

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10460

研究課題名(和文) がん支持療法創出を目指した可視化・数値化可能な光る耳下腺培養細胞系の構築

研究課題名(英文) Construction of the glittering parotid gland cultured cell system which can assay a salivary gland function, for cancer supportive therapy creation

研究代表者

関亦 明子 (SEKIMATA, Akiko)

福島県立医科大学・看護学部・教授

研究者番号：50321823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：当該研究により以下の成果を得た。1)マウス胎児顎下腺細胞が無血清培地で1ヶ月以上の継代培養が可能となった。2)同様に、マウス成体耳下腺細胞が無血清培地で4ヶ月以上の継代培養が可能となった。3)長期培養耳下腺の細胞マーカーをリアルタイムPCR法により観察したところ、分化マーカーのアミラーゼ発現が減少し、未分化マーカーが上昇していた。4)マウスの放射線暴露モデル作製のためマウスのX線照射実験系を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唾液分泌障害は、口腔機能低下、口腔粘膜炎や肺炎を招き、患者の栄養状態低下のため治療効果の減弱や完遂率にも影響するため、がん治療において重大な有害事象である。現在は対症療法が主だが、放射線による唾液腺傷害は不可逆的で、一度傷害されると唾液分泌量は生涯治療前の状態には戻らない。患者の身体や費用の負担、安全性と効果を考慮すると、移植などの治療よりもまず予防が第一であり、唾液腺防護剤をがん治療時に同時に使用する支持療法が効果的である。当該研究は、こうした予防的な支持療法の開発を可能にするものである。

研究成果の概要(英文)： We obtained following results in this study. 1) The culture that was more than one month in the serum-free medium of the mouse embryonic submandibular gland (ME-SMG) cells were enabled. 2) The culture that was more than four months in the serum-free medium of the adult mouse parotid gland cells were enabled, as well. 3) In the long-term culture cells, the expression of AMY1, a differentiated marker, decreased and the expression of KRT5, a undifferentiated markers, increased by real-time PCR. 4) The experimental system for mouse X-ray irradiation model was set up.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：唾液腺 放射線障害 唾液分泌低下 無血清培養 放射線照射

### 1. 研究開始当初の背景

唾液分泌障害は、口腔機能低下、口腔粘膜炎や肺炎を招き、患者の栄養状態低下のため治療効果の減弱や完遂率にも影響するため、がん治療において重大な有害事象である。現在は対症療法が主だが、放射線による唾液腺傷害は不可逆的で、一度傷害されると唾液分泌量は生涯治療前の状態には戻らない。ピロカルピン塩酸塩は唾液分泌促進のため処方される薬剤だが、細胞表面のムスカリン性アセチルコリン受容体に作用して分泌を促進するため、唾液腺細胞が不可逆的に傷害された場合は反応しない。患者の身体や費用の負担、安全性と効果を考慮すると、移植などの治療よりもまず予防が第一であり、唾液腺防護剤をがん治療時に同時に使用する支持療法が効果的である。

唾液腺防護剤の探索に当たって必要な唾液腺培養細胞に求められる条件は、1) 均質で大量の細胞を長期間培養可能で、2) “必要時に” 腺細胞に分化させ、唾液分泌能を自動化により測定できることである。この条件は、唾液腺防護剤の探索において数千の化合物のスクリーニングに必須である。唾液腺細胞の培養は他の研究グループによっても試みられているが、求める2つの条件を同時に満たしているものは未だ無い。

### 2. 研究の目的

我々は、がん治療でその機能低下が問題となる耳下腺とその分泌成分、アミラーゼに注目して、分化した耳下腺細胞を Venus 蛍光として可視化でき、アミラーゼ分泌を NanoLuc™ 発光として数値化できる“蛍光耳下腺マウス”を作製した。当該研究では、この蛍光耳下腺マウスから単離する耳下腺培養細胞を用いてアミラーゼ分泌能獲得に関わる遺伝子群やシグナル伝達経路を同定し、培地への添加因子を改良することで、耳下腺細胞の分化程度やアミラーゼ分泌能が測定可能な“光る耳下腺培養系”の完成を目指す。また、同時に、蛍光耳下腺マウス個体を放射線や化学療法剤の暴露モデルとして確立する。

