

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20791464
 研究課題名（和文）組織工学的手法を用いた唾液腺の再生治療に関する研究
 研究課題名（英文）Regeneration Therapy of Salivary gland with using Tissue Engineering

研究代表者
 杉戸 孝行 (TAKAYUKI SUGITO)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・COE 研究員
 研究者番号：50467297

研究成果の概要（和文）：静的環境における 3 次元培養実験では、われわれの正常培養唾液腺細胞は形態形成能を有していることが示唆されたが、ラジアルフロー型バイオリアクターと Polyvinyl alcohol (PVA) 担体中を用いた 3 次元培養では、良好な細胞増殖を得ることはできなかった。今後、良好な結果を得るためには使用する担体やバイオリアクター中を循環する培地の還流速度を正常培養唾液腺細胞に最適化する必要があると思われる。

研究成果の概要（英文）：Our normal cultured salivary gland cells possess a morphological potential. On the other hand, we found that, it is difficult to culture normal salivary gland cells on three dimensional polyvinyl alcohol (PVA) with using our radial-flow bioreactor. This result indicates that we need optimize a scaffold and flow volume in radial-flow bioreactor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 歯科医用工学・再生歯学

キーワード：再生医療 幹細胞 唾液腺 浮遊培養 3次元培養

1. 研究開始当初の背景
 頭頸部癌はわが国では年間約 9 千人程度の罹患者がいるとされている。頭頸部癌に対する

放射線治療によって唾液腺の萎縮が起こるが、それにより惹起される口腔乾燥は摂食・構音障害、多発性う蝕など患者の QOL に深

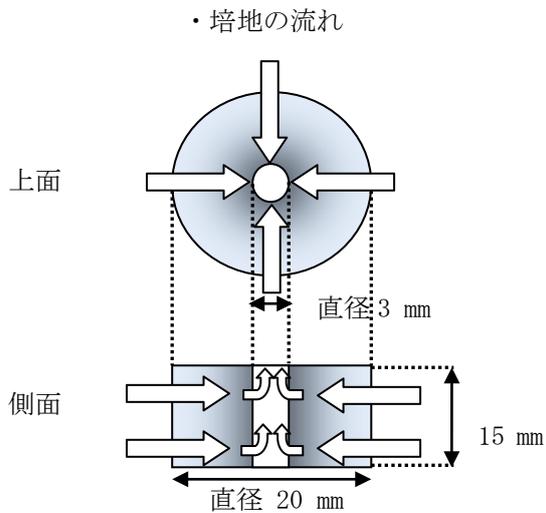
刻な影響を及ぼす。しかしながら、現時点では唾液腺の萎縮に対する有効な治療は存在しない。そこでわれわれは、組織工学的手法を用いた唾液腺の再生治療に着目した。組織工学的手法を用いた再生治療は、皮膚・骨などの支持組織においてすでに臨床応用され成果をあげている。その一方で、唾液腺を含む肝臓・膵臓などの分泌・実質臓器の再生研究はいまだ十分な成果を得られていない。われわれは他の国内外の研究施設に先んじ組織工学的手法を用いた唾液腺の再生研究を行ってきた。米国 NIH をはじめ他の施設においては 2005 年に正常培養唾液腺上皮細胞の培養法の開発に至ったのに対し (Tran SD et al. 2005)、われわれは 1996 年には独自にそれを達成し、培養細胞のキャラクタライゼーション、*in vitro* における形体形成能の検討 (Horie K et al. 1996)、さらに 2005 年には培養細胞を萎縮唾液腺に移植、移植細胞の生存を確認するに至っている。この研究の範疇において国内外の研究施設の中でも優位な立場にあるといえる。しかし現在唾液腺の実質たる腺細胞を長期に安定して培養することは困難であり、腺細胞に分化しうる唾液腺の幹細胞の検索も十分に行われてはいない。

2. 研究の目的

われわれの最終的な目標は、担体上に唾液腺幹細胞を播種した構造体 (人工唾液腺) を移植することで、唾液腺の再生と唾液分泌機能の回復を図ることにある。本研究における目的は、唾液腺再生能を持つ細胞の新たな培養法の開発であり、特に唾液腺への分化能を有した幹細胞分画を効率的に培養することである。それにより組織工学的手法を用いた唾液腺の再生治療の可能性を検討する。

