

令和 元年 9 月 9 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11025

研究課題名(和文) bFGFと脂肪細胞培養法による上皮組織再生機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of epithelial tissue regeneration mechanism by bFGF(basic Fibroblast Growth Factor) and adipocyte culture method

研究代表者

菊池 憲一郎 (Kikuchi, Kenichiro)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：80267260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：生後10週令のマウスを用いた唾液腺損傷モデルマウスを作製し、損傷部位に生体吸収性ハイドロゲルに含浸した線維芽細胞増殖因子であるbFGF (basic Fibroblast growth factor)を挿入し、唾液腺組織の再生過程と損傷部位に挿入する培養細胞について検討した。その結果、bFGF投与により損傷部位の組織再生が無投与群と比べて、早期にコラーゲン線維の増生を持って始まり、このコラーゲン線維が将来の小葉間結合組織を形成し、その間に腺細胞が再生していく過程が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

事故などの顎顔面領域の損傷により、口腔内の唾液腺や舌などの諸器官の損傷が生じると、その後の生活に大きな支障を及ぼす重大な問題となることは周知の事実である。最近、摂食・嚥下の視点から、口腔から栄養を取ることの重要性が再認識され、可能な限りのリハビリが行なわれているが、失われた局所の組織と機能の回復を目的とした組織再生医療は今後の課題となっている。

研究成果の概要(英文)：In this study, we histochemically and immunohistochemically investigated the effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) in the recovery process by creating a mouse model of trauma-related parenchymal injury in the submandibular gland. Our findings suggested that early administration of bFGF to a submandibular gland with a trauma- or surgery-related parenchymal injury regenerates acinar cells, promotes cell differentiation, and improves the recovery of gland.

研究分野：解剖、組織・発生学

キーワード：bFGF 唾液腺 唾液腺損傷モデルマウス コラーゲン線維 再生

1. 研究開始当初の背景

(1) 加齢に伴う唾液分泌量の減少要因を探るため、粘液性の唾液を産生する粘液細胞の動態に着目し、ラット舌下腺の胎生後期に生産される漿液顆粒が、発育とともに粘液顆粒を生産するようになることや、若年期と老齢期の漿液性半月にみられる漿液顆粒は、加齢とともに蛋白質の性状に変化が生じること、さらに老齢期腺房細胞の基底膜および小葉間結合組織の血管壁や導管周囲および腺房細胞間の結合組織に老齢化の指標の1つであるアミロイド蛋白が出現する所見を得た。その結果、舌下腺や顎下腺の分泌細胞はアポトーシスによる細胞死が少なく、比較的ストレスに強く、腺房細胞の細胞死が直接的に唾液分泌量の減少をもたらすものではないことを明らかにしてきている。その問いに答えるべく、何故に、唾液分泌量の減少や唾液の粘稠度が高くなるかという新たな疑問を解明するために、腺房細胞や導管部の細胞が産生する蛋白質と細胞接装置の1つ Tight Junction(Tj:タイトジャンクション)に発現する蛋白質と微細構造に注目し、舌下腺や顎下腺における粘液細胞、漿液細胞、顆粒性ないし介在部導管に特異的に反応する蛋白質の局在について報告してきた。

(2) その後、唾液分泌量の減少の機序を解明する一方で、唾液腺組織再生により唾液分泌量を増加することは出来ないものかという新たな思いから、欠損組織修復や創傷治癒を促進する因子である塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)を萎縮した顎下腺組織に投与し、顎下腺の腺房細胞の再生過程の実験に着手している。その結果、唾液腺が再生していく過程で発生するリンパ管が小葉間結合組織に起源を發することを明らかにして報告している。このリンパ管の分布と走行の所見は、上皮組織がどのような過程を経て再生していくのかを示す有力な指標となっている。

2. 研究の目的

今回、今までの研究成果を活用し、唾液腺組織の実質欠損を生じたモデルマウスを作製し、bFGF単独投与と、bFGFおよび脂肪組織の共培養により得られた細胞を移植し、損傷を伴った上皮組織の再生過程を細胞生物学的な側面から検討し、臨床応用への研究基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 動物は、生後10週令のC57BL/6Njcl系マウス雄を使用する。顎下腺の右側を実験側、左側を対照側とする。脂肪組織は投与実験に先立って採取し、酵素処理を行い、組織培養を3~10日間行う。培養細胞の準備が完了した後、顎下腺相当部を直径3mmの生検パンチで、穿孔させて実質欠損部を構築する。

