

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 4月 27日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390381

研究課題名（和文）唾液腺組織幹細胞の分離・培養・保存法の確立と細胞移植による組織再生

研究課題名（英文）Establishment of salivary gland stem cell isolation, culture, and storage for the regeneration of salivary gland

研究代表者

各務 秀明（Kagami Hideaki）

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：80242866

研究成果の概要（和文）：本研究の最終的な目標は、細胞移植による唾液腺機能障害の新たな治療法の開発である。初めに、マウス唾液腺への放射線照射により、唾液腺萎縮モデルを作成した。単核球細胞は、唾液量の回復に作用することが示された。次に、細胞移植による唾液腺機能回復のメカニズムを明らかにするために、*in vitro* における唾液腺萎縮モデルを作製した。本モデルから、骨髄単核球の培養上清中に含まれる液性の因子が直接腺房細胞へ働きかけ、機能回復に作用するメカニズムが推測された。

研究成果の概要（英文）：The final goal of this study is to develop a novel treatment for salivary gland dysfunction by cell transplantation. First, we established a mouse salivary gland atrophy model by irradiation. The administration of MNCs significantly increased saliva secretion as similar to the experiments with cultured salivary epithelial cells or mesenchymal stem cells. To understand the mechanism of salivary gland recovery by cell transplantation, *in vitro* salivary gland atrophy model was established. The results from this study have shown that the transplanted cells may affect the function of salivary gland acinar cells via factors secreted from MNCs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2011年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2012年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔外科学一般、唾液腺

1. 研究開始当初の背景

成人幹細胞移植は、白血病や多発性骨髄腫患者への造血幹細胞移植などにおいて既に確立された医療である。近年、造血幹細胞以外のさまざまな臓器においても、幹細胞移植の可能性が検討されている。たとえば、糖尿病患者に対する膵

島移植では、高い成功率が報告されている。しかしながら（幹）細胞移植治療における大きな問題はドナー不足であり、他家移植の場合には免疫拒絶も問題となる。もし、自己組織由来の培養細胞を治療に用いることができれば、このような制約を受けることなく治療ができる

ものと期待される。唾液腺は、3つの大唾液腺と数百の小唾液腺からなる特徴的な口腔-顔面領域の臓器である。それゆえ、比較的低侵襲な手技で、自家移植を予定する患者に対しても細胞の採取が可能である。もし、唾液腺の幹細胞/前駆細胞の分離、増殖と放射線治療終了時までの保存が可能となれば、萎縮唾液腺の治療も可能になるものと考えられる。

現在、唾液腺の生理的な再生の正確なメカニズムは明らかではない。唾液腺組織は、主として腺房と導管の2つの構造からなる。唾液腺実質には、腺房、介在部導管、線条部導管、筋上皮細胞、そして基底細胞の5種類の細胞が存在する。それぞれの細胞は、局在が異なるのみでなく、固有の機能を持ち、特異的なマーカーを発現する。これまでの報告では、幹/前駆細胞は主に介在部導管に存在することが示唆されており、そこから介在部導管、および反対の腺房の方向へ移動すると考えられている。Ihrlerらは、正常な基底細胞(介在部導管中)は腺房細胞と比較して1.6倍の増殖能を持つことを報告した。多くの導管細胞は円柱状であるにもかかわらず、わずかな細胞が基底側に位置している。これらの基底細胞は水平方向、あるいは管腔側に移動し、分化する。傷害などのストレスを受けた際には、腺房細胞は消失し導管上皮が盛んに分裂する。

最近の研究では、唾液腺中に存在する幹細胞を分離する方法として導管結紮などのストレスを利用することが報告されており、この方法により得られた細胞から、肝や脾様の細胞が得られることが報告されている。この細胞分画は、Sca-1やc-kitなどの幹細胞マーカー陽性である。同様の細胞分画は、成体のマウスからも報告されているが、その分化能は限定的である。近年、マウスの唾液腺中にスフィアを形成するc-kit陽性の細胞の存在が報告されており、この細胞は唾液腺組織へと分化可能なばかりでなく、移植することで、放射線照射による唾液腺機能の低下を回復させることが可能であった。しかしながら、in vitroにおける増殖能は限定的であり(3日間程度)、分化させない状態で継代することは現時点では困難である。通常の放射線治療では少なくとも8週程度の照射期間が必要であることを考慮すると、現時点での臨床応用は困難と考えられる。申請者らは、培養唾液腺上皮細胞を再生唾液腺中に移植し、この移植細胞が腺組織中に生着することを示した(Sugito et al.,

