

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 17 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592530

研究課題名（和文） 新しいシェーグレン症候群モデルマウスにおける唾液腺再生と唾液分泌能の再獲得

研究課題名（英文） Salivary glands reproduction and reacquisition of saliva secretion ability on the new Sjögren's syndrome model mice.

研究代表者

大山 順子（OHYAMA YUKIKO）

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：70294957

研究成果の概要（和文）：

シェーグレン症候群モデルマウスにおける破壊された唾液腺の再生を目標とし、種々の臓器において自己複製能と多分化能を持つ side population cells (SP 細胞) を移入して唾液腺再生をめざしたが再生はできなかった。そのため胎仔マウスからの顎下腺器官培養条件を検討し、顎下腺器官培養や単一細胞化を行った顎下腺および周囲間葉組織から調整した細胞集合塊の培養系を確立した。さらにマウス腎被膜下に移植して、唾液腺組織の増殖も確認できた。これらの培養条件下で SP 細胞と供培養での SP 細胞の変化を観察している。

研究成果の概要（英文）：

We tried to reproduce salivary glands of Sjögren's syndrome model mice transferring side population cells (SP cells), but we could not do. We established the method to culture embryo salivary glands and confirmed the growth of these cells under the capsule of the kidney. We now observe the change of SP cells co-culturing with embryo tissue.

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	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
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・外科系歯学
キーワード： シェーグレン症候群、唾液腺再生

1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群 (SS) は初期症状として唾液腺や涙腺などの外分泌腺が特異的に障害される自己免疫疾患である。遺伝的要因、ウイルスや細菌感染が発症に関与しているという報告もあるが、その病因はいまだ解明されていない。病因の解明を行い根治的かつ選択的な治療法を確立することは必須であるが、乾燥症状などに対する対症療法の確立も患者の QOL の改善のためには必要である。

本研究代表者の大山は新しい SS モデルマウスを確立した。この SS モデルは SLE 自然発症マウス NZM2328 にマウスサイトメガロウイルスを感染させることにより SS に極めて類似した病態を発症するという、もので、実際の自己免疫疾患に非常に近い状態のモデルマウスと考えている (Ohyama et al. J Immunol 2006)。

また、近年再生医療が注目されているが、種々の臓器において自己複製能と多分化能を持つ組織幹細胞が DNA 結合蛍光色素の Hoechst3334 の流出能を持つ side population cells (SP 細胞)と呼ばれる細胞分画として単離可能となった。唾液腺に関しても SP 細胞の同定ができるようになり、われわれの研究室でもこの細胞の分離同定を行ってきた。

美島らはマウス唾液腺由来の SP 細胞を放射線障により唾液の分泌が減少した唾液分泌障害マウスに移入することより有意の分泌量の改善が認められると報告しており、SP 細胞の唾液分泌能の改善に対する効果が期待された。

2. 研究の目的

上記の背景から、SS 患者の治療を最終目的とし、SS モデルマウスにおいて唾液分泌能を再獲得するため、同モデルにおける SP 細胞の自己複製能と多分化能の効果を確認することを目的とした。

3. 研究の方法

1) SP 細胞の分離

6 週齢、オスの C57BL/6 マウスから唾液腺 (顎下腺) を摘出しコラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼにて分散化後、トリプシン処理を行い、Hoechst33342 存在下で培養し、その後 FACS で SP 細胞分画を分離採取した。

2) 胎仔マウスからの顎下腺器官培養

妊娠 13.5 日マウスから胎仔マウスを摘出し、①この胎仔顎下腺の小葉 10 個を含む組織片に細切し、ポアサイズ $0.4\mu\text{m}$ のフィルター上に静置 (顎下腺器官培養)、②周囲間葉組織を含んだ顎下腺組織をコラゲナーゼ I、トリプシン EDTA、DNaseI で処理して単一細胞化を行い、この細胞浮遊液を上述のフィルター上のコラーゲンゲル内に滴下して細胞集合塊を形成 (細胞集合塊器官培養) を作成した。下層に培地 (10% 胎仔ウシ血清添加 DMEM) を入れた 6 穴プレートにこれら ①、②のフィルターを静置して器官培養を行った。

3) 胎仔マウス顎下腺と SP 細胞の共培養

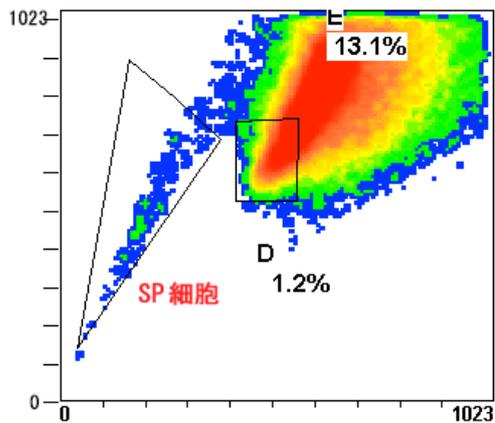
1) で分離した SP 細胞を上記胎仔マウスの細胞集合塊の器官培養系と同様の培養系を用いて培養した。ただし、SP 細胞単独と妊娠 13.5 日胎仔