(2) 実質欠損部には、生体吸収性ハイドロゲルに含浸したbFGF単独投与と、bFGFおよび脂肪組織の共培養により得られた細胞を移植する。bFGF投与後、3,5,7,10,14,21日目に、組織の摘出を行う。取り出した組織片は固定用と生化学用とに2分割する。固定用の資料は、脱水、透徹、包埋を行い、パラフィン、エポキシ樹脂に包埋し、光顕、電顕の試料を作製する。切片はH-E染色や糖質検出のためのPAS(過ヨウ素酸-シッフ反応)染色、マッソントリクローム染色(MT)、AQP5の免疫染色を施し、組織化学的および免疫組織科学的手法を用い、光学顕微鏡および電子顕微鏡による検索を行う。生化学用はさらに細切し、コラゲナーゼ処理、トリプシン処理により上皮塊を分離、分散化する。

4. 研究成果

(1) H-E染色の所見

H-E染色の所見から対照側では、充填後28日目に欠損部辺縁に少数の腺房が認められたが、多くは導管様の構造物が存在し、小葉の形成には至らず、欠損部には膠原線維が密に分布していた。投与群では、充填後7日目から欠損部に導管様構造物が出現し、28日目には欠損部辺縁から中心

部にかけて多くの腺房が認められ、腺房周囲のコラーゲン線維を含む線維性結合組織の形成が進み、小葉の様相が観察された。

1.対照群

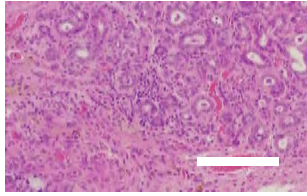


Fig.1. 28days

2.bFGF 投与群

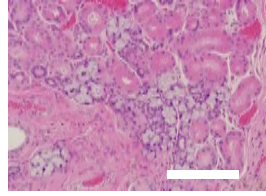


Fig.2. 28days (Bar=100 μ m)

(2) PAS 染色の所見

H-E 染色の所見から対照側では、充填後 28 日目に欠損部辺縁に少数の腺房が認められたが、多くは導管様の構造物が存在し、小葉の形成には至らず、欠損部には膠原線維が密に分布していた。投与群では、充填後 7 日目から欠損部に導管様構造物が出現し、28 日目には欠損部辺縁から中心部にかけて多くの腺房が認められ、腺房周囲のコラーゲン線維を含む線維性結合組織の形成が進み、小葉の様相が観察された。

1.対照群

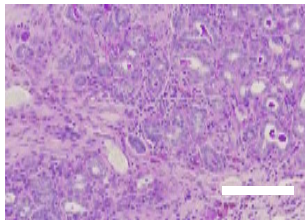


Fig.3. 28days

2.bFGF 投与群

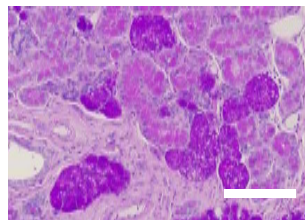


Fig.4. 28days (Bar=100 μ m)

(3)マッソントリクローム染色 (MT)の所見

1.対照群

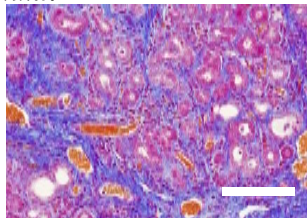


Fig.5. 28days

2.bFGF 投与群

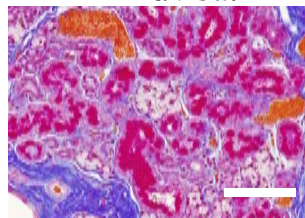


Fig.6. 28days (Bar=100 μ m)

(4) AQP5 の所見

AQP5 による免疫染色から、対照側の充填後 28 日目では一部の腺房内腔の細胞膜で陽性反応を呈していたが、投与群では欠損部辺縁に沿って出現した多くの腺房内腔の細胞膜で陽性反応が認められた。