Cell Transplantation, 2004)。一方、研究協力者のグループでは、唾液腺中のインテグリン $\alpha 6$ (CD49f) $\beta 1$ (CD29) 陽性細胞 (SGIE 細胞) が動物の正常唾液腺から分離可能であり、マグネットを用いたソーティング (MACSTM) により、高純度の幹細胞/前駆細胞分画を分離する技術を確認した。これらの細胞はクローンとして増殖させることや、凍結保存することが可能であった。したがって、放射線治療の期間、保存することができる。マウスおよびラットを用いた放射線性の唾液腺障害モデルにおいて、SGIE細胞や体性幹細胞移植による唾液分泌の回復が示された。

本研究の長期的および最終的な目標は、放射線治療による唾液腺機能障害と口腔乾燥症状に苦しむ患者に対して、培養唾液腺幹細胞の自家移植による新たな治療法を確認することである。

2. 研究の目的

長期目標：放射線性唾液腺機能障害に対する自家幹細胞移植による治療法の実立。

本研究の目標：唾液腺幹/前駆細胞の分離、培養、機能評価法を確認することである。また、この培養法を用いて、唾液腺に対する細胞移植の効果とそのメカニズムを検証する。

目的：

- (1) 唾液腺中の幹細胞/前駆細胞を安定して分離し、増殖可能な分離、培養技術を確認する。
- (2) in vivo 放射線照射モデルにおいて、幹細胞移植による機能回復効果を確認する。特に培養を介しない単核球分画 (MNCs) による治療効果を検討する。
- (3) 細胞移植による唾液腺機能回復のメカニズムを詳細に検討するため、in vitro における唾液腺萎縮モデルを作製し、MNCs との共培養が与える影響について検討を行う。

3. 研究の方法

(1) In vitro におけるマウス唾液腺由来幹細胞およびその分画に対する2次元および3次元形態、機能解析とより再生能の高い幹細胞分画の純化
唾液腺由来幹(前駆)細胞が、これまで確立した無血清培養下で機能を失うことなく必要な細胞数まで増殖可能かどうかを検討した。これまでのマウスを用いたわれわれの研究から、唾液腺上皮幹細胞/前駆細胞を含む分画は、3次元培養

により唾液腺幹/前駆細胞は発生過程に見られるような腺房形成能を示すことが示されている。さらに、無血清下で比較的長期間維持することにより、ドーム構造（イオン等の交換が可能な導管様構造と考えられている）と、結節状の腺房様構造を形成し、腺房マーカである AQP 5 やアミラーゼの発現、および AQP 5 に対する免疫蛍光法にて確認されている。本研究では、増殖の限界について検討するとともに、安定して増殖が可能な培養条件について最適化を行った。

唾液腺上皮細胞: C57BL/6 マウスをペントバルビタール過剰投与で屠殺し、顎下腺を摘出し細切後コラゲナーゼ処理にて細胞を単離した。DMEM-F12(1:1)を基礎培地として、1% Penicillin-Streptomycin, 1% Fungizone, B27 supplement, 10ng/ml EGF, 20ng/ml bFGF を含む培地で培養を行った。さらに、安定した培養と増殖を得るためにマトリゲルによるコーティングが細胞増殖と分化に与える影響について検討を行った。

(2) MNCs による in vivo 放射線唾液腺萎縮モデルにおける機能回復

MNCs: C57BL/6 マウスの大腿骨および脛骨から骨髓細胞をフラッシュアウトで採取し、Lymphoprep を用いた比重遠心法で単核球分画(MNC)を分離した。放射線照射による唾液腺萎縮マウスへ MNCs を注入し、安静時全唾液量および唾液腺重量の変化を検討した。

(3) In vitro X線照射モデルの作製と共培養実験

plate に播種した唾液腺細胞(P1)に対して 10Gy, 20Gy, 40Gy, 60Gy の X線照射を行い、細胞増殖および唾液腺マーカの発現解析を行った。(X線照射装置: MBR-1520R-3(HITACHI))

唾液腺細胞を 24well plate 上に、MNC をインサート(ポアサイズ 0.4 μm)上に播種し、唾液腺細胞用の培地で indirect co-culture を行った。

