

## 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 25 年 6 月 12 日現在

機関番号：42697

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22592056

研究課題名（和文） 唾液腺組織幹細胞の同定と唾液分泌細胞への分化遺伝子の解明

研究課題名（英文） Identification of the salivary gland stem cells and elucidation of gene in the stem cells to differentiate into functional acinar cells

研究代表者

池田 利恵 (IKEDA RIE)

日本歯科大学東京短期大学・歯科衛生学科・教授

研究者番号：50168150

研究成果の概要（和文）：

ラット耳下腺主導管結紮による損傷からの再生過程において、幹細胞を検出するための免疫組織化学染色に陽性を示す細胞が、導管様構造物中に一過性に多数出現した。唾液腺組織幹細胞は、唾液腺再生過程の初期に出現し、導管様構造物を形成することが明らかとなった。また、組織幹細胞で構成された導管様構造物の周囲には、多数の交感神経の出現が一過性に認められたことから、組織幹細胞による耳下腺組織再生の初期には、交感神経が関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

During regeneration after ductal obstruction of Stensen's duct, many stem cells were observed in the duct-like structures in the rat parotid gland. Regeneration of the parotid gland occurs rapidly through an appearance of stem cells. Temporarily increase in sympathetic nerves was recognized around the duct-like structures. These results suggest that the sympathetic nerves play an important role in regeneration of rat parotid glands.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
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、腺房細胞、交感神経

## 1. 研究開始当初の背景

唾液は消化、口腔衛生状態の保持、口腔粘膜の保護および口腔疾患の予防など、健康な生活を営む上で極めて重要な役割を担っている。唾液分泌量は、加齢、疾病、ストレスおよび薬物の副作用などの要因により減少し、その結果、口腔乾燥症罹患者が増加して

いる。口腔乾燥症に対する治療は、症状の緩和を目的とした対症療法が中心であり、唾液の分泌を増加させる根本的な治療法はいまだに確立されていない。

現在までの唾液腺に関する研究の多くは、発生初期の分枝形成や分泌機能、あるいは傷害時の組織構造の変化に関する報告が主で

あり、未熟な細胞から唾液分泌を行う腺房細胞への分化機序については、いまだ不明な点が多い。われわれは、近年、唾液腺組織幹細胞の局在部位と予測される、介在部導管細胞のラット耳下腺における動態について報告した。耳下腺の発生期においては、介在部の細胞は、未熟な腺房中に、腺房細胞と混在して存在した。その後、耳下腺の発達に伴い、介在部の細胞は移動して、唾液を輸送する導管の起始部として、腺房に接して存在するようになった。介在部の細胞は唾液腺組織幹細胞と考えられているが、詳細な機能や腺房細胞への分化機序などについては明らかにされていない。そこで、三大大唾液腺の中でも介在部が最も発達している耳下腺を用いて、唾液腺の組織幹細胞を同定し、組織幹細胞から腺房細胞へと分化する際に発現する遺伝子を特定することを、研究課題として選択した。この課題が解明されることにより、上記に掲げた種々の因子により発症する口腔乾燥症の治療法の確立に繋がるとともに、再生医療実現の基盤を築くための一助になると考えた。

## 2. 研究の目的

唾液は口腔の健康を維持し、健康な生活を営む上で、極めて重要な役割を担っている。近年、唾液分泌の減少を訴える、口腔乾燥症罹患が増加している。口腔乾燥症に対する治療は対症療法が中心であり、唾液を分泌する細胞を増加させるなどの根本的な治療法は、いまだに確立されていない。

本研究の目的は、唾液を分泌する腺房細胞へ分化することが可能な、唾液腺組織幹細胞の局在部位を同定し、組織幹細胞から腺房細胞への詳細な分化機構を解明することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 耳下腺の採取、試料作製および形態観察

① 生後10週齢のWistar系雄性ラットを使用した。麻酔下で経時的に耳下腺を摘出し、光学顕微鏡観察のための試料作製を行った。

② 得られた試料に対して、ヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色を施し、形態観察を行った。