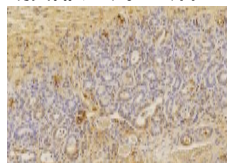


Fig.9. 28days

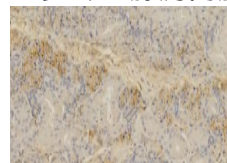


Fig.10. 28days (Bar=100 μ m)

(5) 細胞培養所見

脂肪細胞の培養と RSMG-1 細胞の培養条件の設定に予想以上の時間を要してしまい、移植による成果を得ることができずに終了している。培養条件の中でセレン酸ナトリウムの濃度が高かった

という原因はつかめているため、今後の新たな研究計画を策定し、今後の課題として取り組んでいきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕

菊池憲一郎, 池田利恵, 高田清美, 佐藤住美江:研究成果と臨床応用 唾液腺研究から考える健康寿命への取り組み, 歯学, 103 巻(春季特集):96-99, 2016.

〔学会発表〕(計7件)

Ikeda R, Kikuchi K, Sato S. Influence of Ginger Administration on Diabetic Rat Parotid Gland, 2016 AADR/CADR Annual Meeting & Exhibition Program Book, 81, 2016.(Los Angeles, March 16-19, 2016) □

渡辺奈和, 河合俊明, 岸 碧紀, 黒澤良樹, 瀬川史香, 樋浦 望, 高田清美, 池田利恵, 菊池憲一郎:resveratrol 投与による唾液腺への影響について, 第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会 講演プログラム・抄録集, 147, 2016. □

Kikuchi K, Nasu M, Ikeda R, Takada K, Sawano K, Sato S, Horie T:Tissue Regenerative Effects of Basic Fibroblast Growth Factor in a Mouse Model of Submandibular Gland Injury ,IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition, San Francisco, Calif., 2017.

澤野和生, 菊池憲一郎, 那須優則, 堀江哲郎, 池田利恵, 高田清美:マウス顎下腺への放射線照射に対する鉛板の防護条件の検討, 第59回歯科基礎医学会学術大会 プログラム・抄録集, 481, 2017.

菊池憲一郎:唾液腺の発生と分化, 日本歯科大学生命歯学部 平成 29 年度大学院セミナー, 日本歯科大学生命歯学部, 平成 29 年 6 月 15 日.

芳澤恵, 平島寛司, 伊藤光翼, 岡本なつみ, 片岡亮輔, 鎌田真綺, 高橋裕, 澤野和生, 佐藤住美江, 高田清美, 池田利恵, 菊池憲一郎:顎下腺組織再生に肝細胞増殖因子(HGF)が与える影響の組織学および分子生物学的評価, 第 124 回日本解剖学会総会・全国学術集会 講演プログラム・抄録集, 133, 2019

R. Ikeda, A. Ikeda, C. Aiba, K. Kikuchi : Relationship between Oral Health and Lifestyle Factors in Children, 96th General Session of the International Association for Dental Research, London, July 25-28, 2018, www.iadr.org/IADR/Meetings/2018IAGS.

〔図書〕(計1件)

菊池憲一郎(分担執筆):顕微鏡の使用法 組織標本と染色法 観察手順とスケッチの要領, 1-5 頁, 13.口腔粘膜の発生と微細構造, 103-111 頁, 14.唾液腺(口腔腺)の発生と 微細構造, 113-118 頁, 15.扁桃の発生と微細構造, 119-122 頁, 磯川桂太郎, 下田信治, 山本 仁 編著, カラーアトラス 口腔組織学 第4版, わかば出版株式会社, 日本, 2016 年, ISBN:978-4-89824-078-6C3047.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：池田 利恵

ローマ字氏名：(IKEDA, rie)

所属研究期間名：日本歯科大学東京短期大学

部局名：歯科衛生学科

職名：教授（移行）

研究者番号（8桁）：50168150

研究分担者氏名：那須 優則

ローマ字氏名：(NASU, masanori)

所属研究期間名：日本歯科大学

部局名：生命歯学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：50130688

研究分担者氏名：高田 清美（小池 清美）

ローマ字氏名：(TAKADA, kiyomi)

所属研究期間名：日本歯科大学

部局名：生命歯学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：60307957

研究分担者氏名：堀江 哲郎

ローマ字氏名：(HORIE, tetsuro)

所属研究期間名：日本歯科大学

部局名：生命歯学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：10508675

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：佐藤 住美江

ローマ字氏名：(SATO, sumie)