

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間： 2006 ～ 2008

課題番号：18791505

研究課題名（和文）分離唾液腺幹細胞の再構築による唾液腺再生医療の開発

研究課題名（英文） Salivary gland regeneration by separated stem cell

研究代表者

平木 昭光 （HIRAKI AKIMITSU）

熊本大学・大学院医学薬学研究部・講師

研究者番号：60404034

研究成果の概要：特殊な培地を用いて、マウス唾液腺より単一な唾液腺上皮細胞を分離し、培養を可能にした。その細胞を用いて唾液腺組織の再構築を試みたところ、形態的・機能的にその傾向を示すことができた。その分化誘導に関して、HGF（細胞増殖因子）、IV型コラーゲン（細胞外基質）などの因子が重要な役割を演じている可能性が示唆された。唾液腺再生をめざし、この唾液腺上皮細胞をマウス体内に自己移植したところ、わずかな唾液アミラーゼタンパクの発現が確認できたが、今後のさらなる検討が必要である。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,400,000	0	1,400,000
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	180,000	3,480,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医学・再生医学

キーワード：再生医学、細胞・組織、発生・分化、唾液腺

## 1. 研究開始当初の背景

唾液は口腔機能を維持するだけでなく、人が健康で快適な生活を送る上で非常に重要な役割を演じている。しかし、唾液腺は加齢や多種薬剤によって機能低下を来たしやすく、口腔乾燥を訴える患者は増加傾向にある。また、唾液分泌低下は口腔癌術後や放射線治療

後、シェーグレン症候群患者に著明に認められ、健康維持を極度に低下させる。ドライマウスとして社会的認識が高まった現在でも、これらの唾液腺機能障害に起因する口腔乾燥症に対しては、有効な治療法は確立されておらず、対症療法に依存しているのが現状で

ある。

## 2. 研究の目的

ヒト唾液腺再生を見据え、分離唾液腺細胞を用いて唾液腺再構築、自己移植マウスモデルを確立する。

## 3. 研究の方法

(1) 分離唾液腺細胞から唾液腺組織の再構築を誘導し、形態・機能について検討する。

(2) 分離唾液腺細胞を宿主に自己移植する、手法・最適条件を検討する

(3) 自己移植後も形態的・機能的維持の条件について検討する。

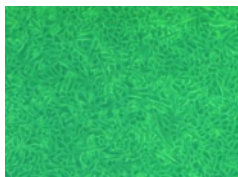
(4) 放射線照射により障害をうけた唾液腺の再生に関する検討

## 4. 研究成果

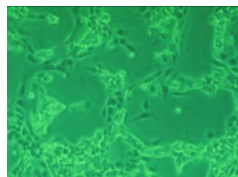
(1) マウス唾液腺より分離・培養した唾液腺細胞を用いて、以下の検討をおこなった。

### 再構築唾液腺の誘導と形態的検討

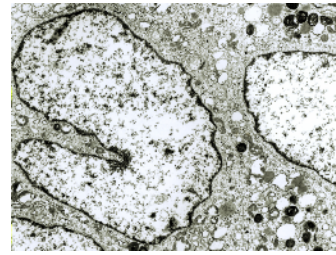
マウス唾液腺組織から、各種の成長因子を添加した低 Ca (0.2 mM) 無血清培地を用いて、唾液腺上皮細胞のみを抽出し、単層培養を可能にした(写真1)。その細胞は立方形で敷石状に配列し、透過型電子顕微鏡を用いた観察では、細胞内小器官に乏しい未分化な細胞であった。培地の Ca 濃度を 1 mM (高 Ca 無血清培地) に上昇させることによって、唾液腺上皮細胞は腺管様構造を形成し(写真2)、超微形態的には粗面小胞体やゴルジ装置などの細胞内小器官は発達するとともに、分泌顆粒の増加を認めた(写真3)。



(写真1)



(写真2)

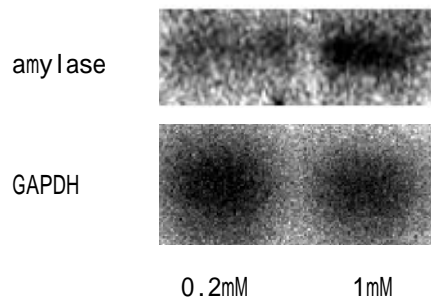


(写真3)

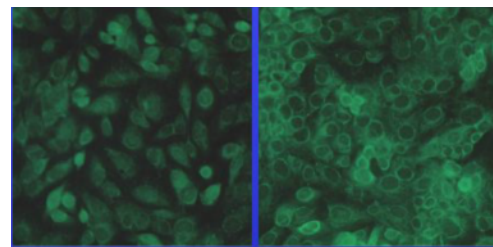
### 再構築唾液腺の機能的検討

高 Ca 無血清培地にて培養を行うと、腺管様構造を示した唾液腺上皮細胞の唾液アミラーゼ遺伝子発現は増加した(Northern blot法)(写真4)。また細胞内および培養上清中の唾液アミラーゼ蛋白量も増加した(免疫組織染色、Western blot法)(写真5)。

