

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：33602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20471

研究課題名(和文) 臍帯由来間葉系幹細胞を用いた放射線性唾液腺機能障害の回復

研究課題名(英文) Potential of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells for the treatment of salivary gland dysfunction

研究代表者

井上 実 (INOUE, MINORU)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90599036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：今年度はin vivoモデルを作出し、臍帯由来MSCの移植が唾液量を増加させることができるかを検討した。マウス頭頸部に8 Gyのエックス線を照射することで、唾液量が減少することを確認した。尾静脈より臍帯由来MSCを注入し、その影響について検討を行った。1回投与では有意な唾液量の増加は認められなかったが、照射直後および1週後に再投与を行うことで、唾液量の有意な増加を確認した。また、唾液腺重量の増加は認められなかったことから、唾液腺組織の再生が示唆された。そのメカニズムについては、in vitro実験の結果から、臍帯由来MSCからの液性因子の効果が主であり、接触による影響は少ないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：From in vitro experiments, the functional recovery of acinar cells by umbilical cord-derived MSCs (UC-MSCs) has been confirmed. In this fiscal year, we investigated the effect of UC-MSCs for the functional recovery of salivary gland using an in vivo model. After 8Gy irradiation to head and neck region of mice, the reduction of whole saliva was confirmed. One time administration of UC-MSCs via tail vein was not effective. However, two times administration just after irradiation and one week after irradiation significantly increased the saliva volume. On the other hand, the weight of salivary gland did not change, which suggest the tissue regeneration. The results from in vitro experiments showed the secreted factors from salivary gland might be more important than the direct contact to the transplanted cells.

研究分野：再生医療

キーワード：口腔乾燥症 唾液腺機能障害 放射線治療 放射線障害 臍帯由来間葉系幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌に対する放射線照射により唾液腺は萎縮し、口腔乾燥が引き起こされる。患者は、唾液の不足により、咀嚼、嚥下、会話の障害のみではなく、う蝕や歯周疾患の多発などの症状に苦しめられ、生活の質 (QOL) は著しく低下する。しかしながら、現在のところ唾液腺の萎縮に対して満足できる治療法はない。

唾液腺再生の方法として、これまでに2つの方向から研究が進められている。一つは幹細胞からの臓器の再生であり、もう一つは萎縮唾液腺に対する細胞治療である。再生医療が実用化されている皮膚、粘膜、軟骨、骨などと比べて、唾液腺は導管系を持ち、血管や神経が高度に組織化された複雑な臓器である。現在のところ臓器再生のハードルは高く、いまだ基礎研究段階にある。一方、細胞治療については、有望な研究成果が報告されている。われわれのグループでは、培養された唾液腺上皮細胞を直接注入することで、移植された細胞が唾液腺に生着することを示した (Sugito et al. Cell Transplant, 2004)。興味深いことに、移植細胞は正常な腺組織には生着せず、損傷部位に集積し、生着する。その後、骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) や、浮遊培養によって得られた唾液腺組織幹細胞を含む分画を投与することで、唾液腺機能が回復することが報告されている (Lombaert et al., Pros One, 2010)。さらに、われわれのグループでは、培養を行わない骨髄由来単核球を用いても、同様の効果が得られることを明らかにした。これらの研究では唾液腺あるいは骨髄由来幹細胞の培養が必要となるが、唾液腺上皮細胞の培養は技術的に困難であり、また2か月程度の長期の培養期間が必要となる。骨髄由来間葉系幹細胞については比較的容易に培養できるものの、腫瘍患者の骨髄細胞中には腫瘍細胞の混在の可能性が否定できないため、臨床に応用することは

困難である。

培養唾液腺細胞、間葉系幹細胞、骨髄単核球細胞を癌治療中の患者より得ることは困難であり、腫瘍患者の細胞を使用することには安全性の懸念もある。一方 ES 細胞や iPS 細胞の利用も期待されるが、安全性については懸念がある。そこでわれわれは同種より採取可能な臍帯 MSC に着目した。臍帯は胎児由来組織であり、ワルトンジェリー、動脈及び静脈より構成され、各々から MSC の採取が可能である。また臍帯由来 MSC は骨髄由来 MSC よりも遺伝子学的に ES 細胞に近く、原始 MSC と呼ばれ外・中・内胚葉系組織である神経、肝臓、骨、筋等の3葉系への分可能及び高増殖能、免疫抑制能や低免疫原性を有し、テマトーマを形成せず、ストローマ同様の支持細胞機能を有するとされている。入手しやすく、患者への負担の少ない再生医療ソースである臍帯由来 MSC による唾液腺機能障害の治療が可能となれば、臨床的な意義も高いと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の最終的な目標は、幹細胞による萎縮唾液腺の新たな治療法の開発である。具体的には、細胞移植による機能回復メカニズムの解明を行うとともに、さらに効果的、実用的な治療法開発へつなげるため、同種より採取可能なヒト臍帯由来間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells, MSC) を用いた萎縮唾液腺の機能回復の可能性について検討することである。

## 3. 研究の方法

### (1) in vitro モデルによる検討

#### 終末分化した唾液腺上皮細胞の培養

われわれは、これまで唾液腺上皮幹細胞の効果的な培養を開発し、報告してきた。この培養を継代することなく継続培養することで、上皮細胞は導管、および腺房へと分化することが明らかとなっている。この唾液腺上皮細胞の培養系に対して放射線照射を行うこと