### 3. 研究の方法

#### 蛍光耳下腺マウスについて

本研究の強みは、申請者らがこれまでにゲノム編集によって作製した“蛍光耳下腺マウス (図.1)”を用いることである。唾液腺防護剤のスクリーニングや効果の検証はヒトを用いて行うことができないうえ、数千という化合物を網羅的に自動化して検索する必要がある。我々が作製したこの蛍光耳下腺マウスと、蛍光耳下腺マウスから耳下腺を単離することで本研究において完成を目指している(分化能を維持しているため刺激によって)“光る耳下腺培養細胞”を用いれば、将来は唾液成分の培地への分泌を NanoLuc 発光として数値化でき、腺細胞への分化が Venus 蛍光として可視化できるようになるため、唾液腺の防護効果の判定が客観的に自動化定量可能となる。

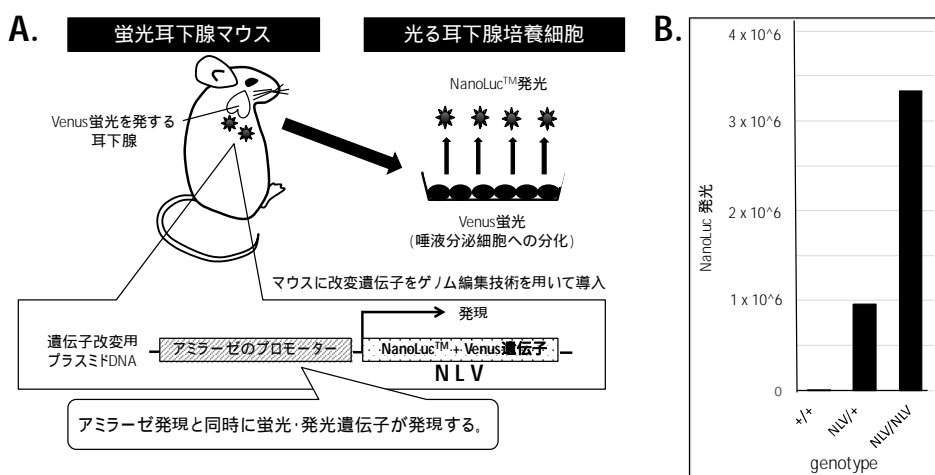


図.1 蛍光耳下腺マウス：作製したゲノム編集マウスの概要 (A)。耳下腺細胞が凍結組織切片、ウエスタンブロッティングでそれぞれ Venus 蛍光、バンドとして観察された。作製した蛍光唾液腺マウスの血清中の NanoLuc™ 活性を測定したところ、遺伝子型に応じた発光が観察された (B)。 genotype, +/+ : 野生型, NLV/+ : ヘテロ型, NLV/NLV : ホモ型

#### 唾液腺の長期培養に必要な培地成分の検索

低分子化合物を培地に系統的に添加して長期に増殖維持させ、必要時に分化させることができる培養条件を探索した。マウス胎児顎下腺原基とマウス成体耳下腺細胞を分散培養して、低分子化合物を系統的に添加して、唾液腺細胞の増殖性を観察した。また、幹細胞/分化マーカーの遺伝子発現を定量的 PCR 法により確認した。の蛍光耳下腺マウスより分離した耳下腺細胞の長期培養を行い、継代培養して凍結保存を試みた。

#### 放射線照射マウスの実験モデル作製

既知の抗酸化剤の防護効果を観察するためにマウスの放射線照射実験を行った。当研究では、照射する放射線の強度と飼育日数、傷害の程度を判定するための指標の選定を実施した。

