

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5 月 17 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20791533

研究課題名（和文） 唾液腺再生医療を目指した唾液腺分化機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the salivary gland differentiation system which aimed at the salivary gland regenerative medicine

## 研究代表者

碓 竜也 (IKARI TATSUYA)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：70380467

## 研究成果の概要（和文）：

本研究課題では、顎下腺原基からの細胞分離 3 次元培養による組織再構築モデルを確立した。それらの再構築組織は、最終分化マーカーとしてアクアポリンの発現も認めた。この現象は、唾液腺組織の中には幹細胞とも言うべき細胞群が含まれていることを示している。T-box 転写因子である Brachury は中胚葉形成に必須の遺伝子であり、正常唾液腺における Brachury 発現は、胎齢 13.5 日目に急激な発現増加を認め、胎齢 14.5 日以降はその発現量は減少していることを証明した。

## 研究成果の概要（英文）：

We established a model three-dimensional reconstruction of tissue culture cell separation from the submandibular gland primordia in this study. Rebuild their organization, were also admitted the expression of aquaporin as a marker of terminal differentiation. This phenomenon, in the salivary gland tissue has shown that it contains a group of cells should be called stem cells. Brachury is a transcription factor T-box is a gene required in mesoderm formation, expression Brachury in the normal salivary glands, recognized the increased expression of a sudden on embryonic day 13.5, after embryonic day 14.5 the amount of its expression decreased proved that.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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、再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

唾液分泌は口腔の機能および健康維持に極めて重要である。口腔乾燥症は老化や放射線照射、シェーグレン症候群に伴って生ずるが、それに対する有効な治療法は少なく対症療法に頼っているのが現状である。実質的な治療は唾液腺再生であるが、これに関する研究は極めて少ない。唾液腺再生医療の開発のためには、まず、唾液腺の発生、分化の分子機構を明らかにする必要があると考えて研究を進めてきた。

## 2. 研究の目的

唾液腺再生医療を目指して、唾液腺の発生および分化調節分子機構を明らかにする。そのため、

- (1) マウス顎下腺の器官培養
- (2) マウス顎下腺からの細胞の分離および分離細胞の3次元培養による組織再構築
- (3) 分離顎下腺細胞あるいは切除組織の腎被膜下への移植による器官形成

これらの方法を用いて唾液腺組織の再生機能を検討する。

## 3. 研究の方法

唾液腺の発生は、発芽、分枝形成、そして終末部での細胞分化を経て器官特異的な機能と構造を獲得する。発芽・分枝形成を含む初期発生は、ステージ特異的な遺伝子発現や

上皮間葉相互作用に強く依存している。

- (1) 実験系としてマウス胎仔顎下腺原基を器官培養することにより、この初期発生を観察できる実験系を確立している。この方法は唾液腺原基と間質との相互作用、液性因子や細胞外基質などの影響、各ステージの遺伝子や蛋白発現レベルの検討に用いることが出来る。
- (2) マウス胎仔顎下腺から分離した細胞集団は、*in vitro*における細胞外基質中で組織を再構築することを確認している。この手法は初めての実験方法であり、細胞移植による組織再生の可能性を強く示唆するものである。
- (3) 成獣マウス腎被膜下に移植することによって唾液腺が再構築されることを確認している。

以上の実験系、特に(2)と(3)は国内外を含めて報告のない独創的なもので、初期発生から最終分化、さらには再生医療も含めた研究成果が期待出来る。

## 4. 研究成果

胎生13.5日の胎仔マウスより顎下腺を摘出し、コラゲナーゼおよびトリプシンで分散処理し単一化した細胞を、高濃度でI型コラーゲンゲル中に滴下しフィルター上で培養を行った。細胞集合塊の上皮細胞は培養後速やかに密集し、分枝形成、続いて腺腔や管腔を形成した。唾液腺分化マーカーとしてア

ルシアンブルーおよびアクアポリン5を用いた。再構成組織の腺腔にはアルシアンブルーに染色される粘液が観察され、免疫組織化学染色所見では腺組織の腺腔側にアクアポリン5の発現を認めた。

さらに、唾液腺組織再構成における細胞外基質の影響を観察するために種々の基質を用いて検索を行った。コラーゲンゲル中にフィブロネクチンを添加することで小葉数は増加し、腺腔側でのアクアポリン5の局在が明瞭になった。この所見は、出生時期のマウス顎下腺組織に類似していた。また、抗インテグリン $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 中和抗体を添加した場合も小葉数は増加し、アクアポリン5の腺腔側への局在が明瞭になった。

また、*in vivo*での形態変化を観察するため腎被膜下移植実験を行った。結果、この細胞集合塊を腎被膜下に移植しても組織再構成が可能であった。これらの研究で、胎生期の顎下腺細胞は分散させても密な集合塊を作ることで組織を再構成することが示された。また、この器官培養法は胎生期の唾液腺分化過程を再現することが可能であり、組織再生の過程を観察するのに有効な手段の一つであると考えられた。

次に、これまでに確立した上皮間葉分離器官培養法や細胞分離3次元培養による組織再構築モデルにおける増殖因子や細胞外基質の条件解析を行った。結果、FGF2やアクチビンが顎下腺の初期発生に関与していることが示唆された。一方、細胞外基質としてはフィブロネクチン、コラーゲン、マトリゲル、インテグリンファミリーを用いた。特に、

フィブロネクチンにおいては初期発生における分枝形成に不可欠であることが報告されているが、フィブロネクチンを添加することで分泌機能を有する分化マーカーであるアクアポリン5が誘導されること、フィブロネクチンとの結合に関与する $\alpha 5$ インテグリンに対する中和抗体を添加することで組織内の空砲化が促進されることから、初期発生のみならず分化にも寄与していることが示唆された。また、分離顎下腺細胞あるいは切除組織の腎被膜下への移植による器官形成モデルでは、唾液腺周囲の間葉組織には明らかな特性は確認できなかったことから、ある一定の共通メカニズムが存在することが考えられた。

これまでの結果から、唾液腺組織の中には幹細胞とも言うべき細胞群が含まれていることを示している。唾液腺幹細胞の存在はこれまでも様々な意見が論じられているが、未だにその証明はなされていない。一方で、再生医療を目指す上では、組織幹細胞の同定やその分子機構の解明は必須の条件となる。悪性腫瘍においては癌幹細胞の存在が同定されており、当教室ではT-box転写因子であるBrachuryが唾液腺悪性腫瘍における癌幹細胞の分子機構に大きく関与していることを示している。そこで、このBrachuryに着目し、正常唾液腺組織におけるBrachuryの発現や動態についての解析を行った。結果、正常唾液腺におけるBrachuryの発現は、胎齢13.5日目に急激な発現増加を認め、胎齢14.5日以降はその発現量が減少していくことを証明した。

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

碓 竜也 (IKARI TATSUYA)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：70380547