で、唾液腺細胞の増殖能の抑制と機能低下が見られることを明らかにした。さらに、放射線照射後に細胞移植に用いられて治療効果が確認されている骨髄単核球分画(MNC)と共培養を行い、唾液腺の *in vitro* 放射線障害モデルにおいても、MNC による唾液腺の機能回復が認められ、腺房マーカーである AQP-5 の遺伝子発現の回復が確認されている。(唾液腺上皮細胞の培養方法)6 週齢の

balb/cA/Jcl マウス (日本クレア)をペントバルビタールの過量投与により安楽死させ顎下腺を摘出する。メスを用いて直径 1mm 程度まで細かくし 1mg/ml Collagenase(和光純薬)によって 30 分間酵素処理により細胞単離を行い培地中で培養を行う。培地は Dmem-F12(1:1)15mM Hepes L-glutamin(GIBCO)に 1% Fungizone Amphotericine B(GIBCO),Penicillin Streptomycin(GIBCO),B27 supplement(GIBCO),10ng/ml EGF,20ng/ml bFGF を加えて 5%CO<sub>2</sub> インキュベータ内で培養し週に二回の頻度で培地交換を行う。

培養唾液腺上皮細胞への放射線障害モデル  
唾液腺細胞(P1、 $1 \times 10^5$  cells/well)を 24well plate に播種し、播種 3 日後に 20, 40 および 60Gy の照射を行う。照射前に WST-8 で細胞数測定し、播種 10 日後(radiation 後 8 日)に WST-8 で細胞数測定する。

*In vitro* 放射線照射障害モデルにおける幹細胞との共培養系と機能解析

(1) の *in vitro* モデルを用いて臍帯由来 MSC との共培養を行い、唾液腺マーカー(AQP5, zo-1,  $\alpha$ SMA の発現を解析する。臍帯由来 MSC は東京大学医科学研究所セルフプロセッシング・輸血部 細胞リソースセンターにて調整、保管されているものを使用する。

(2) *in vivo* モデルにおける検討

*in vivo* モデルの確立

ヒト臍帯由来 MSC を移植するため

BALB/cAJc1-nu/nu マウスを使用する。マウスの頸部に 0 から 25Gy の X 線を照射し、8 週間後に唾液量及び唾液腺重量を測定する。マウスが生存可能で、唾液量が正常時の 50%程度になる X 線照射量を定める。

*in vivo* モデルによる細胞投与の影響に関する検討

臍帯由来 MSC は P3 凍結細胞を使用時解凍し、洗浄後 1 匹あたり 200  $\mu$ l となるよう生食で懸濁する。細胞数は  $1 \times 10^5$  cells から  $2 \times 10^6$  cells で検討する。1 匹に 2 回尾静脈投与を行う。X 線照射、細胞投与 8 週間後に唾液量、唾液腺重量を測定する。さらに唾液腺の凍結切片を作製し、HE 染色、免疫染色により組織変化を観察する。

#### 4. 研究成果

幹細胞による萎縮唾液腺の新たな治療法を開発するため、始めに、唾液腺の *in vitro* 放射線障害モデルを用いた体性幹細胞による唾液腺細胞の機能回復 について検討を行った。

単離した唾液腺細胞を浮遊培養し、さらに接着させて継続培養することで、上皮細胞は導管、および腺房へと分化する。また、この唾液腺上皮細胞の培養系に対して放射線照射を行うことで、唾液腺細胞の増殖能の抑制と機能低下が見られる。この培養細胞と骨髄単核球分画(MNC)と共培養を行うことで、*in vitro* 放射線障害モデルにおいても、MSC による唾液腺の機能回復が認められている。

平成 27 年度は、ヒト臍帯由来 MSC を用いて、同様の共培養が可能かどうかを検討した。ヒト臍帯由来 MSC は DMSO 中に凍結されており、解凍後直ちに PBS にて洗浄を行い、必要細胞数を同一培地にて懸濁後共培養に用いた。ヒト臍帯由来 MSC は共培養下にて安定して増殖可能であった。そこで、同一の環境下におけるヒト臍帯由来 MSC の特徴を理解するため、従来研究に用いてきた骨髄単核球細胞および骨髄由来間葉系幹細胞を用いて、ヒト

臍帯由来 MSC との比較検討を行った。種差のため単純な比較は困難であるが、同一細胞数では、骨髄単核球および間葉系幹細胞と比較して AQP-5 の遺伝子発現の高い発現が認められた。

平成 28 年度には in vivo モデルを作出し、実際に臍帯由来 MSC の移植が唾液量を増加させることができるかを検討した。マウス頭頸部に 8 Gy のエックス線を照射することにより、唾液量が減少することを確認した。尾静脈より臍帯由来 MSC を注入し、その影響について検討を行った。1 回投与では有意な唾液量の増加は認められなかったが、照射直後および 1 週後に再投与を行うことで、唾液量の有意な増加を確認した。また、唾液腺重量の増加は認められなかったことから、唾液腺組織の再生が示唆された。そのメカニズムについては、in vitro 実験の結果から、臍帯由来 MSC からの液性因子の効果が主であり、接触による影響は少ないことが示唆された。

本研究では尾静脈から 2 回の細胞投与を行ったが、蛍光色素を用いた解析では 4 週後に唾液腺に生着した細胞数は多くなかった。従って、今後投与回数を増加するなど、細胞移植の条件について更に検討を行って行く予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

ポスター発表

Inoue M, Hori A, Mori Y, Nagamura T, Tojo A, Kagami H Potential of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells for the treatment of salivary gland dysfunction. Translational Opportunities in Stem Cell Research 2017.2.27-3.1 スイス・バーゼル

〔図書〕(計 0 件)

〔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

井上 実 (INOUE, Minoru)  
松本歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号：90599036

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )