

## 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24年 5月24日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592323

研究課題名（和文）マウスの唾液腺幹細胞の分離

研究課題名（英文）Isolation of stem cells in the mouse salivary gland

研究代表者

小川 裕三（OGAWA YUZO）

大阪大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：10135725

研究成果の概要（和文）：組織幹細胞は bromodeoxyuridine ラベルを長期間保有するが、このような細胞（BrdULRC）はラットの顎下腺では介在部導管と排出導管に存在する。BrdULRC はマウスの顎下腺の介在部導管にも存在した。介在部導管細胞は CD29、CD49f、CD117 陽性で幹細胞であることが示唆された。しかしながら CD117 陽性唾液腺細胞は *in vitro* で幹細胞の特徴である球状の細胞塊を形成しなかった。

研究成果の概要（英文）：Tissue stem cells, which retain bromodeoxyuridine (BrdU) label, have been localized to the intercalated and excretory ducts of rat submandibular glands. BrdU label-retaining cells were found in the intercalated duct of mouse submandibular glands. The intercalated duct cells expressed CD29, CD49f and CD117, suggesting they are the stem cells of mouse salivary gland. CD117-positive cells isolated from mouse submandibular glands, however, failed to form floating spheres, a characteristic feature of tissue stem cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：唾液腺、幹細胞、マウス、免疫組織化学、bromodeoxyuridine、CD117、細胞培養

## 1. 研究開始当初の背景

生体のほとんどの臓器や組織には幹細胞が存在し、それぞれのホメオスタシスや再生に働いていると考えられている<sup>1</sup>。しかしながら幹細胞に普遍的なマーカーが見つかっていないことから、このような細胞の分離は

わずかな組織で成功しているにすぎない<sup>2</sup>。

唾液腺細胞はゆっくりとではあるが絶えず入れ替わっている。また唾液腺は障害を受けると再生する能力を有する。これらの事実は唾液腺に幹細胞が存在することを示している。事実、ラット顎下腺で1個の細胞から

導管細胞、腺房細胞、筋上皮細胞が生じることが示されている<sup>3</sup>。

上皮組織幹細胞の信頼性の高い同定法として、細胞を<sup>3</sup>H-thymidineやbromodeoxyuridine (BrdU)の長期間保有細胞(LRC)として捉える方法がある<sup>4</sup>。そこで我々はラットの顎下腺にBrdULRCを出現させたところ、介在部位導管と排出導管に存在する一部の(BrdU強陽性の)BrdULRCは未分化で腺房/導管細胞マーカーであるkeratin18(K18)と筋上皮細胞マーカーである $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA)が共に陰性であった<sup>5</sup>。さらに一方の顎下腺を摘出して残りの顎下腺のK18<sup>neg</sup> $\alpha$ SMA<sup>neg</sup>BrdULRCの分裂を促したところ、これらの細胞は幹細胞の特徴である非対称分裂を生じることが示された<sup>5</sup>。

#### 【引用文献】

1. Slack JMW: Stem cells in epithelial tissues. *Science* 287: 1431-1433, 2000
2. Jackson KA et al.: Stem cells: a minireview. *J Cell Biochem Suppl* 38: 1-6, 2002
3. Kishi T et al.: Clonal proliferation of multipotent stem/progenitor cells in the neonatal and adult salivary glands. *Biochem Biophys Res Commun* 340: 544-552, 2006
4. Potten CS et al.: Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. *J Cell Sci* 115: 2381-2388, 2002
5. Kimoto M et al.: Label-retaining cells in the rat submandibular gland. *J Histochem Cytochem* 56: 15-24, 2008

#### 2. 研究の目的

マウスの顎下腺を用いてLRC法で幹細胞を特定し、この細胞が特異的に発現する蛋白質を決定する。次にこの蛋白質をマーカーとして唾液腺幹細胞の分離が可能であることを確認する。

#### 3. 研究の方法

##### (1) BrdULRCの作製<sup>1</sup>

幼若マウスにBrdU (50mg/kg)を1日2回、3日連続で投与して発生中の顎下腺をラベルした。8週後に顎下腺を摘出し、4%パラフォルムアルデヒド固定パラフィン包埋標本と未固定凍結標本を作製した。組織切片を作製して抗BrdU抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。

##### (2) 幹細胞マーカーの免疫組織化学<sup>1</sup>

顎下腺の未固定凍結切片を作製し、4%パラフォルムアルデヒド固定を施した後、既知の幹細胞マーカーに対する抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。幹細胞マーカーはCD29、CD44、CD49f、CD117、CD133、laminin-1、Musashi-1、Sca-1を調べた。

##### (3) 唾液腺細胞の分離と培養<sup>2</sup>

10週齢の雌マウスの顎下腺をcollagenaseとhyaluronidaseで処理して唾液腺細胞を得た。得られた細胞はそのまま、あるいは磁気ビーズ法で分離してEGF、FGF-2、N2、insulinを含むDMEM/F2培地で浮遊培養を行った。細胞の分離は磁気ビーズ法で行い、lineage抗原(CD5、CD45R、CD11b、Gr-1、7-4、Ter-119)陽性(Lin<sup>pos</sup>)、Lin<sup>neg</sup>CD117<sup>pos</sup>、Lin<sup>neg</sup>CD117<sup>neg</sup>に分離した。

#### 【引用文献】

1. Kimoto M et al.: Label-retaining cells in the rat submandibular gland. *J Histochem Cytochem* 56: 15-24, 2008
2. Lombaert IM et al.: Rescue of salivary gland function after stem cell transplantation in irradiated glands. *PLoS One* 3: e2063, 2008

#### 4. 研究成果

(1) 当初ラットのプロトコールに従って生後10日齢からBrdUを投与したが、唾液腺のすべての構造にBrdU強陽性のBrdU<sup>hi</sup>LRCが多数出現した。マウスでは細胞分裂が盛んな時期はラットより先立つために非幹細胞内(transit amplifying cell)に取り込まれたBrdUの希釈が充分に行われなかったと考え、一方の顎下腺を摘出して残りの顎下腺の代償性肥大を誘発することによるBrdUの希釈を図ったが著しい改善は得られなかった。そこでBrdUの投与開始を生後1週からに変更したところBrdU<sup>hi</sup>LRCは著減した。変更後もマウスの顎下腺にはラットと同様のBrdU<sup>hi</sup>LRCが介在部導管に認められた(図1)。

介在部導管のBrdU<sup>hi</sup>LRCはラットではK18と $\alpha$ SMAが共に陰性であることから、腺房細胞・導管細胞・筋上皮細胞のどれにも分化していない未熟な細胞であることが示された。これに対してマウスのBrdU<sup>hi</sup>LRCは筋上皮細胞と腺房細胞への分化はみられないが

( $\alpha$ SMA<sup>neg</sup>aquaporin5<sup>neg</sup>)、導管細胞への分化は明らかではなかった。

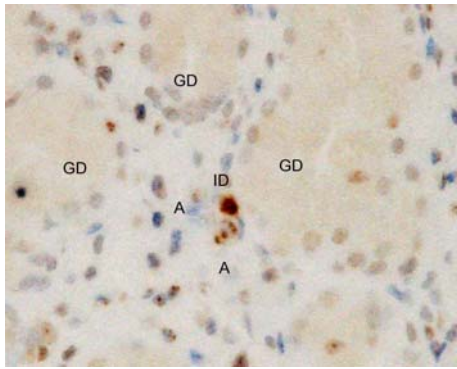


図 1. BrdU 免疫組織化学 (雄マウス)  
BrdU 強陽性の BrdU<sup>high</sup>LRC が介在部導管に存在する。A, 腺房；ID, 介在部導管；GD, 顆粒導管

