

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463286

研究課題名(和文) 唾液分泌低下に対するケア開発に向けた唾液分泌モデル系の構築

研究課題名(英文) The salivary gland culture system for developing the care of xerostomia.

## 研究代表者

関亦 明子 (SEKIMATA, Akiko)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：50321823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)： 唾液分泌障害は、がん放射線治療、化学療法などによって引き起こされ、患者の生活の質(quality of life: QOL)を低下させる。我々は、このような唾液分泌障害が生じるメカニズムの解明や、がん治療時の有害事象の予防的ケアの開発に使用できる唾液腺体外培養系の構築を目標として研究を行った。本研究の結果、マウス培養唾液腺上皮組織に添加する増殖因子の組み合わせを変えることで、幹細胞様の細胞や唾液分泌細胞の割合を変化させることができ、目的とする唾液腺体外培養系を構築できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： Radiotherapy for head and neck cancers and/or chemotherapy can cause salivary gland dysfunction and subsequent xerostomia, leading to poor quality of life (QOL) in cancer survivors. To understand the molecular mechanism of the salivary gland dysfunction and develop a preventive care, we are trying to establish an ex vivo salivary gland culture system. To develop the culture system, we tested the effects of growth factors on cultured epithelia of mouse embryonic submandibular glands. This study showed that it is possible to establish the ex vivo salivary gland culture system which can maintain c-Kit+ cells by adding NRG1 + FGF1 and differentiate into AQP5+ cells by removing FGF1 whenever necessary.

研究分野：基礎看護学、細胞生物学

キーワード：唾液分泌低下 放射線療法 がん化学療法 がん治療の有害事象 唾液腺培養系

### 1. 研究開始当初の背景

がん化学療法や頭頸部領域の放射線療法後に引き起こされる唾液分泌低下を予防することができないか、という発想から本研究を着想した。

唾液分泌の低下は、命に直接関わることが少ないことから、根本的な解決に向けた基礎的な研究はこれまで多くはなかった。しかし、唾液分泌の低下による患者の QOL 低下が著しいため、がん治療においても臨床上の大きな問題のひとつとなっている。唾液分泌の低下によって、嚥下困難や味覚異常、感染症等、口腔内の様々なトラブルが誘発され、患者の闘病意欲の低下や、時に命を脅かす重大な結果となることがある。

放射線療法や化学療法では、治療後に発生することが多い虫歯や感染による口腔内トラブル軽減のために、治療前の歯科治療や治療前からの口腔ケアの習慣づけを行うことによって、治療後のトラブルは減少している。しかし、唾液分泌の低下については治療前からの予防策はほとんど行われてこなかった。

### 2. 研究の目的

唾液分泌低下の予防と分泌促進法の開発による看護ケアと治療への貢献を目指した。

本研究では、哺乳類唾液腺の分泌機能を維持した培養モデルを構築し、将来は非侵襲的に、特に化学療法や放射線療法時の積極的な唾液分泌低下予防と分泌促進ケアの開発に貢献することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 実験に使用したマウス: 生後 8 週以降の雌と 10 週以降の雄 [Jcl: ICR マウス (日本クレア)] を 18 時以降に同一ケージに入れて掛け合わせ、翌日の朝に膣栓を確認し妊娠 0 日目 (E0) とした。妊娠 13 日目 (E13) のマウスを顎下腺上皮組織の培養実験に使用した。

(2) 顎下腺上皮組織の培養: Hanks' Blanced Salt Solution (+) [HBSS (+)] 中に取り出した E13 の胎児から顎下腺原基を摘出し、間葉組織を除去後、Matrigel® で覆い、増殖因子を添加した培地を加え、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。上皮組織の形態観察では、蛍光実体顕微鏡 (MZ FLIII, Leica), カラー冷却 CCD カメラ [Q550 (IM50), Leica] を使用し、撮影した顎下腺上皮組織の写真は ImageJ 1.49v (National Institute of Health) で二階調化して、その上皮組織の平面全体 (Area) を測定して増殖サイズを数値化した。

(3) 培地の組成と添加した増殖因子: 培地は Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's F-12 (和光純薬) を用い、これに 0.1% bovine serum albumin: BSA, Insulin-Transferrin-Selenium-G supplement, 10 μM Lysophosphatidic acid:

