

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592719

研究課題名(和文) 唾液分泌障害に対する唾液腺再生医療の確立：歯髄細胞を用いた血管再生へのアプローチ

研究課題名(英文) Establishment of salivary gland regeneration for salivary gland hypofunction : Approach to regeneration of blood vessels using dental pulp cells

研究代表者

山田 浩之 (Yamada, Hiroyuki)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：90267542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：放射線治療で生じた虚血部への血管形成能を有する細胞移入は、組織の血管新生を促すことにより、唾液分泌障害を治療できる可能性がある。そこで、血管内皮細胞の供給源としての歯髄細胞の有用性を検討した。その結果、マウス歯髄細胞には、血管内皮細胞の機能を有する細胞が含まれていることが明らかとなった。また、血管内皮細胞に分化誘導した歯髄細胞の移入により唾液分泌障害がある程度改善した。このようなことから歯髄細胞は唾液分泌障害の治療における有用な細胞ソースであると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Radiation-induced salivary gland hypofunction might be treated by regenerating blood vessels using cell transfer therapy. Then, we examined the availability of dental pulp cells (DPCs) which could be used as a cell source of endothelial cells. As a result, dental pulp cells contained cells retaining endothelial functions. Our results show that radiation-induced salivary hypofunction is partially reversed by transplantation of endothelial cell-induced DPCs. For these reasons, DPCs could be used as a cell source for the treatment of salivary gland hypofunction.

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：口腔病理学 唾液腺の再生 血管新生

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌に対する放射線治療の副作用として生じる唾液分泌機能低下は患者のQOLを著しく低下させる。放射線照射は唾液腺や周囲組織の血管内皮細胞を損傷することで血管の狭窄や閉塞を招き、唾液腺組織の線維化や委縮をきたす。したがって、血管形成能を有する細胞を移入することで唾液腺組織の微小循環障害を改善できれば、唾液分泌機能低下を治療できる可能性がある。しかしながら、放射線照射で虚血となり傷害された唾液腺組織の周囲に血管の新生を誘導することにより、唾液分泌障害が改善されるかどうかは明らかにされていない。唾液腺組織の再生では、組織幹細胞や骨髄間葉系幹細胞の移入により、腺房細胞を再生する試みがなされているが、移入された細胞は再生結節を作らず、腺房細胞に分化して増殖はしない。もし、血管に分化誘導をかけた歯髓細胞や VEGF を局所注入することにより唾液分泌障害の改善が実現できれば、将来 VEGF や他の増殖因子が治療薬として有効となる可能性がある。また、この方法は、遺伝子導入のためのウイルスを使用しないことから感染や癌化の危険も回避できる。さらに、歯髓細胞は、骨髄と比較して採取が極めて容易であり実用的なものである。歯牙硬組織の中心に存在する歯髓細胞は、外的環境からの様々な刺激に直接暴露する危険が少なく、活性酸素種などによる遺伝子の損傷が起こりにくいため、皮膚などの細胞と比較しても理想的な細胞ソースであることが知られている。また、歯髓細胞は皮膚細胞と比較して効率よく iPS 細胞を樹立できることに加え、智歯から容易に採取できる利点を有する。さらに、歯髓組織には血管を新生できる幹細胞が含まれていると報告されている。そこで、本研究では血管内皮細胞に分化誘導した歯髓細胞を用いて放射線照射による唾液分泌障害マウスに対する細胞移入療法の有用性を検証することにした。

2. 研究の目的

本研究では難治性の口腔乾燥症患者に対する新規治療法の開発を目的として、血管に分化誘導をかけた歯髓細胞を放射線照射マウスの顎下腺に局所注入する治療実験を行う。移入された歯髓細胞が傷害を受けた唾液腺の周囲の血管新生を促すことにより、唾液量が増加するか否かを検証する。歯髓細胞をソースとして血管の再生から唾液腺組織の再生を促す治療を臨床応用するための研究基盤を確立する。

