

平成22年 5月13日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19390512

研究課題名（和文） 唾液腺組織再生メカニズムの解明と体性幹細胞の移植による再生

研究課題名（英文） Investigation on the mechanisms of salivary gland tissue regeneration and effect of somatic stem cell transplantation

研究代表者 各務 秀明（KAGAMI HIDEAKI）

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：80242866

研究成果の概要（和文）：腺組織に代表される実質臓器の再生はいまだ困難である。複雑な臓器の再生にとってより現実的な選択は、損傷を受けた組織に存在する再生力を利用し、組織再生の過程を促進することによる治療と考えている。唾液腺組織の再生過程を促進するための研究が行われているが、現在用いられている体性幹細胞、あるいは培養唾液腺細胞では、再生能力が不十分であることが明らかとなってきた。したがって、本研究では唾液腺を構成するすべての細胞種へと分化可能な幹細胞を同定し、増幅させるための検討を行なうこととした。第1のプロジェクトとして、放射線照射による唾液腺萎縮モデルに対する骨髓単核球分画の移植実験を行った。20 Gy の照射により唾液量は有意に減少する。照射後の顎下腺に同種骨髓由来単核球細胞を投与することにより、唾液分泌量の回復を認めた。さらに、放射線照射モデルによる治療ウィンドウは照射直後－14日と比較的長期にわたることが明らかとなった。その一方で単核球細胞からの腺房細胞への分化は確認できなかった。第2のプロジェクトは、唾液腺中に含まれる可塑性の高い幹細胞分画の抽出と増幅である。唾液腺中に含まれる幹細胞分画を濃縮し、維持させるための培養法を確立した。本培養では平面培養を続けると腺房、あるいは導管へと自発的な分化が起こる。幹細胞としての分化能を維持するためには、そのトリガーとなる因子についての検討が必要である。本研究から、本培養中の幹細胞分画は、autocrine, あるいは paracrine のメカニズムにより分化が制御されているものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：The regeneration of complex organ such as gland is still difficult. For the regeneration of organ, one of the most promising strategies is the acceleration of naturally existing regeneration capability. Although several approaches to enhance salivary gland regeneration have been reported, those cell based therapy are not

sufficient so far. Accordingly, it was our aim to investigate a potential of salivary gland regeneration by use of somatic stem cells, which posses differentiating capability to virtually all salivary gland cells. First, we have investigated the effect of cell transplantation to irradiated salivary gland. Rat submandibular gland function was damaged after 20 Gy irradiation. Allogenic mononuclear cells from bone marrow were transplanted to submandibular gland. The recovery of salivary gland secretion was observed and the treatment window was at least 1-14 days after transplantation. On the other hand, differentiation from mononuclear cells to parenchymal cells was not observed. Second, we have investigated the potential of stem cell culture from salivary gland, which can differentiate into all components of salivary gland. In this culture, possible salivary gland stem cells can be retained for relatively longer period and the cultured cells showed differentiation into acinar and duct. The possible trigger for the development has been investigated and the potential of autocrine or paracrine mechanisms were suggested.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2007年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2008年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2009年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総 計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学・口腔外科学一般（含病態検査学）

キーワード：唾液腺、再生、細胞培養、組織工学、遺伝子解析、DNAマイクロアレイ、細胞療法、ディファレンシャルディスプレイ

1. 研究開始当初の背景

疾患によって失われた臓器や組織の機能を回復し、健康状態を取り戻すための研究として、再生医療が注目されている。歯科領域においても、歯、歯根膜、歯槽骨、口腔粘膜などさまざまな組織が再生研究の対象となっている。すでに骨や歯周組織の再生については臨床研究が始まっているのに対して、唾液腺の再生はいまだ基礎研究の段階にある。唾液腺の機能低下は、口腔腫瘍の放射線治療やシェーグレン症候群、あるいは内服薬の副作用によって引き起こされる。中でも、放射線による障害の多くは非可逆性であり、現在のところ有効な治療法はない。これまでわれわれは、ティッシュエンジニアリング的手法を用いてさまざまな組織再生を試みてきたが、腺組織に代表される実質臓器の再生はいまだ困難である。特に腺房部から導管系に至る複雑な構造を、培養細胞と担体の組み合わせのみで再現することは現在のところ不可能である。複雑な臓器の再生にとってより現実的な選択は、損傷を受けた組織にもともと存在する再生力を利用し、組織再生の過程を促進することによる治療と考えている。この場合、既存の導管系や神経支配を含む構造が利用可能なため有利である。

現在までに、唾液腺組織の再生過程を促進するための研究が行われているが、実際に機能改善にまで結びついているのは、細胞移植による方法である。近年、唾液腺由来の細胞ではないが、放射線照射による萎縮唾液腺に対して骨髄由来の間葉系幹細胞を移植すると細胞は生着し、放射線照射による唾液腺の機能低下を改善することが示された (Clin Cancer Res 12: 1804-1812, 2006)。興味深いことに、