LPA を添加して基礎培地とした。

増殖因子は NRG1, TGF- $\alpha$ , FGF1 をそれぞれ基礎培地に添加して使用した。

(4) フローサイトメトリー: 3 日間培養した顎下腺上皮組織の細胞を分離し、解析のために各種抗体を添加した。細胞解析にはフローサイトメーター (FACSCanto™ II, BD Biosciences) を使用した。

c-Kit 検出のために FITC conjugated anti-CD117 (c-Kit) を、E-Cadherin 検出のために PE conjugated anti-E-Cadherin を、Aquaporin5 (AQP5) 検出のために anti-AQP5, rabbit monoclonal とそれに対する二次抗体として、Alexa Fluor® 647 conjugated anti-rabbit を使用した。

### 4. 研究成果

(1) 顎下腺上皮組織培養における形態への増殖因子の効果: 成体の腺房は唾液分泌細胞で占められているが、本研究では E13 顎下腺の 3 日間体外培養において腺房への分化が確認できていないため、腺房にあたる部分を小葉と呼ぶことにした。これまでの研究<sup>①②</sup>による培養唾液腺上皮組織の形態形成の再現性を確認するために、NRG1, TGF- $\alpha$ , FGF1 をそれぞれ単独で添加した培地で顎下腺上皮組織を 3 日間培養し、形態変化を観察した。基礎培地のみでは、Day3 までに上皮組織の萎縮がみられたが、NRG1, TGF- $\alpha$  を添加した上皮組織では小葉の増殖が観察され (図. 1a, b), FGF1 を添加した場合は、導管の伸長が観察された (図. 1c)。上皮組織は Day4 以降では組織に気泡状の空洞が出現し、組織の形態が崩れ始めるため、本報告では Day3 までの結果を示した。本研究においても、これまで観察されているそれぞれの増殖因子の効果が見られた。

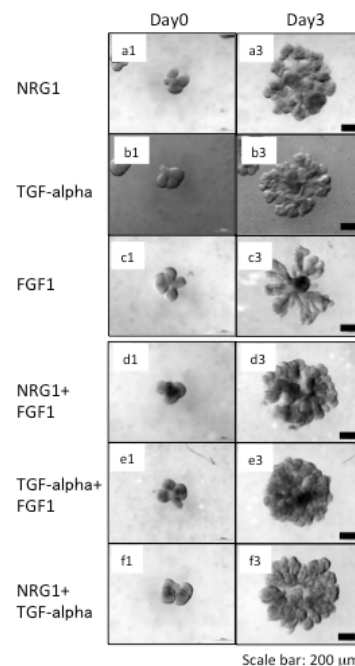


図 1. 培養顎下腺上皮組織の形態変化

次に増殖因子 2 種類の組み合わせによる組織培養を行った結果、NRG1+FGF1, TGF- $\alpha$ +FGF1, NRG1+ TGF- $\alpha$  のどの組み合わせでも小葉の増殖が観察された (図. 1d, e, f)。唾液腺幹細胞の多くが導管に局在していると考えられており、我々の培養実験でも FGF1 単独の添加で導管が伸長したことから、唾液腺幹細胞を増殖させるには FGF1 が有効なのではないかと推測された。しかし、FGF1 単独の培養と違い、NRG1 や TGF- $\alpha$  を FGF1 と組み合わせても顕著な導管の増殖は観察されなかった。

培養した顎下腺上皮組織の増殖サイズを数値化すると、基礎培地のみ (NT, 表. 1) では、培養開始時点 (Day0) では  $133 \pm 40$  であったが、Day3 では  $46 \pm 31$  となり、組織が萎縮した。基礎培地に増殖因子を添加した場合は Day3 までの培養でそのサイズが増大した (表. 1)。実験日毎に、各増殖因子添加群で対応のないノンパラメトリック多重検定 (Kruskal Wallis H-test) をおこなったところ、Day3 で有意差がみられたため、次に各増殖因子添加群間で比較を行ったが、各増殖因子添加群間ではみられなかった。

