

機関番号：32710

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592162

研究課題名（和文） 唾液腺 side population 細胞における幹細胞活性の検討

研究課題名（英文） Evaluation of stemness on salivary gland side population cells

研究代表者

美島 健二（MISHIMA KENJI）

鶴見大学・歯学部・准教授

研究者番号：50275343

研究成果の概要（和文）：

マウスの唾液腺組織における SP 細胞が、唾液腺組織を再構築する能力を有する幹細胞である可能性を検討した結果、これらの細胞には、幹細胞の特徴的な性格（細胞周期の静止期に位置する性格や腺組織の再構築能を保持するなど）が認められない事が明らかとなった。また、その表面マーカーを詳細に解析した結果、当初、上皮系細胞と考えられていた唾液腺由来の SP 細胞の殆どは、間葉系由来の細胞集団であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

We examined whether SP cells isolated from mouse salivary glands possess stem cell activity or not. Consequently, it was clarified that SP cells had no characteristics of stem cell, such as quiescence and potential of reconstituting glands. In addition, by analysis of their surface marker antigens, SP cells derived from salivary glands, which we had expected as a salivary epithelial cell lineage, were determined to be a mesenchymal cell lineage.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯学

キーワード：SP 細胞、幹細胞活性、唾液腺

1. 研究開始当初の背景

幹細胞研究分野はES細胞および組織幹細胞研究から端を発し、最近になりマウス線維芽細胞に複数の特異的遺伝子を導入することにより多能性の獲得がみられたという画期的な報告がなされ、極めて急速な展開を示している(Takahashi, K et al., Cell 126:663-676)。また、その研究は幹細胞の機能不全が老化と密接に関連しているという報告が相次いでなされたことにより、老化のメカニズム解明へと広がりを見せている(Nijnic, A et al., Nature 447:686-690, 2007)。口腔領域においても加齢に伴う唾液分泌障害は多数報告があり、唾液腺組織の萎縮を伴うことより幹細胞の機能不全に起因する可能性が想定されている。加えて、重篤な唾液腺分泌障害の原因として知られている難治性の自己免疫疾患であるシェーグレン症候群や頭頸部悪性腫瘍の放射線治療後の患者唾液腺組織においても、長期観察により唾液腺組織の萎縮が認められ、何らかの原因により幹細胞の機能が障害されている可能性が考えられる。しかしながら、これまで唾液分泌障害の原因の一つとして幹細胞の機能不全に着目した研究は国内・国外において皆無であり、本研究では、この点について明らかにする予定である。これまで研究代表者らは唾液腺組織を中心に組織障害のメカニズムを解明すると共に、その治療法の開発に従事してきた(Nature 441:885-889, 2006, Mol. Cell. Biol. 26:2924-2935, 2006, J. Immunol., 169:1050-7, 2002)。すなわち、重篤な唾液分泌障害に対する新規治療法として細胞治療の応用を検討し、放射線照射により唾液分泌障害を誘導したマウスの唾液腺局所に幹細胞を多数含む分画としてside population (SP) 細胞を移入することにより(SP細胞はHoechst33342染色で陰性の細胞群として認められる(図2))、その分泌障害が改善することを報告してきた(図3)。しかしながら、その一方で、移入したSP細胞による腺組織の再構築は認められないことが明らかとなった。このことから、唾液腺のSP細胞にはstem cellの特徴の一つである腺組織再構築能が認められず、唾液腺のSP細胞が本当にstem cellが濃縮された分画であるかどうかを詳細に検証する必要があると思われる。

2. 研究の目的

本研究では、唾液腺のSP細胞がstem cellの濃縮された分画であるかどうかを明らかにすることにある。

3. 研究の方法

(1) SP細胞分画におけるBrdU長期保持細胞(LRCs)の割合を測定

幹細胞は長期にわたり分裂しない静止期の細胞であると考えられておりbromodeoxyuridine (BrdU) を応用することにより同定が可能で、その長期保持細胞(LRCs)が幹細胞であると考えられている。すでに皮膚、角膜、毛包では同じ方法を用いて幹細胞が同定された経緯があり本研究においても応用可能と考えられる。本研究ではSP細胞におけるBrdU陽性細胞の割合を解析する。具体的な方法を下記に記す。

生後3日齢のC57BL/6マウスの皮下に3日間連続で1日2回50 μ g/gのBrdU投与を行う。

BrdU投与10週後のマウスから顎下腺組織を採取し、採取した組織からSP細胞を単離する。すなわち、コラゲナーゼおよびヒアルロニダーゼにより細胞を分散化し、分散化した細胞をトリパンブルーで