マウスの顎下腺周囲間葉組織と共培養する系の2種類の細胞集合塊を作成して培養を行った。

4. 研究成果

1) SP 細胞の分離

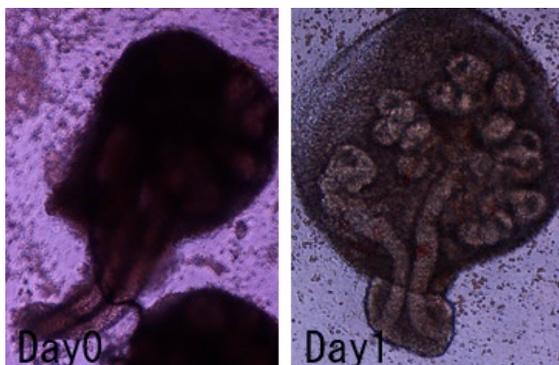
上記方法を用いて SP 細胞の分離する手技を確立した(図1)。なお、レセルビン処理でこの分画が消失することも確認した。



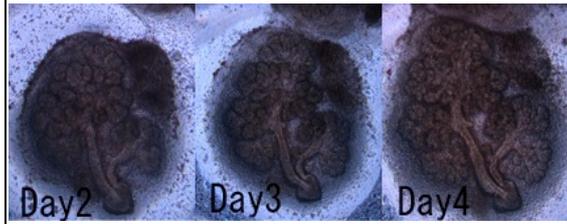
(図1)

2) 胎仔マウスからの顎下腺器官培養

妊娠13.5日マウスから胎仔マウスを摘出し、この胎仔顎下腺の組織片の器官培養を行った。この条件下においては培養開始12時間(Day0)から次第に顎下腺組織の分化が進み、分枝形成、細胞増殖が培養7日目まで継続し、in vitroでの顎下腺形成が確認された。(図2、図3)。

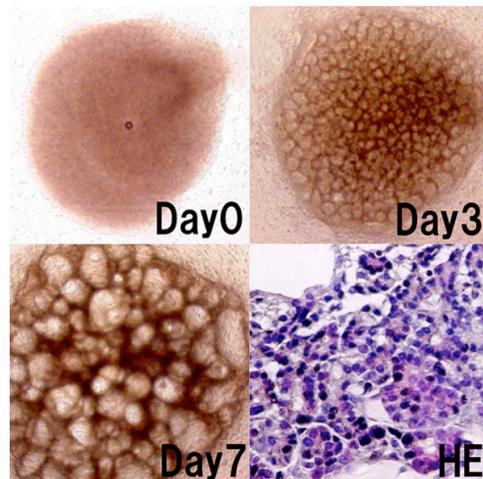


(図2: 強拡大)



(図3: 弱拡大)

次に単一細胞化を行った顎下腺および周囲間葉組織から調整した細胞集合塊の培養では、マトリゲルに比べてコラーゲンゲル内に細胞集合塊を作成した方が細胞集合塊の分化・発育は促進され、さらにコラーゲンゲル内にフィブロネクチンを添加すると空胞化が減少し、小葉数が増加し、小葉は腺腔を形成するなどより腺組織の形態を示すようになっていた。図4にコラーゲンゲル(単独)内に細胞集合塊を作成した器官培養の経時的変化およびHE染色像を示す。



(図4)

さらに興味深いことに、この培養系では顎下腺周囲間葉組織を含んだ単一細胞塊の方が周囲間葉組織を含まないほぼ顎下腺細胞のみの単一細胞塊に比べて腺組織の発育、形態形成などが優れており、を共培養しないと顎下腺は十分発育せず、周囲組織との共存が顎下腺の分化発育には必要であると考えられた。

また、これら顎下腺器官培養、細胞集合塊器官培養両系で1日培養した後、マウス腎被膜下に移植すると培養系に比べて大きく移植した顎下腺や細胞集合塊が増殖した。

3) 胎仔マウス顎下腺と SP 細胞の共培養

このように唾液腺への分化能を持つ胎仔マウス顎下腺やその単一細胞塊からの器官培養系が確立できた。もし唾液腺から分離した SP 細胞が多分化能を有しているとする、この系での分化も可能と考えた。また、唾液腺周囲組織の唾液腺の分化発育の場の提供という環境を利用することを考え、胎仔顎下腺および周囲組織または胎仔顎下腺周囲組織と SP 細胞をコラーゲンゲル内で共培養して SP 細胞の変化を観察している。

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1件)

Shimizu M, Moriyama M, Okamura K, Kawazu T, Chikui T, Goto TK, Ohyama Y, Nakamura S, Yoshiura K. : Sonographic diagnosis for Mikulicz disease. : ***Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*** : 108(1) 105-113 2009

[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]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大山 順子 (OHYAMA YUKIKO)
九州大学・大学院歯学研究院・助教
研究者番号 : 70294957

(2) 研究分担者

藤井 潤 (FUJII JUN)
九州大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号 : 60271441

中村 誠司 (NAKAMURA SEIJI)
九州大学・大学院歯学研究院・教授
研究者番号 : 60189040

(3) 連携研究者

なし