

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463092

研究課題名(和文) 唾液腺幹細胞を用いた機能障害唾液腺修復モデルの確立と臨床への応用

研究課題名(英文) Regeneration of hypofunctional salivary gland with the stem-like cell

研究代表者

平木 昭光 (Hiraki, Akimitsu)

福岡歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：60404034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：放射線照射したマウス顎下腺組織において、 $\alpha$ -アミラーゼ、EGF、EGFR、HGF、c-Met、bFGF、FGFRはタンパクおよび遺伝子発現が減少し、顎下腺の機能低下と成長因子・成長因子レセプターの減少が確認できた。マウス顎下腺幹細胞に放射線照射(2.0Gy)を行ったところ、顎下腺組織と同様の傾向を示した。放射線照射した顎下腺幹細胞をIV型コラーゲンと高Ca培地で分化誘導を行うと、腺様配列の構築と $\alpha$ -アミラーゼの発現の上昇が認められ、放射線障害顎下腺細胞の機能修復の可能性が示唆された。本研究ではEGF、KGFおよびIV型コラーゲンが放射線障害による機能低下・修復に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We observed submandibular gland of irradiated mouse decreased  $\alpha$ -amylase, EGF, EGFR, HGF, c-Met, bFGF and FGFR. The stem-like cell of mouse submandibular gland showed similar findings to them with exposure to radiation. From the results of these experiments, we induced regeneration of the stem-like cell suffered from radiation damage and demonstrated EGF, KGF and type IV collagen play an important role in function recovery. To clear its mechanism, we require further research.

研究分野：外科系歯学

キーワード：唾液腺 再生 放射線

1. 研究開始当初の背景

加齢による唾液腺の機能低下や口腔癌の放射線治療によって、著明な唾液分泌の減少により QOL の低下を来した症例に遭遇する機会は多い。残存機能を標的とした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臨床応用されているものの、その効果には限界が多いのが現状であった。

近年、皮膚、心筋、角膜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、確立した唾液腺再生医療の報告はいまだなされていなかった。その理由は、唾液腺の組織学的特異性、すなわち腺房細胞、導管系細胞(線条部導管、介在部導管、主導管)、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いること、また、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た。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ることが期待されていた。

申請者は以前より、低カルシウム無血清培養液を用いることで、ヒトおよびマウスの唾液腺組織から均一な唾液腺導管細胞を分離・培養できることを確認した。その細胞は高カルシウム濃度への変化と EGF 刺激、さらに I 型コラーゲンを主とする細胞外器質によって二次元的に腺管様配列を誘導できた。機能的にはアミラーゼのタンパクおよび遺伝子レベルでの発現増加や、形態学的には電子顕微鏡による超微構造の成熟変化を確認した。さらに HGF 等の細胞増殖因子やフィブロネクチンを主とする細胞外器質による影響を確認していた。つまりその導管細胞は形態的、機能的に分化誘導が示唆され、唾液腺幹細胞の性質を持つ可能性が示唆された (J.Cell.Physiol.2002)。また、マウス胎児の顎下腺を器官培養し、その分子形成に HGF が大きく関与していることを報告していた (Developmental Dynamics.2003)。

2. 研究の目的

加齢による退行変化や放射線障害で機能低下をきたした唾液腺組織の腺房細胞は減少し、導管細胞が残存するという細胞脱分化様の変化を呈している (Am J Physiol. 2008)。その生物学的変化を明らかにするとともに、申請者らが分化誘導を行ってきた分離唾液腺幹細胞や器官培養法を用いることにより、唾液腺修復の解析が可能と考えられ、以下の項目を本研究の目的とした。

