

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792131

研究課題名(和文)唾液腺細胞の継代安定培養法を用いた唾液分泌細胞再生療法の開発

研究課題名(英文)Establishment of novel culturing system for salivary gland cells

研究代表者

笠松 厚志(KASAMATSU, ATSUSHI)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60375730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：唾液腺障害は頭頸部癌に対する放射線療法等により生じ、口腔機能障害の原因となっている。今回我々はRock作用薬を用いた新規の唾液腺培養法を考案し、その有用性の検索を行った。結果としてRock作用薬の下流に位置する細胞形態因子に作用することで、唾液腺細胞が形態を変えずに培養が可能であった。さらにヌードマウスに移植して作成した腫瘍においても、唾液腺マーカーを発現していることを確認した。一方、Rock作用薬の生体への応用の安全性を確認する目的で遺伝子学的および病理学的な毒性試験を行ったところ、有害性は認められなかった。以上より、獲得したデータは、唾液腺細胞治療確立を目指すうえで非常に有用と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Salivary gland (SG) dysfunction occurs as a result of radiation therapy for head cancer, and can cause a variety of critical oral health issues. In the present study, we demonstrated here a new culture system using rock-related agent (RRA) for SG cells. In addition to protein expression data that downstream molecules of RRA treatment associated with morphological changes were inhibited, we found that the RRA-treated cells showed SG like cell shape without fibroblastic differentiation, and their xenografts as well as the RRA-treated cells highly expressed the SG markers (amylase, aquaporin-5, and mucin). Furthermore, we assessed cytotoxicity of RRA to see whether we can use those reagents for clinical study. Karyotype and toxicity tests showed that RRA does not affect any genetic changes and pathological damages in vitro and in vivo models. These data suggest that our method would be important information for cell therapy of damaged SG in the near future.

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：唾液腺再生医療 口唇腺細胞 Rock作用薬

1. 研究開始当初の背景

唾液は口腔・食道の粘膜免疫に重要な役割を果たすだけでなく、摂食・嚥下などの機能にも大きく関与している。このため、加齢、自己免疫疾患、放射線治療等による唾液腺萎縮が引き起す唾液分泌量の低下は様々な障害の原因となり、患者の QOL を左右する重要な因子の一つとされている。これまで、我々は唾液の主要成分であるアミラーゼによる口腔内消化が、腸管内消化や血糖値調節において重要な役割があることが明らかになっている(若手スタートアップ・平成 21 年～平成 22 年・代表/本申請者; J Diabetes Invest, Vol 3, 156-163, 2012)。

唾液腺の機能回復を狙った様々な研究が盛んに行われているものの、治療法に発展するデータの獲得には至っていないのが現状である。その最大の理由は、唾液分泌能を維持したまま唾液腺細胞の培養が不可能である事、また、世界中の研究室で使用されている唾液腺細胞株(HSG)が HeLa 細胞(子宮頸部癌細胞)の汚染株であったということが挙げられる。そこで我々は、独自に開発した唾液腺細胞の機能を有したまま初代培養を行う唾液腺長期培養法の詳細について、本申請研究にて検証を行った。

2. 研究の目的

唾液腺細胞を Rock 作用薬を用いて培養することで、唾液腺細胞の初代培養が確実に且つ簡単に可能となった。その細胞は細胞増殖、細胞形態、唾液腺マーカー等の発現は正常唾液腺とほぼ同等の特徴を有しており、唾液腺再生療法の糸口になることが大いに期待できる。我々の確立したこの培養方法は技術移転することで飛躍的に研究が進み、最終的に再生医療の現場まで応用が可能となれば、唾液分泌障害を持つ患者にとって朗報となる事は間違いない。最終ゴールは正常唾液腺培養細胞を用いた唾液腺再生療法の確立である事から、出来るだけ早い段階で唾液腺細胞が培養可能となったメカニズムを解明し、さらには臨床応用も見据え安全性の確認をする事が重要と考える。

3. 研究の方法

本申請研究は、唾液腺(口唇腺)を採取し、実験室で細胞増殖後に再度患者に戻すことで唾液腺機能の回復を狙ったものである。この最終目標を達成するため、本申請では以下の点を中心に実験を遂行した。

(1) Rock 作用薬含有培地にて培養した唾液腺細胞において引き起こされるイベントを解析する。

Rock パスウェイを中心にタンパク発現量やリン酸化の状況をウエスタンブロット法にて解析した。

唾液腺特異的マーカーの発現を細胞免疫蛍光染色法にて解析した。

Rock 作用薬の有無によって引き起こされる細胞形態学的変化を細胞骨格の細胞免疫蛍光染色法を用いて解析した。

(2) ノードマウスに形成した腫瘍について遺伝子及びタンパク質の発現解析を行う。

唾液腺特異的マーカーの発現解析をリアルタイム RT-PCR、ウエスタンブロット法、免疫組織化学染色法を用いて解析した。

腫瘍における細胞増殖能を免疫組織化学染色法を用いて解析した。

(3) 臨床応用を考え細胞障害性(安全性)の確認を行う。

初代培養した口唇腺細胞を Rock 作用薬の含まれる培地で培養し、遺伝子障害の有無を核型解析法を用いて解析した。

初代培養した口唇腺細胞を Rock 作用薬を含む培地で培養を行い、不死化やアポトーシスについてリアルタイム RT-PCR 法及びウエスタンブロット法にて解析を行った。

