

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月10日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659951

研究課題名（和文）ダイレクト・リプログラミングによる萎縮唾液腺の新しい細胞治療法の開発

研究課題名（英文）Development of cell therapy for the salivary gland tissue regeneration with direct reprogrammed dental mesenchymal cells

研究代表者

住田 吉慶 (SUMITA YOSHINORI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：50456654

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、歯髄・歯根膜由来幹細胞と唾液腺導管細胞が発生的相互作用を起こすことで、萎縮組織内で導管細胞から腺房細胞への分化増殖が促進される可能性を検討することである。導管に commit した細胞から腺房細胞への直接分化を細胞移植より誘導できれば、唾液腺萎縮症への新しい細胞治療法の開発の基盤となり得る。

当該研究期間では、まずヒト歯髄・歯根膜から単離し、増殖させた細胞を浮遊培養下で sphere を形成する細胞を増殖させると、神経堤細胞のマーカーを発現する幹細胞（歯牙由来神経堤様細胞；DNCC）が得られることを明らかにした。次に、この DNCC と唾液腺由来上皮細胞を共培養することで、唾液腺上皮細胞の腺房細胞への分化誘導を試みた。本実験では、唾液腺上皮細胞については、同じく浮遊培養にて sphere を形成する細胞を回収した後、無血清下で接着培養を行ない、増殖した細胞を使用した。この培養細胞には、導管系の特性を持った細胞を多く認めるが、腺房細胞へ分化した細胞は殆ど認められない。このような唾液腺細胞に対して、トランスウェルを介して DNCC と無血清下で共培養を行なったところ、いくつか nodule の形成を唾液腺細胞に認めることが出来るようになった。しかしながら、これらの細胞の特性を解析しても明らかな腺房細胞のマーカーの発現を認めることが出来なかった。そこで、ヌードマウスにて作出した放射性線性萎縮唾液腺モデルの顎下腺に DNCC を移植したところ、移植後 8 週にて唾液の分泌量の増加が認められ、唾液腺重量の低下の軽減も認められた。これらの効果が認められたため、現在そのメカニズムの解析を投与条件の検討と共に行なっているところである。

研究成果の概要（英文）：

The specific hypothesis of this study is that induced/isolated neural crest-like stem cells (DNCCs) from dental mesenchymal tissues possess the high plasticity to differentiate into various cell types, and lead the ductal cells to acinar cell differentiation by causing the epithelial-mesenchymal interaction. The surviving DNCCs after 24 hours of hypoxic treatment ($O_2 < 5\%$) have expressed the neural crest or stem cell related markers, such as p75^{ntr}, nestin, sox2 and bmi1. Then, DNCCs were applied for co-culture with the salivary gland epithelial cells. However, DNCC could not affect the acinar cell differentiation of cultured salivary gland cells. Therefore, DNCCs were directly transplanted to submandibular gland of mice right after 12Gy of head and neck irradiation. The salivary output of transplanted-mice increased compared with that of non-transplanted mice after 8 weeks of irradiation. Currently, we are analyzing in vivo behavior of DNCCs in more detail.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：唾液腺再生、神経堤細胞、相互作用

1. 研究開始当初の背景

現在、再生医学の分野においては、胚性幹細胞に発現する初期化因子を成体細胞に導入することで創出される人工多能性幹細胞 (iPSCs) に大きな期待が寄せられている。しかしながら、iPSCs の初期化に関わる分子のメカニズムは完全には理解されておらず、iPSCs における移植後の腫瘍化の危険性や、生着の困難さ等の問題により、これらの細胞を生体内で制御することは困難である。即ち、現段階では、体性幹細胞を利用した再生医療の早期実現のために、分化の制御が容易で安全性の高い多能性幹細胞を簡便に誘導し、それを効果的に応用する方法を開発する必要がある。

一方で、iPSCs の創出は、既に分化能が限定された成体細胞においても、必要な環境を整えば、さらに高い可塑性を持つ細胞への初期化が可能であることを示している。又、最近では、骨髄などの間葉系組織から採取した細胞を幹細胞選択的な環境に晒すことで、従来の組織幹細胞には見られない多能性を発揮する幹細胞 (Muse cells) が分離されている。このことから、成体の口腔組織にも、従来の組織幹細胞より高い可塑性の持った幹細胞が存在する可能性が考えられ、又、そのような幹細胞を抽出する条件を詳細に検討することで、より簡便な方法で細胞の分化系譜を遡った初期化を誘導できる可能性がある。そこで、申請者らは、歯牙の間葉系細胞の多く

