

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 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592224

研究課題名（和文）自己細胞移植による唾液腺再生マウスモデルの確立と臨床への応用

研究課題名（英文）Regeneration of salivary gland by autologous cell transplantation

研究代表者

平木 昭光（HIRAKI AKIMITSU）

熊本大学・大学院生命科学研究部・講師

研究者番号：60404034

研究成果の概要（和文）：

特殊な培地を用いて、マウス唾液腺より単一な唾液腺上皮細胞を分離し、二次元的な唾液腺細胞の分化誘導に関連する重要因子の同定し、さらに腺様構造の三次元的再構築を試みた。二次元的な分化誘導に関して、HGF、bFGF、FGF7、TGF- α/β （細胞増殖因子）、IV型コラーゲン、フィブロネクチン（細胞外基質）などの因子が重要な役割を演じている可能性が示唆された。三次元的再構築は再現性が非常に難しいが、HGFとIV型コラーゲンが重要な役割を演じている傾向が示唆された。

さらなる腺様構造の再構築の促進を図るためにはマウス唾液腺周囲由来の線維芽細胞を用いるなど、今後のさらなる検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：

We isolated monoclonal mouse epithelial salivary gland cells by original medium. By using the cells, we identified important factor associated differentiation induction of bidimensionally. Moreover we tried regeneration of the gland three-dimensionally. As a result, they indicated that HGF and type IV collagen play an important role in 3D regeneration of the salivary gland.

To reveal its mechanism, we need further study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：歯科医学

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・医学、細胞・組織、発生・分化、

1. 研究開始当初の背景

唾液は口腔機能を維持するだけでなく、人が健康で快適な生活を送る上で非常に重要な役割を演じている。しかし、唾液腺は加齢や薬剤によって機能低下を来たしやすく、口腔乾燥を訴える患者は増加傾向にあり、推定800万人もいるといわれている。また、口腔癌術後や放射線治療後、シェーグレン症候群患者では唾液分泌の低下が著明に認められ、健康維持を極度に低下させる。放射線治療後、シェーグレン症候群患者など、一部の口腔乾燥患者には塩酸セベメリンやピロカルピン塩酸塩などの唾液分泌促進薬が開発され、臨床的に頻用されているが、副作用の問題など課題となる点は残存している。ドライマウスとして社会的認識が高まった現在でも、対症療法に依存することが多く、さらなる有効な治療法の確立が必要である。

近年、血管や骨、心筋など種々の臓器で再生組織の臨床応用の報告が数多くなされているが、唾液腺再生医療の報告はいまだなされていない。その理由は、唾液腺の組織学的特異性、すなわち導管系細胞（線条部導管、介在部導管、主導管）、腺房細胞、筋上皮細胞、周囲の間葉系細胞といった多彩な細胞により構成されており、未だその幹細胞が同定されていないことが原因と考えられる。しかし、これらの細胞の起源とされる幹細胞を同定、分離、培養することによって、唾液腺再生医療への道が開け、現実となることが期待されている。

2. 研究の目的

(1) 唾液腺から分離・培養した上皮細胞を分化誘導し、形態的に三次元構築および機能の獲得

(2) 唾液腺細胞から三次元構築した組織を

利用した、マウス自己移植モデルの確立と臨床への応用

3. 研究の方法

(1) 唾液腺細胞の分化誘導に関連する重要因子の同定

(2) 唾液腺細胞による三次元構築

(3) 唾液腺細胞から三次元構築した組織のマウス自己移植と臨床への応用

4. 研究成果

(1) 唾液腺細胞の分化誘導に関連する重要因子の同定

形態的評価

①腺様構造の測定 ⇒ bFGFとHGF刺激により腺管腔様構造数の増加が見られ、IV型コラーゲンの基質上においてその傾向が強かった。

bFGF ≒ HGF、IV型コラーゲン > フィブロネクチン

②細胞内小器官の観察（電子顕微鏡） ⇒ 基質上での培養や細胞増殖因子・サイトカインの刺激時に細胞内小器官が発達している傾向が見られたが、それらの影響の差異は明らかでなかった。

