

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10002

研究課題名（和文）脂肪由来幹細胞による唾液腺特異的傷害モデルマウスの組織再生と促進因子の網羅的解析

研究課題名（英文）Comprehensive analysis of tissue regeneration and promoting factors in a mouse model of salivary gland-specific injury by adipose-derived stem cells.

研究代表者

松本 直行（Matsumoto, Naoyuki）

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：20386080

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ジフテリアトキシン受容体（hHB-EGF）を唾液腺だけに発現させた遺伝子改変マウス（MUC7p-TRECK）を作出し、ジフテリアトキシン投与による唾液腺特異的な組織傷害および唾液分泌量低下の程度の評価と、脂肪由来幹細胞移植による唾液腺組織再生の機序を検討した。遺伝子改変マウスへのジフテリアトキシン投与により唾液腺特異的にアポトーシスが生じ、唾液分泌量の低下が確認された。また、遺伝子改変マウスと同系統であるC57BL/6マウスから間質血管細胞群（脂肪由来幹細胞を豊富に含む細胞群）を単離した。その過程で間質血管細胞群は継代培養を進めるに伴い高度の細胞老化が生じる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の主な唾液腺組織傷害モデルマウスは自己免疫疾患を発症し全身の様々な臓器・組織傷害が生じるため、唾液腺組織の傷害、修復・再生を詳細に検討するためには、唾液腺特異的な細胞・組織傷害モデルが求められていた。本研究で作出された遺伝子改変マウスは唾液腺特異的にアポトーシスによる細胞死が誘導されることが確認され、有用な唾液腺組織傷害や修復・再生のモデル動物になり得ると期待される。また脂肪幹細胞による唾液腺再生医療を実現するため、マウス鼠径部由来の脂肪幹細胞を多く含む細胞群を培養したところ、その初期に細胞老化が生じることが示唆され、細胞老化の制御により良好な脂肪幹細胞移植が達成できると示唆された。

研究成果の概要（英文）：To investigate the mechanism of salivary gland tissue regeneration by adipose-derived stem cell transplantation, genetically modified mice (MUC7p-TRECK) expressing the diphtheria toxin receptor (hHB-EGF) exclusively in salivary glands were generated. They reduced salivary secretion caused by diphtheria toxin injection, and apoptotic cell death was confirmed. Diphtheria toxin administration to genetically modified mice caused salivary gland-specific apoptosis and reduced saliva secretion. In addition, a stromal vascular fraction (a cell population rich in adipose-derived stem cells) was isolated from C57BL/6 mice, the original strain of the MUC7p-TRECK mice. In the process, it was suggested that the stromal vascular fraction exhibited severe cellular senescence along with passaging cultures.

研究分野：病理学

キーワード：脂肪由来幹細胞 口腔乾燥症 再生医療 唾液腺 組織傷害 間質血管細胞群

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

唾液分泌障害は唾液分泌量が減少する多因子性の疾患で口腔乾燥感、味覚異常、齲蝕、歯周病など局所的な症状だけでなく、唾液の分泌不全が誘因となる高齢者の誤嚥性肺炎や低栄養の増加が社会問題となっている。口腔乾燥症は65歳以上の高齢者で28.5%、高齢者介護施設の高齢者で45%にみられる(Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2012;114: 52-60)が、我が国の総人口に占める65歳以上人口の割合(高齢化率)は2017年に27.7%となり、今後さらに増加すると推計されている(総務省. 平成30年版高齢社会白書)ことから、このような口腔乾燥症の治療方法の確立は我が国において喫緊の課題である。口腔乾燥症の患者は増齢や炎症などの原因により唾液腺組織が萎縮しているため、口腔内の保湿など対症療法に限定されており、根治的な治療方法の開発が望まれている。

近年、幹細胞移植により失われた組織を再生する試みが進められ、移植に供される幹細胞として、受精卵から作製される「ES細胞(胚性幹細胞)」、体細胞に特定の遺伝子を入れて樹立した「iPS細胞(人工多能性幹細胞)」、生体を構成する各組織に存在する「体性幹細胞」が用いられている。しかしES細胞移植には作製に受精卵を用いるため倫理的な問題が生じることや拒絶反応が生じることが問題となっている。iPS細胞は様々な病変の再生医療に実験的な移植が行われており、近年では加齢黄斑変性の治療に供され良好な経過であるとの報告があるが、iPS細胞の作製から目的の網膜上皮細胞まで分化させて移植するのに約10か月の期間と5,000万円の費用を要したとの報道がある(“理研、目の難病にiPS細胞で世界初の手術” 読売新聞. 2014年9月12日)。