(2) マウス顎下腺の幹細胞と思われる BrdU<sup>high</sup>LRC は介在部導管に存在したことから、介在部導管の幹細胞マーカーの発現を調べた。顎下腺の上皮細胞は CD29、CD44、CD49f、CD117 が陽性で、CD133、laminin-1、Musashi-1、Sca-1 は陰性であった。前者のうち介在部導管は CD29、CD49f、CD117 が陽性であり、CD117 が最も特異性が高かった (図 2、3)。

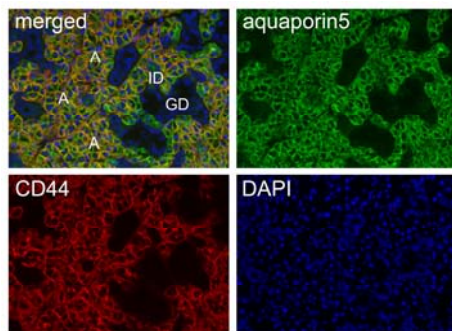


図 2. CD44 免疫組織化学 (雌マウス)  
CD44 は aquaporin5 陽性の腺房に局在する。A, 腺房；ID, 介在部導管；GD, 顆粒導管

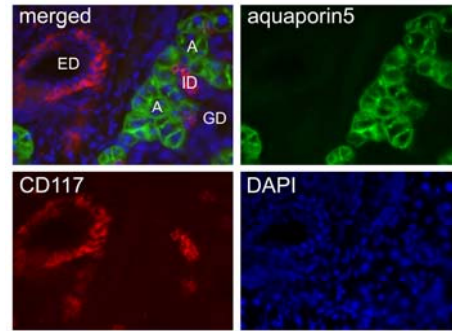


図 3. CD117 免疫組織化学 (雌マウス)  
CD117 は aquaporin5 陽性の腺房に隣接する介在部導管に見られる。A, 腺房；ID, 介在部導管；GD, 顆粒導管

(1) (2) よりマウスの顎下腺の介在部導管の細胞は BrdU<sup>high</sup>LRC であること、CD29、CD49f、CD117 といった幹細胞マーカーを発現することから、唾液腺の幹細胞と考えられた。

(3) マウスの顎下腺の介在部導管に存在する細胞が幹細胞の振る舞いをするかどうかを調べるために、マウスの顎下腺から CD117 陽性細胞を得て血清不含培地中で浮遊培養を行った。結果は分離前の細胞のみが幹細胞の特徴である球状の細胞塊である sphere を形成したのに対し (図 4)、Lin<sup>neg</sup>CD117<sup>pos</sup> 細胞をはじめ分離した細胞の全てが sphere を形成しなかった。これに関しては CD117 陽性の幹細胞が sphere を形成するためには、CD117 陰性の細胞すなわちニッチ細胞の存在が必要であると思われた。

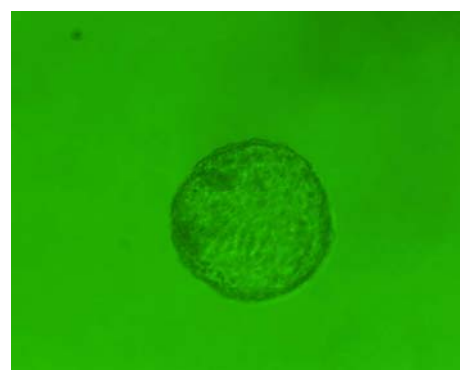


図 4. マウス顎下腺細胞の浮遊培養  
分離前の細胞のみが球状細胞塊である sphere を形成する。

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0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 裕三 (OGAWA YUZU)

大阪大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：10135725

(2) 研究分担者

佐藤 淳 (SATO SUNAO)

大阪大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号：70335600

村上 秀明 (MURAKAMI SYUMEI)

大阪大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：00263301