3. 研究の方法

(1) 細胞形態の観察

3 週齢緑色蛍光タンパク質 (GFP) 陽性 C57BL/6J 雄性マウスの上下顎臼歯から歯髓組織 (DP) を採取しコラゲナーゼにて処理した。MEM を用いて通常培養した歯髓細胞

(DPCs) と、MEM にて 1 週間培養したのち血管内皮細胞分化誘導培地にて培養した歯髓細胞 (DPECs) の形態を位相差顕微鏡と透過型電子顕微鏡を用いて観察した。DPECs と血管内皮細胞の形態学的類似性を調べるため、陽性対照としてマウスの大動脈由来血管内皮細胞 (MAECs) を用いた。

(2) 幹細胞および血管内皮関連遺伝子の検出

DPECs の特性を解析するため、DP、DPCs、DPECs および MAECs の mRNA を抽出し、RT-PCR 法により幹細胞関連遺伝子 (PDGF、Nanog、Rex1、Klf4、Oct4、Sox2、c-Kit、Sca-1)、および血管内皮関連遺伝子 (CD31、Flk1、VE-cadherin、VEGFA、vWF) の発現を調べた。

(3) 生体外における管腔様構造形成能の検討

DPECs の生体外における管腔様構造形成能を調べるため、DPCs、DPECs および MAECs を Matrigel でコートしたディッシュ上に播種し、24 時間後に管腔様構造の有無を観察した。

(4) 生体内における管腔様構造形成能の検討

DPECs の生体内における管腔様構造形成能を確認するため、DPECs と MAECs を Matrigel に混濁し、ヌードマウスの側背部皮下に移入した。MAECs は緑色の長期細胞トレーシング試薬で処理した。2 週間後に移入した Matrigel を摘出し、凍結標本を作製した。抗 CD31 抗体を用いて免疫染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて CD31 と GFP の発現を検討した。

(5) 放射線照射による唾液分泌障害マウスに対する細胞移入療法の検討

8 週齢 C57BL/6J 雄性マウスの顎下腺にリニアックを用いて 15Gy の放射線を照射し、唾液分泌障害マウスを作出した。放射線照射 4 日後、14 日後に DPECs、MAECs および骨髄由来細胞 (BMDCs) をこのマウスの両側顎下腺に移入した。対照群には PBS を注入した (各群, n = 7)。放射線照射 1 週間前と 8 週後に、腹腔内麻酔下にてピロカルピンを投与し唾液量を測定した。各群における唾液量を比較し、Dunn 検定を用いて統計学的に解析した (図 1)。

放射線照射による唾液分泌障害マウスへの細胞移入実験

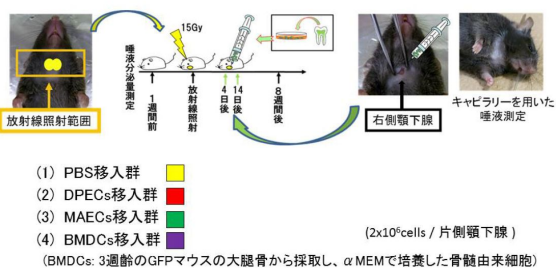
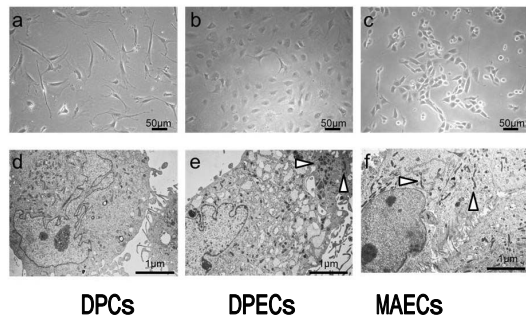


図 1

4. 研究成果

(1) 細胞形態

位相差顕微鏡により観察すると DPCs は線維芽細胞様の紡錘形を示した。一方、DPECs は血管内皮細胞の特徴の一つである敷石状の配列を示し、MAECs と類似した形態を呈した。透過型電子顕微鏡による検討では、MAECs にバイベル・パラデ(WP)小体が認められた。DPECs には明確な WP 小体を確認できなかったが、WP 小体に類似する構造を細胞質に認めた(写真1)。