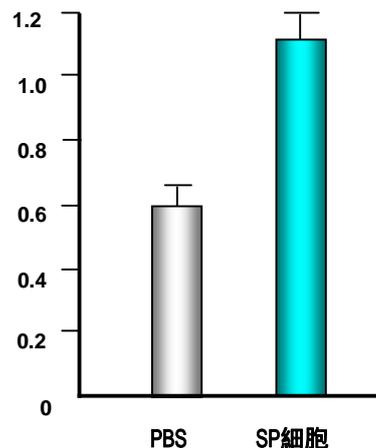


図3 移入後8週の唾液量

染色後、生存率が90%以上であることを確認する。これらの細胞懸濁液を1 \times 10⁶ cells/mlにHBSSで調整した後5 μ g/mlのHoechst33342で37、90分間処理する。

Hoechst33342で処理した細胞をさらに、2 μ g/mlのpropidium iodide (PI)にて染色後FACS Vantage (自動細胞分離装置: フローサイトメトリー)によりHoechst33342(-)のSP細胞と対照としてHoechst33342(+)のnon-SP細胞(MP細胞)をそれぞれ分取する。

分取した細胞のサイトスピン標本作製しメタノール固定後、塩酸処理により染色体DNAを変性した後、抗BrdU抗体によりBrdU陽性細胞を検出し、その割合を

算出する。

(2)マウス唾液腺組織における SP 細胞の局在解析

マウス唾液腺におけるSP細胞の局在を明らかにする目的で、そのマーカー因子として知られるBCRP1の局在を検討した。方法としては、6週齢の雄性マウス唾液腺組織を摘出後OCTコンパウンドに包埋し液体窒素で凍結した。凍結した標本をクリオスタットで4μmの厚さに薄切し、-20℃で10分間メタノールにより固定した。さらに、3%BSAにより室温、30分間、ブロッキング処理を行った後、ラット抗BCRP/ABCG2 (abcam, 1:20 dilution) 抗体にて4℃、一晩反応させた。次に、FITC標識抗ラット抗体にて室温、一時間反応後、蛍光顕微鏡 (KEYENCE, BZ-8100) により観察した。

(3)SP 細胞 における mesenchymal stem/stromal cell (MSC) マーカー遺伝子発現の検討

マウス唾液腺SP細胞が、マウスの肺組織同様、MSC様細胞である可能性を検討する目的で、マウス唾液腺SP細胞におけるヒトMSC特異的な表面マーカーとして知られる、CD73、CD90およびCD105の発現と、マウスMSC特異的な表面マーカーとして知られるSca1/PDGFR の発現をそれぞれ解析した。すなわち、6週齢の雄性マウスの唾液腺より分取したSP細胞をPE標識抗CD73抗体 (1:200 dilution)、FITC標識抗CD90抗体 (1:200 dilution)、およびBiotin標識抗CD105抗体 (1:200 dilution) あるいはFITC標識抗Sca1抗体 (1:200) およびBiotin標識抗PDGFR 抗体にて氷上30分間反応させた。さらに、APC標識ストレプトアビジンにて氷上30分反応させた後 Flow cytometry (Dako-Cytomation, MoFlo) により解析した。

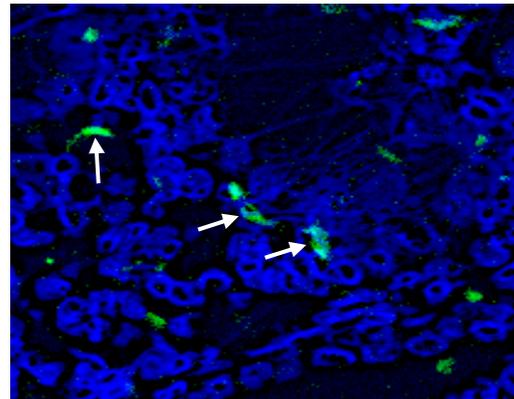
(4)唾液腺の治療実験に応用可能な、当該腺組織特異的な損傷モデルの確立

SP細胞の腺組織再構築能をより客観的に評価する目的で、parotid secretory protein (Lama) のプロモーターの存在下で herpes simplex virus の thymidine kinase (HSV-tk) を発現するトランスジェニックマウスを作出する。まず、Lama プロモーターの特異性を検証する目的で、慶應大学との共同研究により作出した、Lamaプロモーター下流でCre recombinase を発現する Knock-in マウスと Cre recombinase の存在下でLacZを発現する CAG-CAT-lacZマウス (大阪大学 宮崎純一博士より御供与) を交配し、LacZ染色により、その特異性を検討する。次に、HSV-tk発現ベクター (pCM-TK、札幌医大 濱田洋文博士より御供与) から、5 prime にSalIの制限酵素配列を付加したプライ