4. 研究成果

(1) マトリゲルコーティングを施す事により、初代培養での細胞接着、増殖能が増し、継代までの培養日数が短縮された。また、継代後も同様に、継続的な培養が可能となった。また、マトリゲルコーティングディッシュを使い、無血清培地で培養した場合の唾液腺細胞のマーカ発現を免疫蛍光法で確認した。腺房細胞のマーカである AQP-5 (green)。導管細胞マーカである Collagen

type II (green)。筋上皮細胞マーカである α-SMA (green) の発現が認められた。(2) マウス唾液腺への放射線照射により、唾液腺萎縮モデルを作成した。細胞治療の臨床応用には、細胞の培養が大きなハードルとなる。今回細胞培養を行うことなく使用可能な骨髓単核球細胞に着目した。骨髓単核球細胞を密度勾配遠心法にて分取し、萎縮唾液腺への細胞移植を行った。単核球細胞は、これまで報告されている培養唾液腺上皮細胞、および骨髓間葉系幹細胞同様に唾液量の回復に作用することが示された。

(3) 次に、細胞移植による唾液腺機能回復のメカニズムを明らかにするために、in vitro における唾液腺萎縮モデルを作製した。平面培養された唾液腺上皮細胞に対して、20-60Gy の照射を行った。それぞれにおいて細胞増殖は抑制されたが、60Gy では細胞増殖が完全に停止した。また、60Gy 照射後に腺房マーカとして AQP-5、導管マーカとして Zo-1 の遺伝子発現を検討した。20Gy 以上の照射にて有意に遺伝子発現は減少したが、特に Zo-1 と比較して、AQP-5 の遺伝子発現の減少が著明であった。さらに、セルカルチャーインサートを用いてこの培養唾液腺上皮細胞と骨髓単核球分画とを共培養し、それぞれの細胞が生存可能であることが明らかとなった。以上から、in vitro における萎縮唾液腺モデルとして本モデルが使用可能と考えられた。この系を用いて骨髓単核球分画と非接触で共培養することで、腺房マーカの回復が認められた。しかしながら、細胞の増殖能の回復は認められなかった。以上から、骨髓単核球の培養上清中に含まれる液性の因子が直接腺房細胞へ働きかけ、機能回復に作用するメカニズムの存在が明らかとなった。

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 16 件)

- (1) Matsuoka F, Takeuchi I, Agata H, Kagami H, Shiono H, Kiyota Y, Honda H, Kato R. Morphology-based prediction of osteogenic differentiation potential of human mesenchymal stem cells. Plos One (査読有) in press. doi: 10.1371/journal.pone.0055082.
- (2) Agata H, Yamazaki M, Uehara M, Hori A, Sumita Y, Tojo A, Kagami H. Characteristic differences among osteogenic cell populations of rat bone