表. 1. 顎下腺上皮組織の体外培養における増殖サイズの変化

	Day0	Day3	n
NT	$133 \pm 40$	$46 \pm 31$	6
NRG1	$130 \pm 16$	$660 \pm 172^{**}$	20
TGF- $\alpha$	$112 \pm 25$	$804 \pm 194^{**}$	15
FGF1	$141 \pm 52$	$709 \pm 187^{**}$	5
NRG1+FGF1	$121 \pm 31$	$685 \pm 173^{**}$	20
TGF- $\alpha$ +FGF1	$122 \pm 41$	$690 \pm 245^{**}$	6
NRG1+TGF- $\alpha$	$125 \pm 28$	$831 \pm 244^{**}$	19

NT: non-treatment (基礎培地だけの結果)

数字は ImageJ による Area スケールの標本平均値 (単位無)  $\pm$  不偏標準偏差を示す。

\*\*  $p < 0.01$  (vs. NT) : unpaired, non-parametric

唾液腺幹細胞が増加しているのか、唾液分泌細胞へ分化した細胞が増加しているのか、ここまでの形態の観察からでは、細胞の性質を知るには限界があった。そこで次に、幹細胞増殖における FGF1 の効果を 3 日間培養した顎下腺上皮組織細胞の表面マーカーを用いたフローサイトメーターで解析した。

(2) 細胞表面マーカーを用いた細胞解析: 細胞表面マーカーの解析において FGF1 と NRG1 を組み合わせる顎下腺上皮の培養を行い、その表面マーカーの変化を解析した。顎下腺上皮細胞は細胞接着分子 E-Cadherin (E-CDH) を発現している。今回の実験では細胞解析において、増殖因子存在下で 3 日間培養した顎下腺上皮細胞を識別するために E-CDH を、唾液腺幹細胞には c-Kit を、唾液分泌細胞には Aquaporin5 (AQP5) をそれぞれマーカーとして解析に用いた。