Rock 作用薬をノードマウスの腹腔内投与した際に引き起すマウス臓器に対する障害性を病理組織学的に改正した。

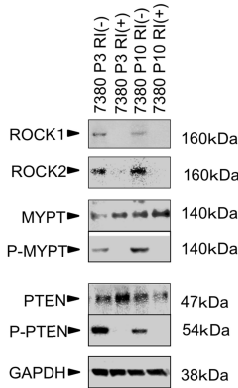
4. 研究成果

(1) 唾液腺細胞における Rock 作用薬の影響

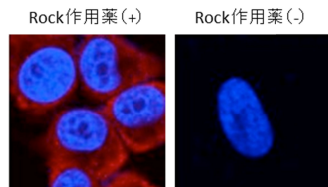
継代可能となった唾液腺細胞における Rock 作用薬の影響を Rock パスウェイ中心に検証した。

Rock 作用薬が作用する Rock の下流から、細胞形態に關与する MYPT、F-actin、細胞の生存に關与する PTEN の発現を検討した。

Rock 作用薬を用いて培養した細胞ではリン酸化 MYPT および PTEN の発現が減弱していた。

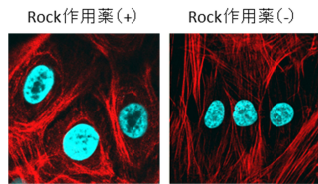


Rock 作用薬を用いて継代可能となった唾液腺細胞における唾液腺特異的マーカーの発現状態を免疫蛍光染色法にて確認した。Rock 作用薬を使用した細胞と比べて全てのマーカータンパクの発現が確認された。



赤: アミラーゼ、青: 細胞核

形態学的変化を検証するため F-actin の免疫蛍光染色法を行ったところ、右図に示すように Rock 作用薬の有無により明らかな走行の違いが認められた。

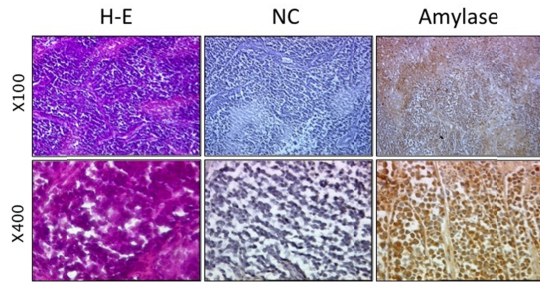


赤: F-actin、青: 細胞核

(2) ノードマウスに形成した腫瘍の遺伝子及びタンパク質発現解析

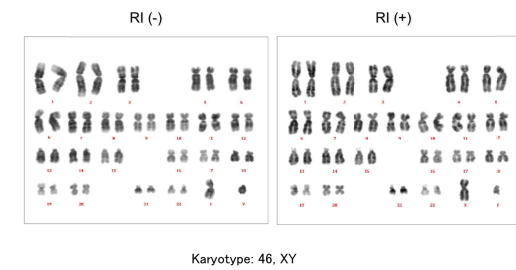
RT-PCR を用いて唾液腺マーカーの遺伝子発現を行った。マウスに形成された腫瘍はマーカーの発現が高く、下図に示すようにタンパク発現も同様に高発現していた。

マウスに形成した腫瘍の増殖能を PCNA を用いて免疫染色したところ、発現を認めるものの、コントロールとの比較した場合、有意に差が認められなかった。



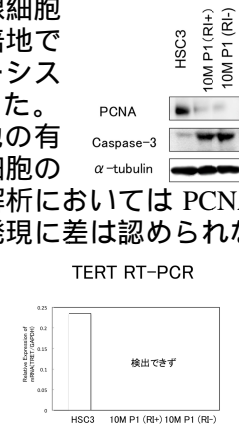
(3) Rock 作用薬の細胞障害性(安全性)

初代培養した口唇腺細胞を Rock 作用薬の含まれる培地で培養することで引き起こされる遺伝子障害の有無を核型解析法で検討した。下図に示すように核型解析において遺伝子学的異常は認めなかった。

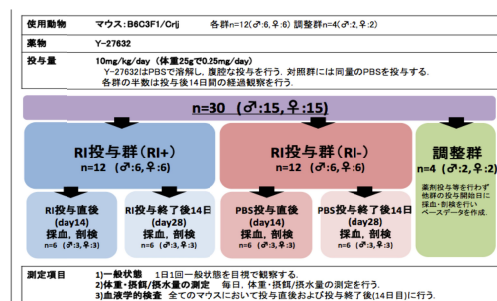


初代培養した口唇腺細胞を Rock 作用薬含有培地で培養を行い、アポトーシスについて解析を行った。Rock 作用薬含有培地の有無で培養した唾液腺細胞のタンパクレベルでの解析においては PCNA および Caspase-3 の発現に差は認められなかった。

また、TERT の発現は唾液腺細胞では検出できなかった (右図)。



Rock 作用薬をヌードマウスの腹腔内投与した際のマウス臓器に対する障害性を HE 染色にて健常マウスと比較するため下記のプロトコールで毒性試験を行った。



血液学検査、体重推移、病理組織学的検索

において異常所見は認めず、Rock 作用薬の安全性が確認された。

[まとめ]

本申請研究では Rock 作用薬を用いることで、唾液腺細胞が形態を保持したまま可能となったメカニズムを検索した。具体的には、Rock 作用薬を用いることで細胞増殖、アポトーシス、細胞不死化は認めなかったが、Rock 作用薬の下流に位置する因子のうち細胞形態に関与する分子のリン酸化が抑制されていることが明らかになった。したがって、Rock 作用薬によって細胞形態を維持することで、唾液腺細胞の特徴を有したまま長期培養が可能になったのではないかと考えられた。一方、臨床応用も視野に入れ Rock 作用薬の毒性試験を施行したところ、遺伝子学的だけでなく、生体（マウス）の各臓器に対しても障害性を認めなかったことから、今後の動物実験が安全に遂行できると考えられた。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

笠松 厚志 (KASAMATSU ATSUSHI)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60375730