- marrow stromal cells isolated from untreated, hemolyzed or Ficoll-treated marrow. *Cytherapy*. (査読有) 2012;14:791-801. doi: 10.3109/14653249.2012.674639
- (3) Inoue M, Ebisawa K, Itaya T, Sugito T, Yamawaki-Ogata A, Sumita Y, Wadagaki R, Narita Y, Agata H, Kagami H, Ueda M. Effect of GDF-5 and BMP-2 on the expression of tendo/ligamentogenesis-related markers in human PDL-derived cells. *Oral Dis* (査読有) 2012;18:206-212 doi: 10.1111/j.1601-0825.2011.01871.x.
- (4) Ebisawa K, Kato R, Sugimura T, Latif MA, Hori Y, Narita Y, Ueda M, Honda H, Kagami H. Gingival and dermal fibroblasts: their similarities and differences revealed from gene expression analyses. *J Biosci Bioeng* (査読有) 111:255-258, 2011 doi: 10.1016/j.jbiosc.2010.11.014..
- (5) Kato R, Iejima D, Agata H, Asahina I, Okada K, Ueda M, Honda H, Kagami H*. A compact, automated cell culture system for clinical scale cell expansion from primary tissues. *Tissue Eng Part C Methods* (査読有) 16:947-956, 2010 doi: 10.1089/ten.TEC.2009.0305..
- (6) Tonomura A, Mizuno D, Hisada A, Kuno N, Ando Y, Sumita Y, Honda MJ, Satomura K, Sakurai H, Ueda M, Kagami H*. Differential effect of scaffold shape on dentin regeneration. *Annals Biomed Eng* (査読有) 38:1664-1671, 2010 doi: 10.1007/s10439-010-9910-z..
- (7) Mizuno H, Kagami H*, Mase J, Mizuno D, Ueda M. Efficacy of membranous cultured periosteum for the treatment of patients with severe periodontitis: A proof-of-concept study. *Nagoya J Med Sci* (査読有) 72:59-70, 2010 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20229704>.
- (8) Suzuki S, Narita Y, Yamawaki A, Murase Y, Satake M, Mutsuga M, Okamoto H, Kagami H, Ueda M, Ueda Y. Effects of extracellular matrix on differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells into smooth muscle cell lineage: Utility for cardiovascular tissue engineering. *Cells Tissues Organs* (査読有) 191:269-280, 2010 doi: 10.1159/000260061..
- (9) Ohara T, Itaya T, Usami K, Ando Y, Sakurai H, Honda MJ, Ueda M, Kagami H*. Evaluation of scaffold materials for tooth tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* (査読有) 94:800-805, 2010 doi: 10.1002/jbm.a.32749..
- (10) Sumita Y, Honda MJ, Ueda M, Asahina I, Kagami H*. Differential effects of growth differentiation factor-5 on porcine dental papilla- and follicle-derived cells. *Growth Factors* (査読有) 28:56-65, 2010 doi: 10.3109/08977190903373380..
- (11) Agata H, Asahina I, Watanabe N, Ishii Y, Kubo N, Ohshima S, Yamazaki M, Tojo A, Kagami H*. Characteristic change and loss of in vivo osteogenic abilities of human bone marrow stromal cells during passage. *Tissue Engineering Part A* (査読有) 16:663-673, 2010 doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0500..
- (12) Mizuno M, Agata H, Furue H, Kimura A, Narita Y, Watanabe N, Ishii Y, Ueda M, Tojo A, Kagami H*. Limited but heterogeneous osteogenic response of human bone marrow mesenchymal stem cells to bone morphogenetic protein-2 and serum. *Growth Factors* (査読有) 28:34-43, 2010 doi: 10.3109/08977190903326362..
- (13) Okamoto H, Hata K-I, Kagami H*, Okada K, Ito Y, Narita Y, Hirata H, Sekiya I, Otsuka T, Ueda M. Recovery process of sciatic nerve defect with novel bioabsorbable collagen tubes packed with collagen filaments in dogs. *J Biomed Mater Res A* (査読有) 92:859-868, 2010 doi: 10.1002/jbm.a.32421..
- (14) Agata A, Sumita Y, Asahina I, Tojo A, Kagami H. Ischemic culture of dental pulp-derived cells is a useful model in which to investigate mechanisms of post-ischemic tissue recovery. *Histol Histopathol* (査読有) in press <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23629696>.
- (15) Kagami H., Agata H, Tojo A. Bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for alveolar bone tissue engineering: basic science to clinical translation. *Int J. Biochem. Cell Biol.* (査読有) 43:286-289, 2011 doi: 10.1016/j.biocel.2010.12.006..
- (16) Kagami H*, Agata H. The potential of somatic stem cells for alveolar bone tissue engineering. *Int. J. Oral-Medical Sci.* (査読有) 9:1-10, 2010 <https://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=delijoms&vo=9&nu=1>.
- (17) Tran SD, Sumita Y, Khalili S. Bone marrow-derived cells: A potential approach

for the treatment of xerostomia. *Int J Biochem Cell Biol.* (査読有) 2011 Jan;43(1):5-9. doi:

10.1016/j.biocel.2010.10.010.

(18) Tran SD, Redman RS, Barrett AJ, Pavletic SZ, Key S, Liu Y, Carpenter A, Nguyen HM, Sumita Y, Baum BJ, Pillemer SR, Mezey E. Microchimerism in salivary glands after blood- and marrow-derived stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* (査読有) 2011 Mar;17(3):429-33. doi:

10.1016/j.bbmt.2010.09.021..

(19) Sumita Y, Liu Y, Khalili S, Maria OM, Xia D, Key S, Cotrim AP, Mezey E, Tran SD. Bone marrow-derived cells rescue salivary gland function in mice with head and neck irradiation. *Int J Biochem Cell Biol.* (査読有) 2011 Jan;43(1):80-7. doi:

10.1016/j.biocel.2010.09.023.

(20) Khalili S, Liu Y, Sumita Y, Maria OM, Blank D, Key S, Mezey E, Tran SD. Bone marrow cells are a source of undifferentiated cells to prevent Sjögren's syndrome and to preserve salivary glands function in the non-obese diabetic mice. *Int J Biochem Cell Biol.* (査読有) 2010 Nov;42(11):1893-9. doi:

10.1016/j.biocel.2010.08.008.