フローサイトメーターによる解析後、その解析過程で、小さすぎるものや死細胞集団を除き、抗体未処理群 (none, 図. 2-A, B とともに

に上段パネル) を基礎として、抗 c-Kit 抗体、抗 AQP5 抗体の単独染色の結果を考慮して、4 分割の陰性ラインを決定した。

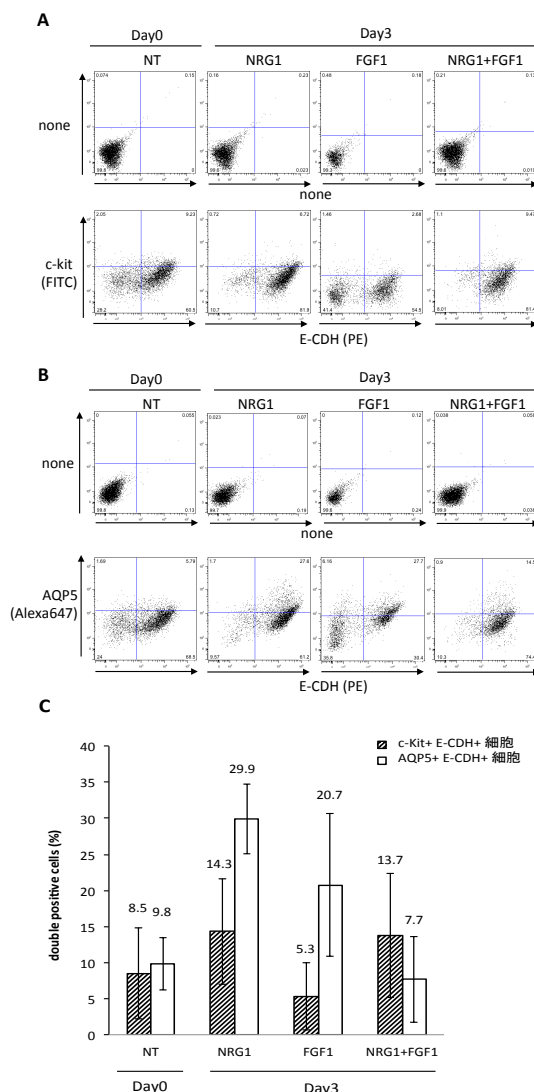


図 2. 培養顎下腺のフローサイトメーターによる細胞表面マーカーの観察

E-CDH 陽性かつ c-Kit 陽性 (c-Kit+ E-CDH+) 細胞と E-CDH 陽性かつ AQP5 陽性 (AQP5+ E-CDH+) 細胞のそれぞれの二重陽性 (double positive cells, 図. 2-A, B, 各パネル 4 つのエリアの右上) の細胞存在率を調べた。細胞解析は生物学的に非依存的に 3 回ずつ行い、その結果を図. 2-C にグラフとして示した。AQP5+ E-CDH+細胞の割合は、NRG1, FGF1 それぞれ単独の添加で Day0 と比較して増加がみられ、特に効果が大きかったのは、NRG1 単独の添加で、 $29.9 \pm 4.8\%$ であった。この割合は Day0 と比較して 3.1 倍であった。c-Kit+ E-CDH+細胞の割合は、NRG1 単独の添加でも増加がみられたが、NRG1+FGF1 の組み合わせで AQP5+ 細胞の割合を上回っていた。以上の傾向がみられたが、NT に対する対応のないノンパラメトリック多重検定 (Kruskal Wallis H-test) をおこなったところ、有意差はみられなかった。

(3) **まとめ**:本研究の結果, マウス顎下腺上皮組織の体外培養においてNRG1とFGF1の2種類の増殖因子を組み合わせることによって, 幹細胞のマーカーと考えられているc-Kitを発現している細胞がAQP5を発現している細胞の割合を上回っていた。また, NRG1のみの添加で唾液分泌細胞の分化マーカーであるAQP5を発現している細胞の増加傾向が観察された。これらの結果から, 培地に添加する増殖因子の組み合わせを変えることで培養細胞の性質が変化し, 唾液腺細胞を継代培養し, 必要時に唾液分泌細胞に分化誘導させることのできる唾液腺体外培養系を構築できる可能性が示唆された。

#### <引用文献>

- ① Kera H, Yuki S, Nogawa H: FGF7 signals are relayed to autocrine EGF family growth factors to induce branching morphogenesis of mouse salivary epithelium. *Dev Dyn* 2014; 243: 552-559
- ② Steinberg Z, Myers C, Heim VM, Lathrop CA, Rebustini IT, Stewart JS, *et al.*: FGFR2b signaling regulates ex vivo submandibular gland epithelial cell proliferation and branching morphogenesis. *Development* 2005; 132: 1223-1234

#### 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2件)

- ① 早坂勇人、野川宏幸、関亦正幸、関亦明子、マウス胎児唾液腺上皮組織の体外培養における *neuregulin1* と *fibroblast growth factor1* の細胞分化への作用、山形大学紀要(医学)、査読有、34巻、2016、印刷中
- ② Kera H., Yuki S., Nogawa H., FGF7 signals are relayed to autocrine EGF family growth factors to induce branching morphogenesis of mouse salivary epithelium., *Dev. Dyn.*, 査読有, 243(4), 2014, 552-559

##### [学会発表] (計4件)

- ① 関亦明子, 早坂勇人, 野川宏幸, 関亦正幸, “唾液分泌低下に対するケア開発を目指したほ乳類唾液腺培養モデルの構築”, 第3回 看護理工学会学術集会, 2015年10月10-11日, 立命館大学朱雀キャンパス(京都府)

- ② 早坂勇人, 関亦明子, 野川宏幸, 関亦正幸, “マウス顎下腺上皮組織の体外培養における増殖因子の効果”, 第67回 日本細胞生物学会, 2015年6月30日-7月2日, タワーホール船堀(東京都)
- ③ 関亦明子, 関亦正幸, 佐藤菜津美, 早坂勇人, 中野明彦, “Rad53結合タンパク質、Mdt1pの欠損がタンパク質輸送変異 *sec12-4* を抑圧するメカニズムについて”, 第67回 日本細胞生物学会, 2015年6月30日-7月2日, タワーホール船堀(東京都)
- ④ 関亦明子, 早坂勇人, 野川宏幸, 関亦正幸, “ほ乳類唾液腺の培養分泌モデル構築へ向けた増殖因子の効果について”, 第88回 日本組織培養学会大会, 2015年5月26日-5月27日, 広島大学霞キャンパス内応神会館(広島市)

##### [その他]

ホームページ

<http://n-yu.jp/kansenbougyo/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

関亦明子 (SEKIMATA, Akiko)  
山形大学・医学部看護学科・准教授  
研究者番号: 50321823

##### (2) 研究分担者

野川 宏幸 (NOGAWA, Hiroyuki)  
千葉大学・理学研究科・准教授  
研究者番号: 40143250

関亦正幸 (NOGAWA, Hiroyuki)  
福島県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 80250190