローナルな培養系の確立

DMEM/F12培地で培養したところ、高密度、低密度ともに細胞の生着が見られたものの増殖は見られなかった。無血清培地で培養したところ高密度培養では細胞の生着と増殖が確認されたが、低密度培養では細胞の生着も増殖も見られなかった。コロニーアッセイのための低密度培養を目標としているため、細胞の生着までは10%FBS DMEM/F12培地で培養し、培養2日目からは無血清培地で培養を試みたところ低密度での培養が可能であった。本実験での培養が単細胞からのコロニー形成が認められ、すなわちクローナルな培養系であることが観察できた。この培養系で得られたコロニーについて培養7日後にコロニーアッセイ法を用いて幹/前駆細胞の分離・培養を試みたところ、腺房細胞マーカーであるAmylase、Aquaporin3 (AQP3)、導管細胞マーカーであるCytokeratin7 (CK7)、Cytokeratin14 (CK14)、Ctokeratin18 (CK18) 筋上皮細胞マーカーであるSmooth muscle actin (SMA)、Vimentin (VIM) がRT-PCRで確認されm-RNAレベルでの細胞の分化が示唆された。さらに免疫染色では、AQP3、Amylase、CK7、CK14、SMAが確認できた。

Fig4



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)

YUKI TATSUISHI, MAKOTO HIROTA, TERUKI KISHI, MAKOTO ADACHI, TAKAFUMI FUKUI, KENJI MITSUDO, SHINJIRO AOKI, YOSHIRO MATSUI, SUSUMU OMURA, HIDEKI TANIGUCHI and IWAI TOHNAI,  
Human salivary gland stem/progenitor cells remain dormant even after irradiation.  
International Journal of Molecular Medicine, 2009 in press 査読有り

[学会発表] (計1件)

立石有紀, 岸輝樹, 金光龍浩, 高尾史, 廣田誠, 藤内祝, 谷口英樹  
ラット唾液腺前駆細胞の分離・培養・移植法の検討  
再生医療学会 名古屋  
2008年3月13日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸輝樹 (KISHI TERUKI)  
横浜市立大学・医学研究科・特別研究員  
74480799