(写真4)



(写真5)



0.2 mM

1 mM

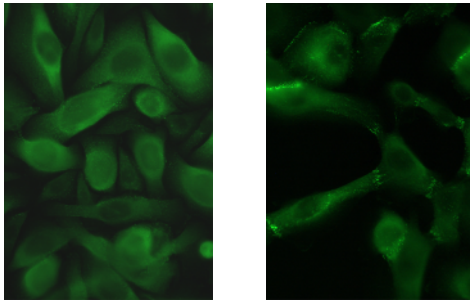
### 再構築唾液腺の機能促進因子の検討

唾液腺上皮細胞の腺管様構造形成における、

細胞増殖因子 (EGF、HGF、FGF family)、形態形成因子 (TGF- $\beta$ 、Shh)、細胞外基質 (I・IV 型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン) の関与を検討した。細胞外基質 (IV 型コラーゲン) 上で培養することによって、導管構造の伸展と分枝数の増加が促進された。HGF による細胞刺激でも同様の現象が観察された。またその際に、細胞間接着装置 (デスモブラキン、デスモグレイン、デスモコリン) の著明な増加が認められており、細胞接着の重要性が示唆された (写真 6)。

(写真 6)

デスモソームタンパクの免疫組織染色



無刺激時

刺激時

#### 分離唾液腺細胞の自己移植および移植後の形態的、機能的維持についての検討

マウス唾液腺組織から分離した唾液腺上皮細胞を培養し、その細胞から再構築した唾液腺細胞塊を顎下腺周囲に移植し、組織学的変化の観察を行った。その結果、個々の移植唾液腺細胞は萎縮傾向を示したが、E-カドヘリン、デスモソームファミリー (デスモブラキン、デスモグレイン、デスモコリン) などの細胞間接着装置の発現が一部でみられた。しかし、細胞外基質 (I・IV 型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン) はほとんど認められず、細胞増殖因子 (EGF、HGF、FGF family)、形態形成因子 (TGF- $\beta$ 、Shh) の明らかな発

現は確認できなかった。機能的評価として、移植唾液腺細胞の唾液アミラーゼタンパクの発現を免疫組織染色で検索したところ、わずかにその発現がみられたものの、固有顎下腺組織との融合や唾液アミラーゼタンパク発現の増強はなかった。

分離唾液腺細胞の自己移植の条件についてさらに検討を行う予定である。

#### (2)放射線照射により障害をうけた唾液腺の再生に関する検討

ヒト唾液腺の再生において重要な因子を検索するため、放射線治療後に手術で摘出した唾液腺組織を用いて免疫組織染色で検討した。照射後の唾液腺組織では腺房細胞の萎縮や変性が著明に認められるとともに、IV 型コラーゲンと HGF の発現低下の傾向がみられた。唾液腺組織再生においてそれらの因子が関与している可能性が考えられるため、培養唾液腺上皮細胞に放射線照射で細胞障害を加え、IV 型コラーゲンと HGF の関与についてさらに検討予定である。

#### 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)

[学会発表](計 3 件)

上野啓之, 吉武義泰, 中山秀樹, 田中拓哉, 永田将士, 吉田遼司, 福間大喜, 尾木秀直, 大林武久, 平木昭光, 篠原正徳  
口腔癌患者における刺激時唾液量と背景因子との関連についての検討  
第18回日本口腔粘膜学会  
2008年9月20日、東京

Keiko Teshima, Akimitsu Hiraki, Ryuji Murakami, Yoshihiro Yoshitake, Masanori Shinohara  
Parotid gland changes after 30Gy

irradiation in patients with oral cavity cancer treated with preoperative conventional radiation therapy.

58 KONGRESS DER DEUTSCHEN GESELLSCHAFT FÜR MUND-, KIEFER- UND GESICHTSCHIRURGIE  
2008年5月14日、ミュンスター、ドイツ

吉田遼司, 中山秀樹, 浅野和正, 太田和俊,  
吉武義泰, 尾木秀直, 大林武久, 平木昭光,  
篠原正徳

頭頸部癌患者の放射線治療後の唾液分泌障  
害に関する検討

第 31 回日本頭頸部癌学会  
2007 年 6 月 15 日、横浜

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

平木 昭光 (HIRAKI AKIMITSU)  
熊本大学・大学院医学薬学研究部・講師  
研究者番号 : 60404034

(2)研究分担者  
( )

研究者番号 :

(3)連携研究者  
( )

研究者番号 :