### (2) 免疫組織化学染色

本研究で実施した免疫組織化学染色は、脱パラフィン後、以下の手順で行った。全ての過程は室温で行い、各ステップの終了後、リン酸緩衝食塩水にて洗浄した。

① 内因性peroxidase阻害のため、0.3%過酸化水素加純メタノールに30分間浸漬した。

② 非特異反応阻害のため、正常ヤギ血清に30分間反応させた。

③ 第一抗体を添加し、2時間反応させた。

④ 第二抗体 (ヒストファイブ シンプルステインラットMAX-PO(MULTI)、ニチレイ) を添加し、30分間反応させた。

⑤ ジアミノベンチジン・過酸化水素発色液に浸漬し、5~10分間反応させた。

⑥ Mayerヘマトキシリンで核染色を施した。

(3) ラット耳下腺腺房細胞の同定のための抗amylase抗体を用いた免疫組織化学染色

(1)-①で作製した試料に対して、漿液細胞の特異的マーカーである抗amylase抗体を第一抗体として用いた免疫染色を施した。

(4) ラット耳下腺幹細胞の同定のための抗stem cell antigen-1 (Sca-1) 抗体を用いた免疫組織化学染色

(1)-①で作製した試料に対して、幹細胞の特異的マーカーであるSca-1に対する抗体を第一抗体として用いた免疫染色を行った。

(5) ラット耳下腺幹細胞の同定のための抗Musashi-1抗体を用いた免疫組織化学染色

(1)-①で作製した試料に対して、幹細胞の特異的マーカーであるMusashi-1に対する抗体を第一抗体として用いた免疫染色を行った。

(6) bromodeoxyuridine (BrdU) 投与と抗BrdU抗体を用いた免疫組織化学染色

① BrdU (50  $\mu$ g/g 体重) を1日2回、3日間連続で投与した。最終投与の翌日と4週間後に耳下腺を採取し、光学顕微鏡観察のための試料作製を行った。

② 幹細胞と考えられている、BrdUを長期間保持する細胞: label-retaining cell (LRC) を検出するために、抗BrdU抗体を第一抗体として用いた免疫染色を施した。

(7) ラット耳下腺主導管の結紮と耳下腺の採取、試料作製

① 生後10週齢のWistar系雄性ラットの耳下腺の右側主導管を結紮した。1週間後、導管結紮を解除し、解除直後から経時的に右側の耳下腺を採取し、光学顕微鏡観察のための試料作製を行った。なお、左側の耳下腺をコントロールとした。これらの試料を用いて、②、③の染色を施し、観察を行った。

② H-Eとperiodic acid Schiff (PAS) 染色

③ 免疫組織化学染色 (使用した第一抗体)  
・ 漿液細胞に特異的な抗amylase抗体  
・ 幹細胞に特異的な抗Sca-1抗体と抗Musashi-1

- ・交感神経に特異的な抗 tyrosine hydroxylase (TH) 抗体
- ・交感および副交感神経に特異的な抗 neuropeptide Y (NPY) 抗体
- ・細胞増殖のマーカーである proliferating cell nuclear antigen (PCNA) に対する抗体

(8) ラット耳下腺幹細胞から腺房細胞への分化遺伝子の検出

耳下腺の主導管を結紮し、1週間後に結紮を解除して再生過程にあるラット耳下腺からRNAを抽出し、無処置のラット耳下腺から抽出したRNAとの比較検討を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) ラット耳下腺の形態学的特徴

H-E染色標本の観察により、ラット耳下腺の小葉内には、漿液性腺房、介在部、線条部とそれらを取り囲む少量の結合組織がみられた。漿液性腺房を構成する漿液細胞は球形の核を持ち、核上部にはエオジンに好染する分泌顆粒が認められた。介在部は腺房の周囲にみられ、単層立方上皮により構成されていた。線条部は単層円柱上皮により構成され、基底部にはエオジンに淡染する基底線条が観察された。

##### (2) ラット耳下腺の抗amylase抗体による免疫組織化学染色

漿液細胞の特異的なマーカーである、抗amylase抗体を用いた免疫染色を行った結果、陽性部位は、腺房を構成する漿液細胞の核上部に局在しており、ほぼすべての腺房細胞が良好に染色された。ラット耳下腺の腺房は、amylaseを含む分泌顆粒を有する漿液細胞で構成されることが確認された。

##### (3) ラット耳下腺における組織幹細胞の局在

###### ① 抗Sca-1抗体を用いた免疫組織化学染色

幹細胞の特異的なマーカーである、抗Sca-1抗体を用いた免疫染色を行った結果、陽性を示す細胞の数は極めて少なく、少数の介在部の細胞が弱い陽性を示した。

###### ② 抗Musashi-1抗体を用いた免疫組織化学染色

幹細胞の特異的なマーカーである、抗Musashi-1抗体を用いた免疫染色を行った結果、陽性反応は介在部に認められた。

###### ③ label-retaining cell (LRC) の検出

DNA合成期の細胞に特異的に取り込まれるBrdUを長期間保持する細胞：LRCを検出する手法を用いて、ラット耳下腺の組織幹細胞の同定を試みたが、BrdUを長期間保持する細胞

は極めて少なく、この手法によって幹細胞の局在部位を同定するには至らなかった。

今後、酵素標識ポリマー法を用いることで免疫組織化学染色の感度の向上を図り、LRCを検出する予定である。

①、②の結果から、ラット耳下腺の組織幹細胞は、介在部に局在することが明らかとなった。

##### (4) ラット耳下腺の再生過程

###### ① 形態学的特徴

H-E染色標本の観察結果から、導管結紮解除直後の耳下腺では、大部分の腺房が消失し、残存した腺房は萎縮していた。また、導管様構造物が多数出現した。萎縮した腺房と導管様構造物は、増加した結合組織に取り囲まれていた。萎縮した腺房では、腺房細胞に含まれるエオジンに染まる分泌顆粒は著しく減少し、導管様構造物の細胞には分泌顆粒は観察されなかった。導管結紮解除後1週以降、耳下腺は徐々に再生し、結紮解除後2週には、小葉は多数の腺房で占められ、腺房細胞の分泌顆粒はエオジンに好染するようになった。しかし、新たに出現した腺房の一部に、腺房細胞の配列が乱れ、大きさが増した腺房が観察された。

PAS染色標本の観察結果から、導管結紮解除直後の耳下腺では、PAS陽性を示す腺房細胞の分泌顆粒は大部分が消失し、萎縮した腺房の一部にわずかにみられるのみとなった。耳下腺の再生とともに、PAS陽性の分泌顆粒を有する腺房細胞が新たに出現し、結紮解除後2週には、腺房細胞の核上部はPAS陽性の分泌顆粒が占めるようになった。

###### ② 抗amylase抗体による免疫組織化学染色

導管結紮解除直後の耳下腺では、amylase抗体に陽性を示す腺房細胞は大部分が消失し、萎縮した腺房の一部にわずかにみられるのみであった。耳下腺の再生とともに、amylase抗体陽性の分泌顆粒を有する腺房細胞が徐々に増加したことから、新たに出現した腺房細胞のamylase産生の機能が回復したことが明らかとなった。

###### ③ 組織幹細胞の局在

導管結紮解除直後の耳下腺では、Sca-1とMusashi-1抗体に陽性を示す細胞が多数出現し、導管様構造物を構成した。これらの陽性細胞は耳下腺の再生とともに減少して行き、結紮解除後2週には、正常な耳下腺と同様に、介在部に局在するようになった。この結果から、耳下腺の再生過程の初期に幹細胞が一過性に出現し、耳下腺組織の修復に働くことが示唆された。

#### ④ 細胞増殖能の変化

ラット耳下腺の細胞増殖活性は、離乳期以降、急激に減少するといわれている。本研究でも、正常なラット耳下腺を構成する腺房細胞と導管の細胞で、proliferating cell nuclear antigen (PCNA)抗体に陽性を示す細胞は少なく、増殖活性が低いことが明らかとなった。しかし、導管結紮解除直後の耳下腺では、多数のPCNA抗体陽性細胞が導管様構造物と腺房に出現したことから、細胞増殖活性の上昇が耳下腺再生の一因であることが明らかとなった。

#### ⑤ 交感神経の分布の変化

tyrosine hydroxylase (TH)は、チロシンをジヒドロキシフェニルアラニン (DOPA)に合成する酵素である。DOPAは、交感神経の伝達物質であるノルアドレナリンとアドレナリンの前駆体である、dopamineの前駆体であることから、本研究において、THに対する抗体を、交感神経に対する特異的なマーカーとして使用した。

正常なラット耳下腺では、TH陽性を示す交感神経は腺房、導管、血管の周囲にわずかに認められた。主導管結紮を行ったラット耳下腺では、導管結紮解除直後に、導管様構造物の周囲に多数のTH陽性線維が出現した。耳下腺の再生に伴い交感神経は徐々に減少し、結紮解除後3週では、正常耳下腺との間で違いは認められなかった。この結果から、交感神経は耳下腺再生の初期に一過性に出現し、再生の進行に伴い減少することが明らかとなった。

今後、交感神経の増加と耳下腺の再生との関係を明らかにするために、主導管結紮解除後の再生過程において交感神経を遮断し、耳下腺再生にどのような影響が生じるかを検討する予定である。

#### ⑥ 交感神経と副交感神経の分布の変化

neuropeptide Y (NPY)は、中枢と末梢の神経組織に広く分布する神経伝達物質である。以前は、NPYが交感神経においてノルアドレナリンと共存していることから、交感神経のマーカーとみなされていた。しかし、詳細な研究が進み、交感神経のみならず一部の副交感神経にNPYが存在することが明らかとなったことから、本研究において、NPYに対する抗体を、交感神経と副交感神経に対するマーカーとして用いた。

正常なラット耳下腺では、NPY抗体に陽性を示す神経の大部分は血管の周囲に集中しており、腺房の周囲には、NPY抗体陽性を示す神経がわずかに認められるのみであった。主導管結紮を行ったラット耳下腺においても、NPY陽性神経は血管周囲に集中し、再生

の過程の全ての時期において、正常耳下腺との間で違いは認められなかった。

NPYは交感神経と一部の副交感神経に存在するが、過去の報告から、耳下腺内のNPY線維の多くは、副交感神経由来であると言われている。今回の結果から、主導管結紮後の耳下腺再生過程において、副交感神経の分布には変化が生じないことが示唆された。

#### (5) ラット耳下腺腺房細胞への分化遺伝子の検出

主導管結紮による損傷からの再生過程にあるラット耳下腺と、無処置の正常ラット耳下腺からRNAを抽出した。幹細胞が多数出現すると考えられる、結紮解除直後の耳下腺と、幹細胞が極めて少ない正常耳下腺のRNAを比較検討したが、幹細胞から腺房細胞への分化遺伝子の特定には至らなかった。

今後、リアルタイムPCR装置など、他の高感度な実験系を検討する予定である。

#### 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 2 件)

- ① Rie Ikeda, Morphological and Histochemical Changes in the Parenchyma of the Rat Parotid and Sublingual Glands with Growth and Aging, Journal of Oral Biosciences, 査読有, Vol. 53, No. 4, 2011, pp. 289-297
- ② Shigeo Aiyama, Kenichiro Kikuchi, Kiyomi Takada, Rie Ikeda, Sumie Sato, Junya Kuroki, Immunohistochemical Study of the Lymphatic Vessels in Major Salivary Glands of the Rat, Okajimas Folia Anatomica Japonica, 査読有, Vol. 87, No. 4, 2011, pp. 177-180

[学会発表] (計 3 件)

- ① Rie Ikeda, Distribution of Autonomic Nerves in Rat Parotid Gland during Regeneration, International Association for Dental Research, 2013年3月22日、シアトル、アメリカ
- ② Kenichiro Kikuchi, Immunohistochemical Study of Lymphatic Vessel Development of Early Postnatal Rat Salivary Gland, 2012 Sino-Japan Dental Conference, 2012年4月27日、成都、中国
- ③ 池田利恵, 発育と加齢に伴うラット唾液腺分泌部実質細胞の形態および性状変化、第52回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、2010年9月20日、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 利恵 (IKEDA RIE)

日本歯科大学東京短期大学・歯科衛生学  
科・教授

研究者番号：50168150

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

菊池 憲一郎 (KIKUCHI KENICHIRO)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：80267260