本研究の目的

①加齢および放射線障害により機能低下をきたしたマウス唾液腺の解析

②マウス唾液腺幹細胞を用いた放射線照射による細胞障害の解析

マウス唾液腺幹細胞を用いた分化誘導による細胞機能修復の解析

3. 研究の方法

1. 加齢および放射線障害により機能低下をきたしたマウス唾液腺の解析

放射線照射前後や加齢前後の顎下腺の成長因子やそのレセプター、細胞外基質の発現を解析し、いわゆる機能低下関連タンパクを同定する。

II. マウス唾液腺幹細胞を用いた放射線照射による細胞障害の解析

マウス顎下腺幹細胞に放射線照射を行い、-アミラーゼや細胞増殖、形態変化、成長因子、レセプター、細胞外基質の発現を解析し、細胞障害の概要を解析する。

III. マウス唾液腺幹細胞を用いた分化誘導による細胞機能修復の解析

放射線照射を行ったマウス顎下腺幹細胞に成長因子や細胞外基質、Ca 濃度の変化によって分化誘導し、細胞機能修復を行う

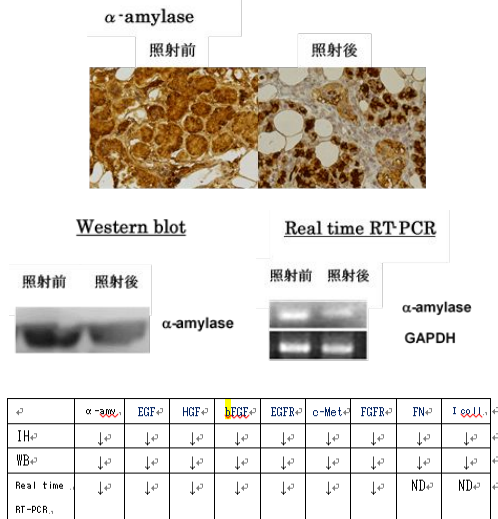
4. 研究成果

1. 加齢および放射線障害により機能低下をきたしたマウス唾液腺の解析

1) 放射線照射マウス顎下腺の解析

4週齢の顎下腺と放射線照射した20週齢の顎下腺を摘出してタンパク抽出を行い、機能マーカーである -アミラーゼと、分化・増殖に関わるタンパク(EGF、EGFR、HGF、c-Met、bFGF、FGFR、フィブロネクチン、I型コラーゲン)の変化を免疫染色およびウェスタンブロット法にて検索した。

その結果、EGF、HGF、FGF タンパクの発現量は減少し、そのレセプターである EGFR、c-Met、FGFR や細胞外基質のフィブロネクチン、I型コラーゲンも同様に減少した。それぞれの顎下腺の免疫組織染色による検索も同様な結果を示した。Real time RT-PCR による検索も EGF、EGFR、HGF、c-Met、bFGF、FGFR の遺伝子発現は減少し、同様の傾向を示した。



2) 加齢マウス顎下腺の解析

正常マウス 24 週齢、老化推進モデルマウス 48 週齢の顎下腺を摘出し、同様の検索を行った。

その結果、-アミラーゼ、EGF、HGF、FGF タンパクの発現量は減少し、そのレセプターである EGFR、c-Met、FGFR や細胞外基質のフィブロネクチン、I型コラーゲンもわずかに減少した。それぞれの顎下腺の免疫組織染色に

よる検索も同様な結果を示した。real time PCR による検索も EGF、EGFR、HGF、c-Met、bFGF、FGFR の遺伝子発現は減少し、同様の傾向を示した。

### II. マウス唾液腺幹細胞を用いた放射線照射による細胞障害の解析

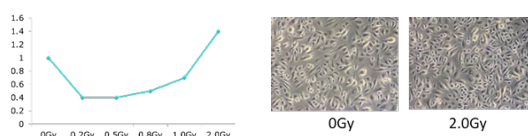
24 週齢の正常マウスから顎下腺を摘出し、0.2mM Ca 無血清培地を用いて顎下腺幹細胞を分離し、実験に用いた。放射線照射は control、0.2Gy、0.6Gy、1.0Gy、2.0Gy をそれぞれ単照射し、48 時間後に細胞増殖曲線を作成、細胞形態観察を行い、細胞溶解液を採取した。

#### 1) 細胞増殖に与える影響

増殖能は 0.2Gy で最も低下し、照射量の増加と共に増加傾向を示し、2.0Gy で最も高くなり、コントロールの 1.4 倍であった。

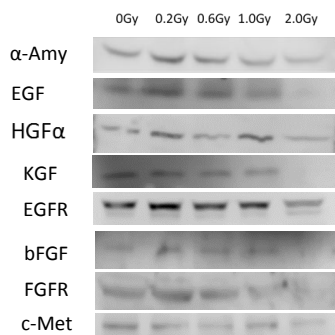
#### 2) 形態的变化

2.0Gy までの照射では形態的变化を認めなかった (照射後 48 時間)。



### 3) 発現タンパクの変化 (ウェスタンブロット法)

2.0Gy 照射でアミラーゼ、EGF、EGFR、HGF、c-Met、KGF、bFGF、FGFR は減少した。



#### 4) 発現遺伝子の変化 (real time RT-PCR)

EGF、EGFR、HGF、bFGF はタンパク発現と相関がみられた。

2.0Gy で放射線照射の影響が観察され、唾液腺細胞の増殖や修復に関係していると思われる成長因子の減少が確認された。

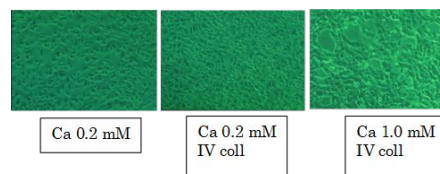
### III. マウス唾液腺幹細胞を用いた分化誘導による細胞機能修復の解析

マウス顎下腺幹細胞に 2.0Gy の放射線を照射し、その後 IV 型コラーゲン基質と高カルシウム培地 (1.0 mM) を用いて細胞の分化誘導を行うとともに、放射線照射によって減少した成長因子 EGF、KGF、bFGF にて刺激した。細胞増殖に与える影響や形態的变化を検索し、細胞機能修復の指標として唾液腺特異的なタンパクであるアミラーゼの発現の解析を行った。

1) 細胞増殖に与える影響: 放射線 2.0Gy 照射した細胞を IV 型コラーゲンコートディッ

シユ上で培養を行うと細胞増殖は 115% に増加した。さらに、その培地のカルシウム濃度を上昇させると (0.2 mM 1.0 mM)、細胞増殖は 90% に減少した。