DPCs DPECs MAECs

写真1

(2) 幹細胞および血管内皮関連遺伝子の検出

幹細胞関連遺伝子

DP は PDGF、Nanog、Rex1、Klf4、Sox2、c-Kit および Sca-1 の mRNA を発現していた。DPCs では、PDGF、Nanog、Rex1、Klf4、Sox2、c-Kit および Sca-1 の mRNA が検出された。DPECs は Nanog、Rex1、Klf4、Sox2 と Sca-1 の mRNA を発現していた(写真2)。

血管内皮関連遺伝子

DPECs は MAECs と同様に、CD31、Flk1、VE-cadherin、VEGFA、vWf を発現していた。

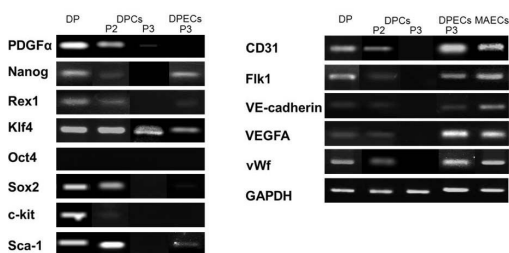
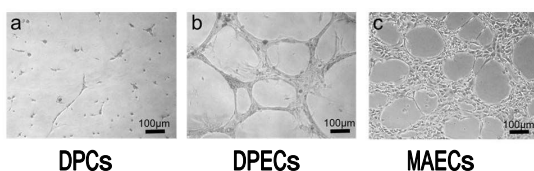


写真2

(3) 生体外における管腔様構造形成能の検討

DPCs は管腔様構造を形成しなかったが、DPECs は MAECs と同様に管腔様構造を形成した(図2)。



DPCs DPECs MAECs

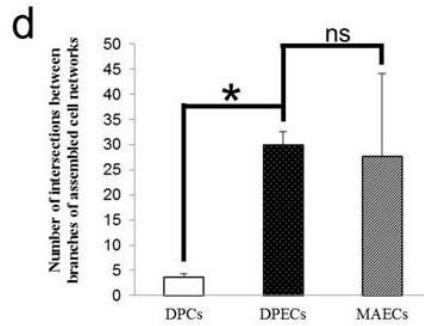
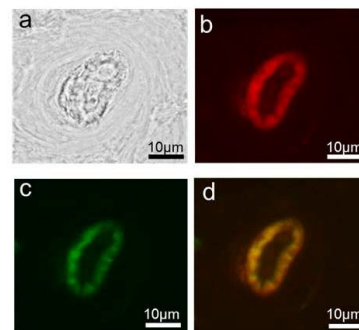


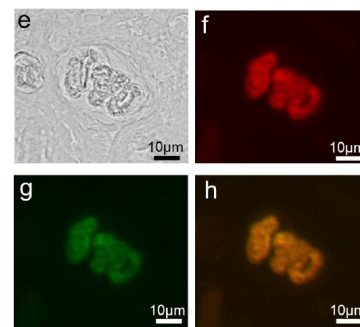
図2

(4) 生体内における管腔様構造形成能の検討

DPECs は MAECs と同様に CD31 と GFP が陽性の管腔様構造を形成した(写真3)。



DPECs



MAECs

写真3

(5) 放射線照射による唾液分泌障害マウスに対する細胞移入療法の効果

放射線照射1週間前の平均唾液量はPBS群で11.7 µl/g、DPECs群で11.6 µl/g、MAECs群で11.4 µl/gであり、各群間に統計学的な有意差は認められなかった。放射線照射8週後の平均唾液分泌量はPBS群で5.4 µl/g、

DPECs 群で 8.3 $\mu\text{l/g}$ 、MAECs 群で 7.4 $\mu\text{l/g}$ であり、DPECs 群と MAECs 群は PBS 群と比較して有意に高い値を示した ($P = 0.0452$ 、 0.0263) (図 3)。