移植した細胞の唾液腺組織への分化は認められなかったという。唾液腺組織の再生のためには、唾液腺を構成するすべての細胞種へと分化可能な細胞を用いることが必要と考えられるが、これまでそのような幹細胞の存在は報告されていない。

近年、導管結紮からの回復過程にある唾液腺から、臍島細胞へと分化可能な幹細胞分画が存在することが報告された (Hepatology 38: 104-113, 2003) さらに、この唾液腺中に見られる幹細胞は、多能性があるとされる (Biochem Biophys Res Commun 340: 544-552, 2006)。現在のところ、これらの唾液腺中に含まれる幹細胞が、実際に唾液腺組織の再生する可能性については、報告されていない。本研究では、これら唾液腺中に含まれる幹細胞分画を用いた萎縮唾液腺再生の可能性について検討を行った。

2. 研究の目的

本研究では、骨髄由来細胞、あるいは唾液腺中に含まれる幹細胞分画を用いた萎縮唾液腺再生の可能性について検討を行った。

本研究を通じて、唾液腺再生のメカニズムを探るとともに、現在までに進めてきた細胞移植をさらに有効な治療とし、実際に腺の萎縮や機能低下に苦しむ患者に対する新たな治療法の開発を目指した検討を行った。

3. 研究の方法

1) 唾液腺中に存在する多能性幹細胞の培養法の確立

当初は萎縮からの回復過程にある唾液腺を摘出し、酵素処理の後細胞を単離する計画であった。しかしながら、その後

温熱刺激による幹細胞の選択培養法や冬培養による唾液腺幹細胞の新たな培養法が報告された。特に無血清培地を用いた浮遊培養法 (Sphere culture) の有用性が報告されたため、計画の変更を行った。

本研究では、無血清培地による sphere culture を行うとともに、その問題点について検討を行った。その結果 sphere culture は細胞の分化能が維持されるものの、増殖が得られないことが明らかとなった。従って、培地中の血清の有無、増殖因子、接着状態による差を検討し、分化能を持つ幹細胞の維持が可能で増殖の得られる培養条件についての検討を行った。

2) 唾液腺由来多能性幹細胞の分化能に関する検討

本研究にて重要な役割を果たすのは、多能性を持った幹細胞である。特に、唾液腺の構成要素である導管と腺房への分化について検討を行った。導管については平面培養による形態の変化 (Dome formation) を指標とし、腺房については分化マーカーである AQP-5 の発現を遺伝子レベルおよび蛋白レベルで確認することとした。また、それに必要とされるポリクローナル抗体を作製した。

3) 唾液腺萎縮モデルの作製

これまで間葉系幹細胞の移植による萎縮唾液腺の機能回復の可能性が報告されている。唾液腺由来の多能性幹細胞の移植によっても唾液腺の機能回復の可能性が考えられるが、現時点では明らかではない。骨髄由来細胞では機能回復が確認されているが、培養により可塑性が徐々に失われることが明らかとなっている。本研究では、より入手が容易で未分化な細胞分画を含むと考えられる骨髄単核球

分画を用いた実験をパイロットスタディとして行うこととした。

唾液腺導管結紮モデルを用いた予備実験から、結紮除去直後から3日後までに細胞移植を行った場合には生着するものの、6日後以降に移植しても生着しないことが明らかとなっている。この事実は、細胞移植にはレシピエントである萎縮唾液腺の状態が重要であり、細胞の生着は特定の時期に発現する遺伝子によって制御されている可能性が示唆される。しかしながら、その詳細については明らかではない。本申請では、導管結紮モデル、および放射線照射モデルに対して細胞移植を行い、細胞の生着が得られる時期、および組織障害の種類による違いについて検討を行った。本実験には GFP トランスジェニックマウス由来の骨髄由来細胞を用いて、ヌードマウスへの移植を行った。ヌードマウスを用いた導管結紮モデルおよび放射線照射モデルについては確立しており、唾液腺量の低下も確認している。

4) 細胞移植による機能回復と分化の検討

細胞移植の条件を最適化した後に、実際の唾液分泌能の回復について検討を行った。ピロカルピンによる刺激を行い、マウス口腔内に貯留する唾液重量を計測した。また、唾液腺組織の凍結切片を作製し、GFP トランスジェニックマウス由来の細胞を同定した。さらに腺房のマーカーである AQP-5 抗体による免疫染色により、腺房への分化を検討した。