マーを用いて、HSV-tk配列全長を増幅する。さらに、Lama プロモーター下流のSalI 部位に増幅したHSV-tk配列を挿入する。作製した配列を制限酵素により直鎖化した後、前核期受精卵に注入し、偽妊娠マウスに移植する。出産した仔マウスの尾より抽出したDNAよりPCRを用いてTGマウスをscreeningする。

4 . 研究成果

(1)マウス唾液腺組織から分取された SP 細胞および non-SP 細胞各分画における、LRC の割合はそれぞれ約 5%、約 3%と殆ど差が認められなかった。この結果と、以前の検討より明らかとなった SP 細胞に腺組織の再構築能が認められないことから、本分画が組織幹細胞の濃縮された分画である可能性は低いと考えられた。また、Bcrp1 陽性細胞の大半は間質組織に存在することが明らかとなり、その中には導管周囲の血管腔を構成する内皮細胞が含まれていた (下図) 。



次に、唾液腺 SP 細胞における MSC 表面マーカーの発現を検討した結果では CD73 陰性 (< 5%)、CD90 一部陽性 (< 50%)、CD105 陽性 (> 80%) を示し、また、Sca1/PDGFR double positive の細胞は殆ど認められなかった。これらの所見より、当初、上皮系細胞と考えられていた唾液腺由来の SP 細胞の殆どは、CD105 陽性の間葉系由来の細胞集団であることが明らかとなった。

(2)Thymidine kinase を応用した唾液腺組織特異的な損傷モデルマウスの確立では、Lama プロモーター下流でCre recombinase を発現する Knock-in マウスと CAG-CAT-lacZ マウスの交配により作出されたマウスの唾液腺における LacZ 陽性細胞が、唾液腺組織に特異的に発現することが確認され、Lama プロモーターの特異性が検証された (図 1) 。

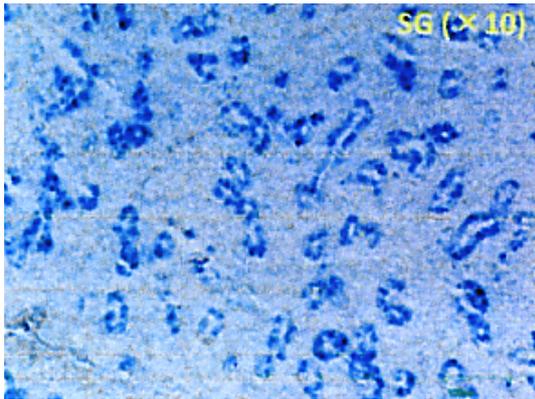


図1 マウス顎下腺のX-gal 染色

また、Lama プロモーター下流の SalI 部位に HSV-tK 配列を挿入した遺伝子発現ベクターの construct が完成したので、現在トランスジェニックマウスの作出を進めている。

今後は、唾液腺 SP 細胞の生体内における役割を明らかにしていく予定である。

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)

Okada N, Kawakita T, Mishima K, Saito I, Miyashita H, Yoshida S, Shimmura S, Tsubota K. Clusterin promotes corneal epithelial cell growth through upregulation of hepatocyte growth factor by mesenchymal cells in vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci. 査読あり, in press

〔学会発表〕(計2件)

美島健二, 井上裕子, 住本秀敏, 河上裕, 坪田一男, 齋藤一郎: Side population 細胞が発現するクラステリンの腺分泌機能回復の検討 (第9回日本再生医療学会総会, 広島, 2010年3月18日)

美島健二, 井上裕子, 坪田一男, 齋藤一郎: クラステリン蛋白における酸化ストレス障害抑制機能の検討 (第9回日本抗加齢医学会総会, 東京, 2009年5月28日)

〔その他〕

ホームページ等

<http://ccs.tsurumi-u.ac.jp/dental/kouza/byouri/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

美島 健二 (MISHIMA KENJI)
鶴見大学・歯学部・准教授
研究者番号: 50275343

(2) 研究分担者

齋藤 一郎 (SAITO ICHIRO)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号: 60147634
井上 裕子 (INOUE HIROKO)
鶴見大学・歯学部・講師
研究者番号: 50367306
山田 浩之 (YAMADA HIROYUKI)
鶴見大学・歯学部・講師
研究者番号: 90267542

(3) 連携研究者

なし