臨床応用という面では体性幹細胞の利用が進んでおり、中でも脂肪由来幹細胞は2001年の発見(Tissue Eng. 2001;7:211-228)以来、骨髄幹細胞の100~1000倍もの幹細胞を比較的容易に確保できること、また、骨髄幹細胞と同様に骨・心筋・軟骨等へ分化する能力も併せ持っていることなどが証明され、現在は脂肪由来幹細胞による幹細胞自家移植の研究が進められている(Nat Clin Pract Cardiovasc Med. 2006;3 Suppl 1:S33-37)。これまでに脂肪由来幹細胞移植による唾液腺組織の修復と機能回復がいくつか報告されているが、脂肪由来幹細胞を唾液腺幹細胞へ分化誘導や、組織再生を促進する液性因子については未だ明らかにされていない(Laryngoscope 2011;121:1864-1869、Exp Cell Res 2015;334:160-172、PloS One 2013;8:e71167、Int J Mol Med 2014;34:749-755)。

従来、唾液腺の機能回復の研究のために自己免疫疾患自然発症マウス(系統:MRL/lpr, BXSB, NOD)や様々な遺伝子改変マウスが用いられてきたが、これらのマウスには唾液腺以外の諸臓器に病変があるため、唾液腺機能の実験結果を評価するためには全身的な影響を考慮する必要がある。さらにこれらのマウスは自己免疫応答や潜在的なウイルス感染などがあることから、たとえ唾液腺組織の再生実験を行っても、治療効果を正確に評価するのは困難であり、このことから唾液腺組織特異的に傷害を生じる動物モデルが求められていた。

2. 研究の目的

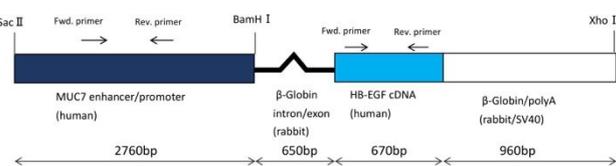
本研究では唾液腺組織傷害による口腔乾燥症のモデルとして、Toxin receptor-mediated cell knockout system (TRECK)法(Nat Biotechnol. 2001;19:746-750)を用いた遺伝子改変により、唾液腺特異的傷害モデルマウス(MUC7p-TRECK)を作成し、このマウスを用いて効果的な脂

脂肪由来幹細胞による唾液腺組織の修復と機能回復を最終目的とし、未だ不明な点が多い脂肪由来幹細胞を細胞移入する事により唾液腺幹細胞へ分化や組織再生を誘導している因子を in vivo の実験系で明らかにすることにある。

MUC7 プロモーターを利用して唾液腺局所にヒト・ジフテリアトキシン受容体を発現する遺伝子改変マウスは、DT 投与により唾液腺組織特異的な傷害を誘導できることから、現在まで使用されてきた唾液腺組織傷害モデルマウスよりも適切な唾液腺組織傷害と再生を検討可能にするツールになると考えられる。また脂肪由来幹細胞移植による口腔乾燥症モデルの治療実験の確立と、脂肪由来幹細胞が唾液腺組織幹細胞へと分化するために不可欠な因子を見出し、その再生機構を明らかにすることは、口腔乾燥症の病因解明と治療法の開発の端緒となり、社会的貢献度の高い研究となる。

3. 研究の方法

唾液腺組織傷害による口腔乾燥症のモデルとして、TRECK 法を用いた遺伝子改変により唾液腺特異的傷害モデルマウスを作出した。組織特異的発現プロモーター・エンハンサー配列として、ヒト MUC7 の 5' UTR 領域をクローニングし、ヒト・ジフテリア



トキシン受容体 (hHB-EGF) 遺伝子の上流に組み込んだ TRECK ベクターを作成した。なおヒト MUC7 は、そのホロモグがマウスに存在しないことから、唾液腺組織特異的発現モデルマウスの作出に利用される (Transgenic Res. 1998;7(3):195-204)。また、ジフテリアトキシン受容体として働く HB-EGF は、マウスではジフテリアトキシンに感受性を示さない。