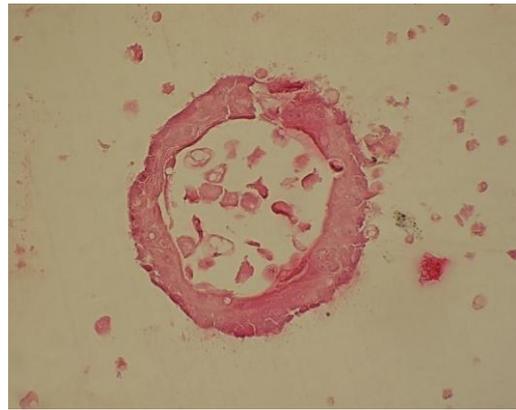
3. 研究の方法

唾液腺幹細胞の可塑性を維持したまま、長期・大量培養するには通常の方法では困難である。そこでわれわれは肝細胞などの 3次元培養に用いられているラジアルフロー型バイオリアクターに着目した。ラジアルフロー型バイオリアクターを用いた唾液腺細胞の 3次元培養に先立ち、3次元構造を有する担体 Polyvinyl alcohol (PVA) への細胞接着について検討を行った。方法として PVA の円盤上に唾液腺細胞を平面培養し、2・4・6・8・10 日後において DAPI を用いた核染色を行い、蛍光顕微鏡にて担体上における細胞の生着・増殖を確認した。結果として PVA 上において培養唾液腺細胞の良好な生着・増殖は認められなかったため、以前われわれが行った研究にならない、PVA をファイブロンネクチンにてコーティングし、同様の実験を行った。その結果、ファイブロンネクチンにてコーティングした実験群においては担体上で、培養細胞の経時的な増殖を認めた。この結果をふまえ、われわれは 3次元培養に先立ち、バイオリアクターにて $20 \mu\text{g/ml}$ ファイブロンネクチン溶液を循環させることにより担体 (容積: 5 ml) をコーティング、その後 5.0×10^7 個の培養唾液腺細胞を含む培地を循環させ、細胞を担体上に接着させた。そして培養 1 週間後に得られた検体を H.E 染色した。また平行してコラーゲンを有する静的環境下での 3次元培養実験も並行して行い、同様に得られた検体を H.E 染色した。



4. 研究成果

今回バイオリアクターを用いて正常培養唾液腺細胞の3次元大量培養実験を試みた。しかし得られた検体をH.E染色したところ、担体中に培養細胞の良好な増殖はみとめられなかった。一方、静的環境で3次元培養された培養唾液腺細胞はコラーゲンゲル中に嚢胞様構造物を形成していた。この結果よりわれわれの樹立した培養法により培養された正常唾液腺細胞は形態形成能を有していることが示唆された。今後、バイオリアクター用いた実験で良好な結果を得るためには使用する担体やバイオリアクター中を循環する培地の還流速度を正常培養唾液腺細胞用に最適化する必要があると思われる。



・コラーゲンゲルを用いた3次元培養で得られた培養唾液腺上皮細胞の形成した嚢胞様構造物

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4件)

① Sugito T, Mineshiba F, Zheng C, Cotrim AP, Goldsmith CM, Baum BJ, Transient TWEAK overexpression leads to a general salivary epithelial cell proliferation, Oral Diseases, 査読有, Vol. 15, No. 1巻 2009、76-81

② Zheng C, Cotrim AP, Sunshine AN, Sugito T, Liu L, Sowers A, Mitchell JB, Baum BJ, Prevention of radiation-induced oral mucositis after adenoviral vector-mediated transfer of the keratinocyte growth factor cDNA to mouse submandibular glands, Clin Cancer Res., 査読有, Vol. 15, No. 14, 2009, 4641-8

[学会発表] (計3件)

① 杉戸孝行, サル培養唾液腺細胞を用いた人工唾液腺作成のための研究, Aichi Sjogren's Syndrome Conference 12th Meeting, 2010年2月15日, 名古屋

② 杉戸孝行、Transient TWEAK overexpression leads to a general salivary epithelial cell proliferation、第8回日本再生医療学会総会、2009年3月5日、東京

③ Sugito T、Transient TWEAK overexpression leads to a general salivary epithelial cell proliferation、International Conference on Frontiers of Dental and Craniofacial Research、2008年11月2日、中華人民共和国、北京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉戸 孝行 (TAKAYUKI SUGITO)
名古屋大学・大学院医学系研究科・
COE 研究員
研究者番号：50467297