

## 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15日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659371

研究課題名（和文） 唾液腺幹細胞の分離と組織ニッチによる唾液腺再生法の開発

研究課題名（英文） Isolation of salivary gland stem cells and establishment of salivary gland regeneration method with tissue niche.

研究代表者

杉浦 剛 (SUGIURA TSUYOSHI)

九州大学・大学病院

研究者番号：40322292

研究成果の概要（和文）：

胎生期の組織を用いた研究は、組織再生のメカニズムを知る手がかりとなる。我々は、胎生期組織から細胞を分離し、*in vitro* で再構成させるモデルを開発し、組織学的に観察した。

胎齢 13.5 日の胎仔マウスより顎下腺を摘出し、単一分離した細胞を高濃度で I 型コラーゲンゲルやマトリゲル中に滴下しフィルター上で培養したところ、細胞塊より分枝形成、続いて管腔形成が観察できた。組織中の小葉では PAS 染色にて粘液の産生が確認され、免疫組織化学ではアクアポリン 5 の局在を認めたことにより、構造物は正常組織の Terminal Bud Stage 相当まで分化可能であることが示された。また、コラーゲンゲル中にフィブロネクチンを滴下することで、管腔形成は抑制され、分枝形成が促進された。抗インテグリン  $\alpha 2$  中和抗体を添加すると、管腔の空洞化、肥大化が抑制された。一方、抗インテグリン  $\alpha 5$  中和抗体を添加すると、管腔の空洞化、肥大化が抑制された。単一化細胞を腎被膜下に移植しても細胞塊は組織構築を示した。

この培養系では、胎生期の顎下腺細胞はその構造を再構築する機能を持ち、胎生期の唾液腺分化過程をある程度再現できることが示され、この方法は組織再生の過程を考察するのに有効な手段の一つであると考えられた。さらに、細胞外基質蛋白およびその受容体蛋白の調節が再構築に重要であることから唾液腺幹細胞と間葉系細胞の相互作用の重要性が示唆される。近年、組織構築における上皮間葉移行の重要性が明らかにされ、その制御遺伝子・蛋白である Brachyury の関与が報告されている。そこで胎生期唾液腺の正常分化におけるその発現を検討した。胎齢 13.5 日の唾液腺原器では Brachyury の高発現が認められたが次第に発現が減弱した。このことから唾液腺組織構築における上皮間葉移行の関与と Brachyury による制御の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Establishment of tissue engineering techniques for organ regeneration is important and urgent issue for reconstructive medicine, but few studies have tried to regenerate salivary gland. We demonstrated the capability of regeneration of E13.5 embryonic submandibular gland cells (eSGCs) *in vitro* in collagen type I gel, and the structure was similar to the native salivary gland. Aquaporin 5 (AQP5) was constitutively expressed in acinar cells of regenerate salivary gland without any characteristic

localization. In contrast, AQP5 expressed in acinar cells localized with fine dense concentration in the lumen side of the acinar structure in E18.5 salivary gland. By addition of fibronectin into regenerate salivary gland, the expression and localization of AQP5 was changed which was quite similar to that of native salivary gland. In regenerated salivary gland, large lumen like structures appeared from day7, and the structure enlarged and increased in number in day14. To investigate the participation of integrins in salivary gland development, we applied function-perturbing antibodies to integrin  $\alpha$  subunit to regenerate salivary gland model. Addition of anti- $\alpha$ 2 integrin antibody clearly inhibited lumen formation and enlargement in regenerate salivary gland, and induce compartmentalization of acinar cells. In contrast, other anti-integrin antibodies, especially anti- $\alpha$ 5 integrin antibody induced lumen formation and enlargement. Together, these data show that eSGCs are able to regenerate salivary gland structure and specific interactions between integrins and extra cellular matrices are essential for regenerate salivary gland differentiation and development.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1500000	0	1500000
2011年度	1300000	390000	1690000
年度			
年度			
年度			
総計	2800000	390000	3190000

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：口腔外科学一般

#### 1. 研究開始当初の背景

口腔領域において唾液腺は唾液の分泌を介して咀嚼嚥下・衛生状態の維持・消化機能の補助をになっている重要な腺組織である。シェーグレン症候群における唾液腺の障害や、口腔癌の治療における放射線治療・切除によってその機能は大きく障害を受け、口腔乾燥症状を訴える患者は増加している。

しかしながら唾液腺の障害・喪失に対する治療法は非常に限られており、近年登場した塩化セビメリンなどの分泌促進剤も破壊が進んだ唾液腺に対しては十分な効果が得られていない。一方で医療における再生医療の位置づけは年々重要となっており、種々の臓器の再

生の試みが報告されているが、唾液腺の再生の試みは遅れていると言わざるを得ない。国内外の報告でも唾液腺の分化・形態形成の検討が中心に行われており、再生を試みた研究も散見するもののいずれも実用に至るものではない。

われわれの研究室ではマウス胎生期の唾液腺より顎下腺を分離し、器官培養法により増殖分化を誘導するテクニックを用いて唾液腺の形態形成に関わる因子とその機能について検討してきた (Ikari T, Hiraki A, Seki K, Sugiura, T, Matsumoto K, Shirasuna K. Involvement of hepatocyte growth factor in

branching morphogenesis of murine salivary gland. Dev Dyn 228: 173-184, 2003)。その結果HGFをはじめとする増殖因子が唾液腺の分枝形成に大きく寄与すること、細胞外基質の存在の重要性を見出した。同様の所見は海外のグループからも報告されている。

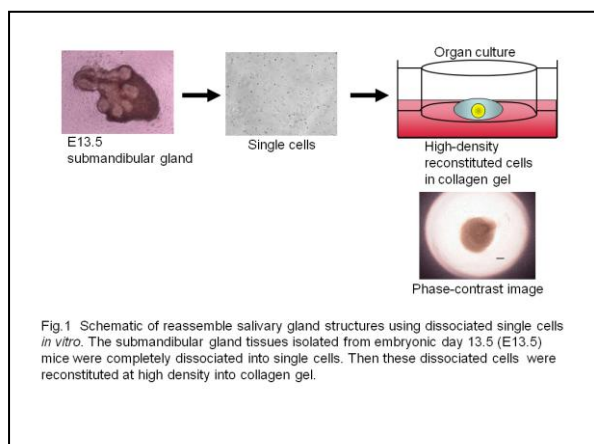
## 2. 研究の目的

唾液腺の再生医療を実現するために唾液腺幹細胞の分離を行い、唾液腺の再生法を確立する。さらに、組織の再構築における組織ニッチの存在が必要であることが明らかになってきているため組織ニッチを用いた幹細胞の分化誘導、唾液腺再構築を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 唾液腺原器および成獣マウス唾液腺の細分化による唾液腺再構築の検討

胎児マウスの唾液腺原器を酵素分解により単一細胞化し、これを精製細胞外基質中に埋入し、器官培養と同様のテクニックにより培養した。



①唾液腺原器および成獣マウス唾液腺の部位別細分化による責任細胞の所在の同定

②上皮間葉分離によるニッチとしての間葉組織の特性解析

### (2) 唾液腺幹細胞の分化にかかわる分子の同定

定

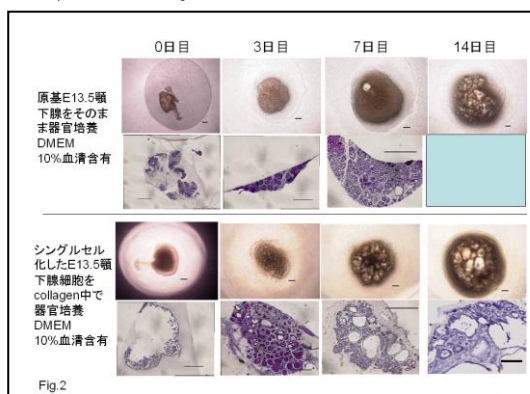
唾液腺幹細胞の分化における上皮間葉移行の関与を上皮間葉移行に関与する分子を唾液腺原器において検索することによって責任分子の同定を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 唾液腺原器および成獣マウス唾液腺の細分化による唾液腺再構築の検討

胎生期の組織を用いた研究は、組織再生のメカニズムを知る手がかりとなる。我々は、胎生期組織から細胞を分離し、*in vitro* で再構成させるモデルを開発し、組織学的に観察した。

胎齢 13.5 日の胎仔マウスより顎下腺を摘出し、単一に分離した細胞を高濃度で I 型コラーゲンゲルやマトリゲル中に滴下しフィルター上で培養したところ、細胞塊より分枝形成、続いて管腔形成が観察できた。組織中の小葉では PAS 染色にて粘液の産生が確認され、免疫組織化学ではアクアポリン 5 の局在を認めたことにより、構造物は正常組織の Terminal Bud Stage 相当まで分化可能であることが示された。また、コラーゲンゲル中にフィブロネクチンを滴下することで、管腔形成は抑制され、分枝形成が促進された。抗インテグリン  $\alpha 2$  中和抗体を添加すると、管腔の空洞化、肥大化が抑制された。一方、抗インテグリン  $\alpha 5$  中和抗体を添加すると、管腔の空洞化、肥大化が抑制された。単一化細胞を腎被膜下に移植しても細胞塊は組織構築を示した。



(2) 唾液腺幹細胞の分化にかかわる分子の同定

この培養系では、胎生期の顎下腺細胞はその構造を再構築する機能を持ち、胎生期の唾液腺分化過程をある程度再現できることが示され、この方法は組織再生の過程を考察するのに有効な手段の一つであると考えられた。さらに、細胞外基質蛋白およびその受容体蛋白の調節が再構築に重要であることから唾液腺幹細胞と間葉系細胞の相互作用の重要性が示唆される。近年、組織構築における上皮間葉移行の重要性が明らかにされ、その制御遺伝子・蛋白である **Brachyury** の関与が報告されている。そこで胎生期唾液腺の正常分化におけるその発現を検討した。胎齢 13.5 日の唾液腺原器では **Brachyury** の高発現が認められたが次第に発現が減弱した。このことから唾液腺組織構築における上皮間葉移行の関与と **Brachyury** による制御の可能性が示唆された。

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)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉浦 剛 (SUGIURA TSUYOSHI)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：40322292

(2) 研究分担者

白砂 兼光 (SHIRASUNA KANEMITSU)

広島大学・医歯(薬)学総合研究科・特任教授

研究者番号：30093420

(3) 連携研究者

なし