## 4. 研究成果

#### 唾液腺の長期培養に必要な培地成分の検索結果

マウス胎児顎下腺原基を分散培養した細胞に、低分子化合物を系統的に添加して、その増殖率を観察して、数種類の低分子化合物に候補を絞った。うち、ROCK 阻害剤、Y27632 は細胞の継代培養に必須であった。これらの結果、1)マウス胎児顎下腺細胞が無血清培地で1ヶ月以上の継代培養が可能となった。2)同様に、マウス成体耳下腺細胞が無血清培地で4ヶ月以上の継代培養が可能となった。3)長期培養耳下腺の細胞マーカーをリアルタイム PCR 法により観察したところ、分化マーカーのアミラーゼ発現が減少し、未分化マーカーが上昇していた。継代培養が可能となったため、細胞を増殖させて凍結保存を試みた。凍結融解後の分化能の維持などの観察が今後の課題である。

#### 放射線照射マウスの実験モデル作製

マウスの唾液腺のみに放射線を照射するため、鉛の防護板の設計と作製を行い、唾液腺付近のみに X 線が照射されることを確認した。マウスの性別や週齢により反応が異なることが予想されたため、まず初めに10週齢の雄を用いて、X線照射装置による放射線の照射強度を決定する実験を行った。7 Gy から17 Gy の照射を実施し、体重や唾液の分泌量を測定したところ、個体差が大きいことがわかった。これは、雄マウスの喧嘩による影響が大きいものと考えられた。また、照射強度をあげても可視化できる唾液腺組織の変化は観察されず、炎症マーカーの上昇もみられなかった。今後は、マウスの性別や週齢を変更し、照射強度と飼育日数の検討、唾液腺傷害の指標の探索を引き続き実施する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Murakami-Sekimata Akiko, Sekimata Masayuki, Sato Natsumi, Hayasaka Yuto, Nakano Akihiko                                  | 4. 巻<br>30            |
| 2. 論文標題<br>Deletion of PIN4 Suppresses the Protein Transport Defects Caused by sec12-4 Mutation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Microbial Physiology   | 6. 最初と最後の頁<br>25 ~ 35 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1159/000509633  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-             |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Sekimata Masayuki, Yoshida Daiki, Araki Akemi, Asao Hironobu, Iseki Ken, Murakami-Sekimata Akiko         | 4. 巻<br>202               |
| 2. 論文標題<br>Runx1 and ROR $\alpha$ Cooperate to Upregulate IL-22 Expression in Th Cells through Its Distal Enhancer | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>The Journal of Immunology  | 6. 最初と最後の頁<br>3198 ~ 3210 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.4049/jimmunol.1800672   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                 |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>関亦明子, 牧野貴大, 関亦正幸             |
| 2. 発表標題<br>マウス唾液腺上皮細胞の無血清培地による長期継代培養の試み |
| 3. 学会等名<br>第93回 日本組織培養学会                |
| 4. 発表年<br>2021年                         |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>牧野貴大, 関亦明子, 関亦正幸                      |
| 2. 発表標題<br>唾液分泌障害予防ケア開発にむけたマウス耳下腺の長期体外培養と分化状態の観察 |
| 3. 学会等名<br>第9回 看護理工学会                            |
| 4. 発表年<br>2021年                                  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>推名祐美, 牧野貴大, 関亦正幸, 関亦明子                  |
| 2. 発表標題<br>新規がん支持療法の開発に向けてゲノム編集によって作製した蛍光唾液腺マウスの解析 |
| 3. 学会等名<br>第8回 看護理工学会学術集会                          |
| 4. 発表年<br>2020年                                    |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>関亦 明子, 推名, 祐美, 牧野, 貴大, 関亦 正幸                    |
| 2. 発表標題<br>マウス胎児顎下腺(ME-SMG)上皮細胞の無血清培養の試みにおける増殖因子と低分子化合物の検索 |
| 3. 学会等名<br>第42回 日本分子生物学会                                   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|                   | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                          | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                   | 備考 |
|-------------------|--|---|----|
| 研究<br>分<br>担<br>者 | 関亦 正幸<br><br>(SEKIMATA Masayuki)<br><br>(80250190) | 福島県立医科大学・医学部・准教授<br><br><br><br>(21601) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

|         |         |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|