[学会発表] (計 13 件)

(1) Kagami H. Bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for alveolar bone tissue engineering: basic science to clinical translation. Thursday, February 28, 2013 Potential Applications of Mesenchymal Multipotent Stromal Cells. The 16th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference, NIDCR, NIH

(2) Kagami H. Bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for alveolar bone tissue engineering: basic science to clinical translation. The Second Chinese National Conference on Oral Maxillofacial Development and Regeneration July 28-31, 2011 in Wuyishan city, Fujian Province, China.

(3) 各務秀明、縣秀樹、住田吉慶、朝比奈泉 歯槽骨・唾液腺の再生研究今後の展開第 12 回日本再生医療学会総会 シンポジウム 5「歯科における再生医療の将来 2013.3.19-21 横浜

(4) 各務秀明 「骨再生医療の現状と展望について」第 57 回日本口腔外科学会総会・学術大会 シンポジウム I 歯・歯周組織・骨

の再生医療 2012.10.19-21 横浜

(5) 各務秀明 「自己骨髄由来培養骨芽細胞様細胞による歯槽骨」再生スーパー特区:「医工連携による先進医療機器の実用化プロジェクト」第三回シンポジウム、*文部科学省橋渡し研究支援推進プログラム:「先端医療の開発支援拠点形成と実践」第五回シンポジウム、2012年2月28日、東京大学医学部附属病院

(6) 各務秀明 「再生医療における品質管理の課題:歯槽骨再生治療について」日本臨床試験研究会第3回学術集会総会 分科会:再生医療 「再生医療と規制」2012 年年 2 月 24 日 (金) 福岡国際会議場 第1会場 501室

(7) 各務秀明 「骨髄細胞を用いた骨再生とインプラント治療」バイオインテグレーション学会第2回学術大会・総会 東京医科歯科大学 2012.1.29

(8) 各務秀明 「歯からはじまるアンチエイジングインプラントと骨の再生医療」第 12 回 市民公開医療懇談会、2011.7.28、東京大学医科学研究所附属病院

(9) 各務秀明 「実用化を目指した新たな歯槽骨再生臨床研究の開始について」第 10 回松本ボーンフォーラム、2011年5月28日、松本歯科大学 30 周年記念棟

(10) 各務秀明:自己骨髄由来培養骨芽細胞様細胞による歯槽骨再生 スーパー特区:「医工連携による先進医療機器の実用化プロジェクト」第三回シンポジウム 文部科学省橋渡し研究支援推進プログラム:「先端医療の開発支援拠点形成と実践」第五回シンポジウム 2011 年 2 月 28 日、東京大学医学部附属病院

(11) 各務秀明 「ヒト幹細胞指針に基づいた臨床研究とネットワーク構築によるトランスレーショナルリサーチの展開」日本再生歯科医学会 シンポジウム 自己骨髄間質細胞を用いた歯槽骨再生治療:鶴見大学会館メインホール 2010.12.11

(12) 堀暁子、縣秀樹、上嶋 伸知、東條有伸、各務秀明 In vitro 唾液腺萎縮モデルによる唾液腺再生メカニズムの検討 2013 年 03 月 21 日第 12 回日本再生医療学会総会横浜

(13) 堀暁子、縣秀樹、山崎 美香 1、上嶋 伸知、東條有伸、各務秀明 放射線性唾液腺萎縮の in vitro モデルによる検討第 11 回日本再生医療学会総会 2012 年 6 月 12 日 横浜

[図書] (計 3 件)

(1) Kagami H, Agata H, Sumita Y, Tojo A. Heterogeneous responses of human bone marrow stromal cells (multipotent mesenchyme stromal cells) to osteogenic induction. Ed. Hayat MA, Stem Cells and Cancer Stem Cells: Therapeutic

Applications in Disease and Injury, Volume 2, Springer 2011.

(2) Kagami H, Agata H, Kato R, Matsuoka F, Tojo A. Fundamental technological developments required for increased availability of tissue engineering. Ed. Regenerative Medicine and Tissue Engineering: From Cells to Organs. Intech 2011

3. Kagami H, Agata H, Satake M, Narita Y. Considerations on designing scaffold for soft and hard tissue engineering. Ed. Gilson Khang. The Handbook of Intelligent Scaffold for Regenerative Medicine Pan Stanford Publishing 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

各務 秀明 (KAGAMI HIDEAKI)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：80242866

(2) 研究分担者

住田 吉慶 (SUMITA YOSHINORI)

長崎大学・医歯薬総合研究科・准教授

研究者番号：50456654

李 憲起 (LI KENKI)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師

研究者番号：60350831

(3) 連携研究者

()

研究者番号：