bFGF ≒ FGF7 ≒ TGF- α/β ≒ HGF、IV型コラーゲン ≒ フィブロネクチン

機能的評価

①アミラーゼ・ムチン・アクアポリン5発現の検索 ⇒ 基質（IV型コラーゲン、フィブロネクチン）や細胞増殖因子・サイトカイン（bFGF、HGF）刺激にてアミラーゼの増加が見られた（ウエスタンブロット、免疫蛍光染色）。それらの因子による差異は明らかでなかった。

bFGF≒HGF、IV型コラーゲン≒フィブロネクチン

(2) 唾液腺細胞による三次元構築

唾液腺細胞を用いた三次元構造の再構築は再現性が非常に難しく、たびたびの検討を行った。今までの結果から唾液腺細胞が極性配列を呈しやすかったコラーゲンスポンジ(テルダーミス®)とマトリゲル®を混合したものを用い、さらに唾液腺細胞の腺管様配列と関連が深かったIV型コラーゲンをコーティング処理したものを三次元的骨格の土台として用いた。

形態的評価

- ①完全な腺様構造の形態は獲得できなかったが、細胞同士の接着(デスモソームタンパク、カドヘリンの出現)やわずかながら分枝の数の増加が認められた。この効果はHGF>bFGFであることが確認できた。
- ②細胞内小器官の発達(電子顕微鏡)に関与する細胞増殖因子に関しては、腺様構造の形態と同様な結果が得られ、効果はHGF>bFGFであることが確認できた。

機能評価

機能評価のマーカーとして用いたアミラーゼ、アクアポリン5(免疫蛍光染色)はHGF、bFGFの刺激によりともに誘導が促進され、その効果はHGF>bFGFであった。ムチンの発現は認めなかった。

三次元構築した唾液腺細胞のマウスへの自己移植については、唾液腺被膜下や固有唾液腺内への埋没法など、種々の方法にて試みるも再現性がある方法を確認することが難しく、新たな手法を用いることが課題である。

上記のことより、唾液腺細胞が3次元構築

を示すにあたり重要な因子としてIV型コラーゲンとHGFの関連が示唆されるが、さらなる促進を図るためにはマウス唾液腺周囲由来の線維芽細胞を用いるなど、唾液腺細胞と間葉系の細胞接着や相互作用等を検討し、利用することが今後必要と考えられた。

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)

1. Histopathological Changes in Parotid and Submandibular Glands of Patients Treated with Preoperative Chemoradiation Therapy for Oral Cancer
Keiko TESHIMA, Ryuji MURAKAMI, Ryoji YOSHIDA, Hideki NAKAYAMA, Akimitsu HIRAKI, Toshinori HIRAI, Yuji NAKAGUCHI, Naoko TSUJITA, Etsushi TOMITAKA, Mitsuhiro FURUSAWA, Yasuyuki YAMASHITA, Masanori SHINOHARA
Journal of Radiation Research 53(3) 492-496 2012. (査読有)

[学会発表](計2件)

1. 口腔癌の化学放射線療法における唾液変化と口腔粘膜炎に関する検討
竹下尚志、吉田遼司、平木昭光、高尾直宏、川原健太、中川純泰、永田将士、田中拓也、中山秀樹、篠原正徳
第31回日本口腔腫瘍学会総会 2013年1月24~25日 秋葉原コンベンションホール 東京
2. 唾液腺腫瘍98例の臨床統計的検討
吉田遼司、平木昭光、中山秀樹、丸瀬靖之、永田将士、田中拓也、川原健太、中川純泰、廣末晃之、吉武義泰、太田和俊、篠原正徳

第 31 回日本口腔腫瘍学会総会 2013 年 1 月
24～25 日 秋葉原コンベンションホール
東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平木 昭光 (HIRAKI AKIMITSU)
熊本大学・大学院生命科学研究部・講師
研究者番号：60404034

(2) 研究分担者

篠原 正徳 (SHINOHARA MASANORI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：90117127