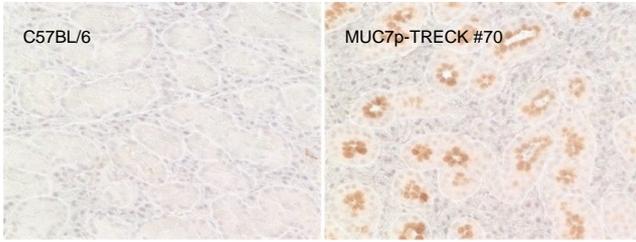
上記のベクターを C57BL/6 マウスの受精卵へマイクロインジェクションし、これをマウスの卵管に移植して、B6N-Tg(MUC7p-TRECK)#70 系統を樹立した。

hHB-EGF 発現の臓器特異性を RT-PCR と免疫染色により確認するため、遺伝子改変マウスから各種の臓器を摘出した。遺伝子改変マウスにジフテリアトキシン (500 ng/kg) を腹腔投与し、唾液腺組織傷害を検討した。唾液腺傷害の指標として唾液分泌量を測定し、加えて組織学的な評価のために H-E 染色、terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick-end labeling (TUNEL)法および DNA 傷害のサロゲートマーカーとして -H2A.X の分布状況を検討した。

次いで、C57BL/6 マウスの鼠径部から脂肪組織を摘出・細切した後に、タイプ コラゲナーゼにより分散し、複数の条件下で細胞培養し、脂肪由来幹細胞を豊富に含む間質血管細胞群を単離した。培養後、間質血管細胞群に含まれる脂肪由来幹細胞の存在率を検討するため、脂肪由来幹細胞マーカーである Sca-1 と CD44 を蛍光標識してフローサイトメーターを用いて総細胞数と脂肪由来幹細胞の数を求めた。

4. 研究成果

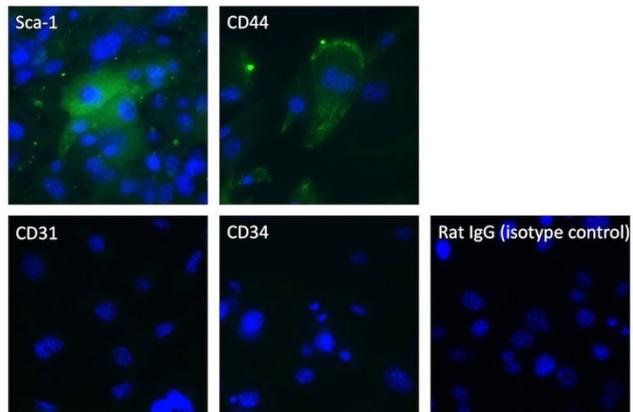
遺伝子改変マウスの hHB-EGF 発現を検討したところ、RT-PCR では唾液腺特異的に hHB-EGF 遺伝子の発現が、免疫染色ではマウスの顆粒導管細胞に hHB-EGF タンパクの発現が確認された。



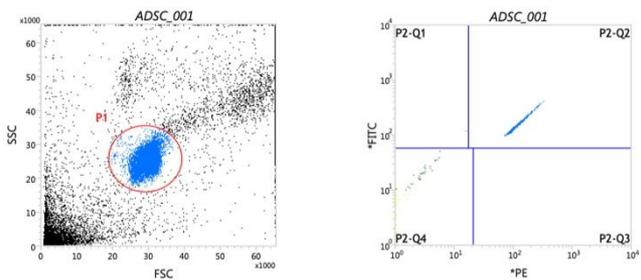
ジフテリアトキシン投与による唾液腺組織傷害を検討したところ、唾液腺分泌量の低下が生じた。組織学的には H-E 染色で唾液腺顆粒導管細胞を中心に細胞の萎縮とクロマチン濃縮が確認されたが、自己免疫疾患を示唆するリンパ球浸潤はみられなかった。TUNEL 法では同部位が陽性を示した。さらに、DNA 傷害のサロゲートマーカーとして γ -H2A.X の分布状況を確認したところ、唾液腺顆粒導管細胞の核に顆粒状の陽性反応を認めた。

以上の結果から、遺伝子改変マウスへのジフテリアトキシン投与により唾液腺特異的に細胞傷害を生じるモデルマウスが確立された。

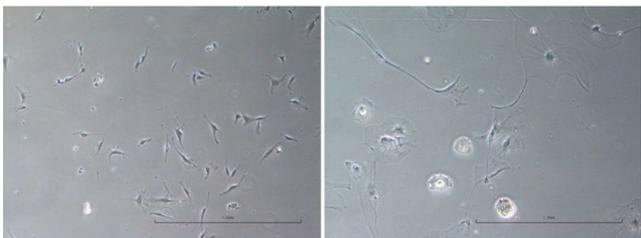
次いで、マウス脂肪組織由来脂肪由来幹細胞の培養系を確立するために、マウス鼠径部の脂肪組織から分離した間質血管細胞群を培養し、文献的に脂肪由来幹細胞において発現している幹細胞マーカーを蛍光染色で検討した。脂肪由来幹細胞マーカーである Sca-1 および CD44 陽性細胞が確認された。一方で、脈管内皮細胞マーカーである CD31 と造血幹細胞マーカーである CD34 は陰性であった。



培養 12 日目に間質血管細胞群をトリプシン処理により剥離し、脂肪由来幹細胞マーカーである FITC 標識抗 Sca-1 抗体と PE 標識抗 CD44 抗体で細胞を染色した後に、フローサイトメーターで細胞数を検討したところ、脂肪由来幹細胞の含有率は 31.2%であった。



間質血管細胞群は培養 1 日目では多稜形・紡錘形を呈すが、細胞の継代が進むに伴い大型化し、細胞増殖活性が低下したことから、細胞老化が生じていると考えられた。



以上の結果から細胞老化の制御により良好な脂肪由来幹細胞移植が達成できると示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Matsumoto Naoyuki, Omagari Daisuke, Ushikoshi-Nakayama Ryoko, Yamazaki Tomoe, Inoue Hiroko, Saito Ichiro | 4. 巻 88 |
| 2. 論文標題 Hyperglycemia Induces Generation of Reactive Oxygen Species and Accelerates Apoptotic Cell Death in Salivary Gland Cells | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Pathobiology | 6. 最初と最後の頁 234 ~ 241 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000512639 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Ushikoshi-Nakayama Ryoko, Yamazaki Tomoe, Omagari Daisuke, Matsumoto Naoyuki, Inoue Hiroko, Nukuzuma Chiyoko, Nishino Seiji, Saito Ichiro | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Evaluation of the benefits of neutral bicarbonate ionized water baths in an open-label, randomized, crossover trial | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 1261 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-024-51851-9 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Supriya Shakya, Ushikoshi-Nakayama Ryoko, Yamazaki Tomoe, Omagari Daisuke, Aota Keiko, Inoue Hiroko, Matsumoto Naoyuki, Saito Ichiro | 4. 巻 72 |
| 2. 論文標題 Effects of polyphenols in non-centrifugal cane sugar on saliva secretion: in vitro and in vivo experiments and a randomized controlled trial | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition | 6. 最初と最後の頁 171 ~ 182 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbrn.22-114 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Kizu Yasuhiro, Ishii Ryota, Matsumoto Naoyuki, Saito Ichiro | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Retrospective study on the effect of adipose stem cell transplantation on jaw bone regeneration | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Implant Dentistry | 6. 最初と最後の頁 3 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40729-024-00523-4 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 松本直行 |
| 2. 発表標題 高血糖による酸化ストレスを介した新たな唾液腺組織傷害の成立機序と抗酸化療法の可能性について |
| 3. 学会等名 第66回日本唾液腺学会学術集会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 松本 直行, 中山 亮子, 山崎 智恵, 井上 裕子, 斎藤 一郎 |
| 2. 発表標題 2型糖尿病の高血糖を介した唾液分泌障害の検討 |
| 3. 学会等名 第20回日本抗加齢医学会総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Supriya Shakya, Ushikoshi-Nakayama Ryoko, Yamazaki Tomoe, Omagari Daisuke, Aota Keiko, Inoue Hiroko, Matsumoto Naoyuki, Saito Ichiro |
| 2. 発表標題 Effects of polyphenols in non-centrifugal cane sugar on saliva secretion: in vitro and in vivo experiments and a randomized controlled trial |
| 3. 学会等名 第23回日本抗加齢医学会総会 |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 斎藤 一郎 (Saito Ichiro) (60147634) | 鶴見大学・歯学部・教授 (32710) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 中山 亮子 (Ushikoshi-Nakayama Ryoko) (50749843) | 鶴見大学・歯学部・助教 (32710) | |
| 研究分担者 | 尾曲 大輔 (Omagari Daisuke) (10608699) | 鶴見大学・歯学部・助教 (32710) | |
| 研究分担者 | 山崎 智恵 (Yamazaki Tomoe) (80817122) | 鶴見大学・歯学部・学部助手 (32710) | |
| 研究分担者 | 井上 裕子 (Inoue Hiroko) (50367306) | 日本薬科大学・薬学部・教授 (32425) | |

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 |
|---------|---------|
| | |