4. 研究成果

1) 萎縮唾液腺に対する細胞移植

可塑性の高い体性幹細胞を含む分画として知られている骨髄由来細胞を用いて、

その中に唾液腺細胞への分化能を持つ細胞が存在する可能性について、検証を行なった。放射線照射による唾液腺萎縮モデルを確立した。20 Gy の照射により唾液量は有意に減少する。次に、GFP マウス由来の骨髓単核球細胞を移植して、移植細胞の生着を確認した。

さらに、放射線照射モデルによる治療ウィンドウは照射後 - 14 日と比較的長期にわたるが、その一方で単核球細胞からの腺房細胞への分化は確認できなかつた。細胞移植による唾液分泌促進効果はいずれの群でも認められたが、唾液腺重量には変化は見られなかつた。

第2のプロジェクトは、唾液腺中に含まれる可塑性の高い幹細胞分画の抽出と増幅である。唾液腺中に含まれる幹細胞分画を濃縮し、維持させるための培養法を確立した。無血清培地で付着培養を行なうことで、幹細胞/前駆細胞の維持が可能であった。

この細胞は主に Sca-1 陽性であり、わずかに c-kit 陽性細胞を含んでいた。

また、培養細胞をゲル中で3次元培養することで、導管様の構造をつくることが明らかとなった。

一方平面培養を続けることで、培養細胞からは導管に相当する dome formation 確認された。これまで Nodule formation については知られていなかったが、われわれは腺房の特異的マーカーである AQP5 に対する特異的抗体を作製し、免疫蛍光法と western blotting 法により、nodule 部分に AQP5 が局在し、本培養細胞が腺房様細胞へと分化していることが明らかとなった。

以上から、本培養法では唾液腺幹

細胞の性質を比較的長期間維持した状態で細胞増殖が可能であるものと考えられた。

幹細胞としての分化能を維持するためには、そのトリガーとなる因子についての検討が必要である。本研究期間中には、EGF, bFGF の添加あるいは枯渇による分化誘導の可能性について検討を行った。しかしながら、これらの因子の増減は分化誘導刺激とはならず、その一方で conditioned medium による分化誘導の可能性が示唆された。以上から、本培養中の幹細胞分画は、autocrine,あるいは paracrine のメカニズムにより分化が制御されているものと考えられた。

これらの結果については現在論文投稿準備中である。

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 31件)

1. 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* in press
2. 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* in press
3. 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* in press
4. Kagami H*, Songlin Wang*, Bo Hai. Restoring the function of salivary glands. *Oral Diseases* 14,15-24, 2008.
他 2 7 件
〔学会発表〕 (計 1 9 件)
1. Kagami H. Tissue Engineering: Stem cells, growth factors and scaffold for tissue regeneration. Stem Cells and Clinic Applications Session II D: Clinical Translation & Disease Models Biobridge Event 2008, September 22, 2008, United Nations, Geneva, Switzerland
2. 各務 秀明、縣 秀樹、水野 大生、上田 実 (シンポジウム(28) 細胞分化と口腔領域における再生)「体性幹細胞の”stemness”について」第 1 1 3 回日本解剖学会総会 2008. 3. 29
3. 各務秀明、本田雅規、山田陽一、水野裕和、上田 実 (シンポジウム 2 口腔領域の Stem Cell Biology) 体性幹細胞の分化誘導と口腔組織再生への応用。第 61 回日本口腔科学会総会 2007. 4. 19
4. 青木玲奈、縣秀樹、大海忍、各務秀明 「マウス顎下腺を用いた新規無血清上皮培養法の開発」2008. 12. 11 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会
5. Aoki R, Agata H, Imajoh-Ohmi S, Kagami H A novel serum-free culture

method of mouse submandibular gland epithelial cells. 2008. . 9. 23 第 22 回唾液腺談話会

6. 青木玲奈、縣秀樹、大海忍、各務秀明「マウス顎下腺を用いた新規無血清培養法の確立および器官形成能の検討」2009.3.6 第 8 回日本再生医療学会総会

他 1 3 件

〔図書〕 (計 1 件)

各務 秀明、山本 憲幸 「6-1. 口腔組織の再生・移植」口腔内科学 尾崎登喜雄編 飛鳥出版室, 2008

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

各務 秀明 (KAGAMI HIDEAKI)

東京大学・医科学研究所・特任准教授
研究者番号：80242866

(2) 研究分担者

上田 実 (UEDA MINORU) (2007 年度)

名古屋大学大学院・医学系研究科・教授
研究者番号：00151803

本田 雅規 (HONDA MASAKI) (2007 年度)

東京大学・医科学研究所・寄附研究部門教員
研究者番号：70361623

(3) 連携研究者

上田 実 (UEDA MINORU) (2008-9 年度)

名古屋大学大学院・医学系研究科・教授
研究者番号：00151803

本田 雅規 (HONDA MASAKI) (2008-9 年度)

日本大学・歯学部・准教授 (現職)
研究者番号：70361623