2) 形態的变化: IV 型コラーゲン上の培養による変化は認めなかった。培地のカルシウム濃度を上昇により、個々の細胞は立方形からやや紡錘形に変化した。細胞の配列は敷石状から円形を形成するような腺様構造の構築が認められた。



3) アミラーゼ発現の変化: EGF、KGF 刺激によって、細胞内と細胞上清中のアミラーゼの上昇が確認された。bFGF においてそれらの変化は認めなかった。ウエスタンブロットと免疫染色で同様の結果が得られた。

### まとめ

放射線照射したマウス顎下腺組織において、-アミラーゼ、EGF、EGFR、HGF、c-Met、bFGF、FGFR はタンパクおよび遺伝子発現が減少し、顎下腺の機能低下と成長因子・成長因子レセプターの減少が確認できた。

マウス顎下腺から分離・培養した顎下腺幹細胞に放射線照射 (2.0Gy) を行ったところ、顎下腺幹細胞は放射線照射に対し、顎下腺組織と同様の傾向を示した。

2.0Gy 放射線照射した顎下腺幹細胞を IV 型コラーゲンと高 Ca 培地で分化誘導を行うと、腺様配列の構築と -アミラーゼの発現の上昇が認められ、放射線障害顎下腺細胞の機能修復の可能性が示唆された。本研究では EGF、KGF および IV 型コラーゲンが放射線障害による機能低下・修復に関与している可能性が示唆され、今後はマウス顎下腺組織の修復について検討を進めたい。

### 引用文献

- (1) Hiraki A., Shirasuna K et al. (2002): Calcium induces Differentiation of primary human salivary acinar cells. J.Cell.Physiol. 193:55-63
- (2) Ikari T., Hiraki A et al. (2003): Involvement of hepatocyte growth factor (HGF) in branching morphogenesis of murine salivary gland. Developmental Dynamics. 228:173-184

### 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)

吉田遼司、平木昭光、丸瀬靖之、永田将士、廣末晃之、川原健太、松岡祐一郎、篠原正徳、

中山秀樹、口腔小唾液腺腫瘍 73 症例の臨床統計学的検討、口腔腫瘍学会誌、査読有、27 巻 4 号、2015、127～134

〔学会発表〕(計 7 件)

1. シェーグレン症候群患者血清中の抗アクアポリン 5 自己抗体の存在とその意義に関する研究

磯濱洋一郎、本多裕亮、久恒昭哲、平木昭光、篠原正徳、牧野貴充、香月博志

第 12 回九州シェーグレン症候群研究会 2013 年 5 月 18 日 福岡

2. Radioresistance of metastatic tumor cells in oral squamous cell carcinoma

Hirosue A, Tanaka T, Nakagawa Y, Hiraki A, and Shinohara M.

第 73 回日本癌学会 2014 年 9 月 25～27 日 横浜

3. 口腔内小唾液腺腫瘍 73 例の臨床統計学的検討

吉田遼司、川原健太、永田将士、廣末晃之、松岡祐一郎、坂田純基、有田英生、中嶋光、平木昭光、中山秀樹

第 33 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 2015 年 1 月 29～30 日 奈良

4. Radioresistance of metastatic tumor cells in oral squamous cell carcinoma

川原健太、吉田遼司、廣末晃之、田中拓也、永田将士、松岡祐一郎、湯野晃、有田英生、坂田純基、平木昭光、中山秀樹、篠原正徳

第 39 回日本頭頸部癌学会、第 4 回アジア頭頸部癌学会 2015 年 6 月 4～6 日 神戸

5. IL-6 confers radioresistance via Nrf2 antioxidant pathway in oral squamous cell carcinoma cells.

松岡祐一郎、吉田遼司、廣末晃之、田中拓也、永田将士、川原 健太、有田英生、坂田純基、中嶋 光、平木昭光、篠原正徳、中山秀樹

第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8～10 日 名古屋

6. 口腔癌の化学放射線療法における唾液量の変化に関する臨床的検討

臨床的影響因子や放射線性粘膜炎との関連について

有田英生、平木昭光、川原健太、上村恭子、吉田遼司、永田将士、松岡祐一郎、中川純泰、田中拓也、福間大喜、篠原正徳、中山秀樹

第 60 回日本唾液腺学会学術集会 2015 年 12 月 5 日 東京

7. 口腔癌の化学放射線治療と唾液の変化に関する検討 (優秀ポスター賞受賞)

川原健太、平木昭光、有田英生、上村恭子、吉田遼司、永田将士、松岡祐一郎、田中拓也、廣末晃之、福間大喜、篠原正徳、中山秀樹

第 33 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 2016 年 1 月 21～22 日 横浜

〔図書〕(計 1 件)

内科外来で診るマイナーエマージェンシー 唾石症の急性発作

平木昭光

211 2014 文光堂

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平木 昭光 (HIRAKI AKIMITSU)

福岡歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号 : 60404034

(2) 研究分担者

篠原正徳 (MASANORI SHINOHARA)

熊本大学・医学部附属病院・その他

研究者番号 : 90117127

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :