

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 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791999

研究課題名（和文） 放射線照射後ヒト唾液腺における幹/前駆細胞の分離とその特性解析

研究課題名（英文） Analysis of stem/progenitor cell in human irradiated salivary gland

研究代表者

佐藤 有紀（SATO YUKI）

横浜市立大学・医学研究科・共同研究員

研究者番号：60573277

研究成果の概要（和文）：

放射線照射ヒト唾液腺細胞およびヒト唾液腺癌細胞株を用いて、唾液腺幹細胞の検討を行った。放射線照射組織では安定した結果が得られなかった。唾液腺癌細胞では、唾液腺細胞マーカーの発現が再増殖に伴って確認された。さらに侵襲時のヒト唾液腺細胞への影響の検討を行ない、侵襲下では唾液腺の防御反応が発生し、幹/前駆細胞が反応しているものと考えられ、アミラーゼ活性が唾液腺幹/前駆細胞の活動動態を密接に関与していることが考えられた。

研究成果の概要（英文）：

The salivary gland stem/progenitor cells were examined using the irradiated human salivary gland cells and human salivary-glands cancer cell line. In the irradiated-salivary gland tissue, salivary gland stem cell was not isolated stably. Salivary gland cancer cell line showed proliferation with re-multidifferentiation. Furthermore, the salivary-glands amylase activity at the time of invasion was measured immunohistologically, salivary-glands amylase activity went up at the time of invasion, indicating that amylase activity was involving closely the activity dynamic state of a salivary-glands stem/progenitor cell.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学・再生歯学

キーワード：唾液腺・放射線・幹細胞

1. 研究開始当初の背景

ヒト唾液腺組織を用いた再生医学的研究では、唾液腺再生よりも、膵臓あるいは肝臓再生のために採取が容易である唾液腺組織が応用されている状況である。すなわち、唾

液腺組織の多分化能は *in vitro* 試験にて確認されており、唾液腺組織が再生医療に通じるアイテムとなることが予見されている。しかしながら、唾液腺組織そのものの再生研究は十分進んでいるとは言えず、これまでもラ

ットなどの小動物において、唾液腺幹/前駆細胞培養によって唾液腺類似の管腔構造の組織が形成されるといった報告が散見されるのみである。唾液腺組織は導管細胞、腺房細胞、筋上皮細胞から成るが、低密度培養によって、これら3種類の細胞への分化までをヒト検体において証明したのは申請者らの報告が初めてである。すなわち申請者はまず正常唾液腺臨床検体より細胞を分離し、コロニーアッセイ法を用いて幹/前駆細胞の分離・培養を試みたところ、血清含有培地を用いた後に無血清培地に培地交換を行う手法で、低密度培養即ち単細胞からのコロニー形成が観察できる培養系を樹立した。本培養系を用いて分離された細胞にはコロニー形成後、RT-PCR及び免疫組織学的染色により唾液腺組織を構成する腺房・導管・筋上皮細胞への分化を示した。続いて放射線照射後の唾液腺臨床検体に確立したアッセイ系を用いたところ、やはりコロニー形成が認められ、さらに腺房・導管・筋上皮細胞への分化を示した。また、得られたコロニーを再び分離・培養したところ、高頻度のコロニー形成を認めた。以上の結果から、ヒト唾液腺組織には高い増殖能、多分化能および自己複製能を有する唾液腺幹/前駆細胞が存在し、これらは放射線照射後であっても生存し続けるということを先駆けて実証した。

2. 研究の目的

申請者が確立した放射線照射ヒト唾液腺検体を用いた低密度コロニーアッセイ法によって被照射唾液腺が再度、唾液腺構成細胞への分化をしていくための要因をサンプル毎の組織障害の程度、放射線量、患者個人の特性などから検討した。

3. 研究の方法

(1) ヒト唾液腺細胞の分離

ヒト唾液腺臨床検体を氷上にて10% DMEM/F12に浸しながら組織を細切し、その後組織片をMillex(0.22 μ) (MILLIPORE)でろ過滅菌したコラゲナーゼ(新田ゼラチン) 0.07% /0.05%trypsin-EDTA(GIBCO)に移し、ピペッティングを行った後、37 $^{\circ}$ Cで90分消化を行う。その後セルストレイナー(40 μ m) (BDFalcon)でろ過した細胞懸濁液を遠心(1300rpm、4 $^{\circ}$ C、3分間)、上澄を取り除き、細胞は10%血清含有DMEM/F12にて洗浄し、トリパンブルー染色によって、細胞の生存率が85%以上であることを確認した後に培養。

(2) ヒト唾液腺細胞の培養

ヒト唾液腺臨床検体由来の細胞を35mm培養ディッシュを用い300cells/cm²の低密度にて、血清添加培地(10%ウシ胎児血清添加のDMEM/F12培地)中に播種し、2日間培養を行う。2日後に培地を無血清培地(CnT-24)へ交換を行い、さらに培養。

(3) 唾液腺組織標本の作製

得られた顎下腺を1cm³程度に切り出し、2%パラホルムアルデヒド(PFA)(Wako)/リン酸緩衝食塩液(PBS)(pH7.4)で4 $^{\circ}$ C、2時間固定。次に、100mM塩化アンモニウム(Wako)/PBSで4 $^{\circ}$ C、10分間、3回洗浄した。そして、15%スクロース(Wako)/PBSに4 $^{\circ}$ C、1時間浸した後、30%スクロース/PBSで4 $^{\circ}$ C、over nightで静置。O.C.T. Compound(SAKURA)(30ml)と9%スクロース/PBS(10ml)を混合した包埋剤に組織を包埋し、4 $^{\circ}$ C、3時間静置した後、液体窒素で急速凍結し、凍結ブロックを作製。凍結ブロックをクリオスタットHM 500 0(Carl Zeiss, Germany)で5 \cdot mの厚さに薄切し、組織切片を作製した。ヘマトキシリンエオシン染色を行った。

(4) 多分化能の検討

培養細胞を用いて、業績1で報告した方法

にて RT-PCR と免疫染色を行ない、腺房細胞、導管細胞、筋上皮細胞への分化を確認する。

(5) FACS による放射線照射ヒト唾液腺細胞の特性解析

ヒト唾液腺組織を細片化し、コラゲナーゼ処理を行い細胞を単離する。FACS 及びモノクローナル抗体を用いて、精度の高い幹細胞分離を行う。これまでに正常唾液腺における幹細胞分離に有益であることが判明している ICAM-1 および MHCclass I をはじめとする表面分子マーカーに加えて、唾液腺と発生由来の同一な内胚葉器官（肝臓・膵臓）における幹細胞分離で使用された c-Met (Hepatocyte growth factor)、c-Kit (stem cell receptor)、他臓器の癌幹細胞分離に用いられてきた CD34 (造血前駆細胞・未分化白血病細胞マーカー)、CD38 (造血前駆細胞・多発性骨髄腫のマーカー)、CD44 (悪性リンパ腫)、CD24、CD133 (前立腺上皮癌のマーカー) などの表面分子に対する各種モノクローナル抗体を用いて、“幹細胞”を含有する細胞画分の検出を試みた。

FACS を用いて分離した各画分の細胞はクローン性コロニーを形成し得る培養系において特性解析を行い、多分化能と自己複製能を有する幹細胞の性質に近い画分がどの部分に存在するのか、検討を行う。すなわち、FACS を用いて分離された細胞について、(1) コロニーアッセイ系の確立 (2) 増殖活性 (3) コロニー形成能 (4) 免疫染色による多分化能の評価 (5) RT-PCR によるコロニーごとの遺伝子の発現の評価を行った。

(6) 抗癌剤投与ヒト唾液腺癌細胞株での前駆/幹細胞の検討
放射線照射ヒト唾液腺細胞での実験結果が安定したものでなかったため、唾液腺癌細胞

株に抗癌剤を添加し、幹細胞の分離を試みた。抗癌剤はシスプラチン、5 フルオロウラシルを使用した。また、ビタミン B 剤を添加し、抗癌剤耐性の付与を試みた。

(7) ストレス時のヒト唾液中アミラーゼ濃度の測定

ストレス時にアミラーゼ定量用測定装置を用いて侵襲時のアミラーゼ値を測定した。

4. 研究成果

(1) 放射線照射後ヒト唾液腺臨床検体の検討及び細胞培養

顎下腺組織を分離し、35-mm 培養ディッシュ及び 10% ウシ胎児血清含有 DMEM/F12 培地を用いて 300 cells/cm² の播種密度にて細胞播種を行い、2 日間培養を行った。その後培地を Cnt-24 無血清培地に培地交換を行った。培養 1 4 日後には大型のコロニーが形成されたものでは唾液腺細胞分化マーカーに対する免疫組織学的染色を行い、タンパク質の免疫学的な検出により細胞の分化能・多分化能を評価した。導管上皮細胞のマーカーである CK s、CK14、CK7、腺房のマーカーである Amylase、AQP 3、筋上皮細胞のマーカーである α -SMA を用いて、Amylase/CK s、AQP3/CK14、SMA/CK7 の組み合わせで二重染色を行った。その結果、培養 3 日目のコロニーは導管のマーカーを強く発現しており腺房のマーカーは弱い発現が一部で認められたのに対し、培養 7 日目のコロニーにおいては導管マーカーの発現のみならず Amylase、AQP3、SMA を発現するコロニーを確認することができた。しかしながら、複数の検体において安定した結果は得られず、幹細胞の特性解析には至らなかった。

(2) 唾液腺細胞株への抗癌剤試験と再増殖の検討

HTB41 細胞は紡錘形細胞から類縁形に変形

したが、再増殖が進むに連れて、形態が再び紡錘形へと変化していった。また接着性が増していった。

ビタミンBを添加することにより、各抗癌剤に対する耐性の獲得が確認された。

(3) ストレス時唾液検査

侵襲時の唾液中アミラーゼを測定したところ、被験者7人中、5人にアミラーゼ値の上昇が認められた。

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)

[学会発表] (計1件)

①唾液アミラーゼを用いたストレス評価の検討

佐藤有紀、廣田誠、藤内祝

第55回日本唾液腺学会、平成22年12月4日、文京学院大学本郷キャンパス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 有紀 (SATO YUKI)

横浜市立大学・医学研究科・共同研究員

研究者番号：60573277

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

廣田 誠 (HIROTA MAKOTO)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：20347305