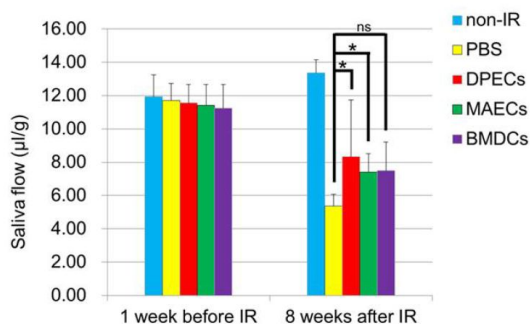


図 3

本研究結果より、DPECs は血管内皮細胞と類似した細胞形態を示した。血管内皮細胞には P-セレクチンと vWF からなる WP 小体が認められることが知られている。DPECs には vWF の mRNA の発現が認められたが、透過型電子顕微鏡による検討では明らかな WP 小体の存在を確認できなかった。しかしながら、WP 小体は生物学的な種や組織によって発現が異なると報告されており、WP 小体の欠如から DPECs が血管内皮細胞であることを完全に否定することはできないと考えられた。

歯髄幹細胞は間葉系幹細胞及び ES 細胞のマーカーを発現することが報告されている。本研究結果においても、RT-PCR 法により DPCs と DPECs に幹細胞関連遺伝子の発現が認められたことから DPECs には歯髄幹細胞が含まれている可能性が示唆された。さらに、DPECs には血管内皮関連遺伝子の発現が認められ、MAECs と類似した特性を持つことが示された。

DPECs は血管内皮細胞の特性である管腔様構造を形成した。ヌードマウスの側背から切除した組織に CD31 と GFP が共に陽性を示す管腔様構造が認められたことは、既存の血管が増殖して管腔を形成したのではなく、マトリゲルと共にマウスに移入した DPECs が管腔様構造を形成したことを示した。

放射線照射による唾液分泌障害マウスの顎下腺に対する DPECs や MAECs の移入は照射 8 週後の唾液分泌低下をある程度予防した。DPECs の由来を本研究からは明らかにできなかったが、既存の歯髄組織内の血管内皮細胞あるいは歯髄幹細胞の可能性が考えられた。いずれにしても DP に含まれるこれらの細胞から樹立された DPECs は、血管内皮細胞の供給源として有用な細胞ソースであると考えられた。

本研究は、DPCs が放射線照射による唾液分泌障害マウスに対する細胞移入療法の有用な細胞ソースであることを示した。血管内皮

細胞の特性を保持した DPECs は今後、細胞移入療法の実験的研究に貢献できる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 1 件)

Yamamura Y, Yamada H, Sakurai T, Ide F, Inoue H, Muramatsu T, Mishima K, Hamada Y, Saito I.

Treatment of salivary gland hypofunction by transplantation with dental pulp cells. Arch Oral Biol, 査読あり、58 巻、2013、935-942

〔学会発表〕(計 3 件)

Hiroyuki Yamada

Treatment of salivary gland hypofunction by transplantation with dental pulp cells 21st international Conference on Oral and Maxillofacial Surgery

October 21-24, 2013, Barcelona (Spain)

山村優花

頭頸部領域への放射線治療による唾液分泌障害の改善を目的とした歯髄細胞の有用性 第 57 回日本口腔外科学会総会

2012.10.19. 横浜

山村優花

唾液分泌改善を目的とした歯髄細胞から血管内皮細胞への分化誘導の検討

第 12 回日本抗加齢医学会総会

2012.6.22 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 浩之 (YAMADA HIROYUKI)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：9 0 2 6 7 5 4 2

(2) 研究分担者

齋藤 一郎 (SAITO ICHIRO)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：6 0 1 4 7 6 3 4

美島 健二 (MISHIMA KENJI)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：5 0 2 7 5 3 4 3

濱田良樹 (HAMADA YOSHIKI)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：7 0 2 4 7 3 3 6