は神経堤に由来することに着目し、神経堤の可塑性維持に用いる培養法に、幹細胞の様々な選択的条件を応用することで、歯牙組織から神経堤に近い段階の幹細胞 (歯牙由来神経堤様幹細胞 ; DNCC) を抽出、もしくは一定の段階までの初期化を誘導し得ると考えた。

次に、DNCC の抽出/誘導が可能になれば、現在その組織回復が困難である高度な臓器再生のストラテジー、例えば、放射線性の唾液腺萎縮症に新しい細胞治療のスキームを創出することが可能となり得る。唾液腺組織は、胎生期において口腔上皮と神経堤由来の間葉系細胞の相互作用により、その形態を構築する。又、唾液腺組織を構成する筋上皮細胞は、神経堤由来であることが示唆されている。つまり、歯牙組織から抽出/誘導した DNCC は、唾液腺上皮細胞と発生学的相互作用を起こす可能性があると考えられる。

現在、口腔癌に対する放射線治療に起因する萎縮唾液腺の再生を図るため、組織工学的手法による人工唾液腺の開発や、骨髄や唾液腺幹細胞による細胞治療が試みられているが、実際に機能する腺組織の再生は達成されていない。唾液腺は、導管系と腺房系を持ち、血管と神経が高度に組織化された複雑な臓器であるため、その再生は困難である。

その一方で、放射線障害による萎縮唾液腺においては、腺房細胞は殆ど失われるにも関わらず、導管細胞は組織内に残存する割合が高いことが知られている。そして、われわれ

は、マウス放射線性萎縮モデルで、残存した導管細胞が血管新生などの組織再生刺激により c-kit や sca-1 などの幹細胞因子を発現することを見出している。このことから、われわれは、DNCC は残存する導管細胞と発生学的相互作用を起こし、腺房細胞の誘導を促進し得ると考えた。これは、前述したように唾液腺が口腔上皮と神経堤由来の間葉組織との相互作用によって発生することや、実際に胎生期のマウス顎下腺の器官培養において、血小板由来増殖因子を添加すると、その受容体は間葉に存在するにも関わらず、唾液腺上皮細胞の増殖が亢進し、形態形成が促進されることを示した知見に基づいている。さらには、歯胚の再生実験において、歯胚を形成する口腔上皮と間葉組織のどちらかが未分化であれば、それらの相互作用により歯胚の形成が継続されることも示されている。これらのことから、萎縮組織内に DNCC を移植することで、残存する導管細胞から幹細胞への初期化を介さずに、直接唾液分泌機能を持つ腺房細胞への *in vivo* direct reprogramming が誘導される可能性は十分に考えられる。そして、このスキームによる唾液腺萎縮組織の細胞治療法の開発は従来にない独創的なものである。

2. 研究の目的

本研究は、まず歯髄/歯根膜幹細胞から神経堤様の幹細胞 (DNCC) の抽出・濃縮を行ない、その DNCC を応用して、放射線照射後の唾液腺萎縮組織に残存する導管細胞から、唾液分泌機能を持つ腺房細胞の誘導を *in vivo* において直接試みることを目的とした。DNCC と導管細胞が発生学的相互作用を起こすことで、萎縮組織内で導管細胞から腺房細胞への分化増殖が誘導される可能性を検討する。導管に commit した細胞から腺房細胞への直接分化を図る direct reprogramming を細胞移

植により誘導できれば、唾液腺萎縮症への新しい細胞治療法開発の基盤となり得る。

具体的には下記の3つを目的として、実験を行なった。

- 1) 浮遊培養下でのコロニーに幹細胞の選択的条件を応用することで、DNCC の抽出・濃縮を試みる。
- 2) *in vitro* において、DNCC が培養唾液腺上皮細胞と相互作用を起こし、唾液腺細胞から腺房細胞へ直接分化する可能性を検討する。
- 3) *in vivo* において、DNCC を移植することで、放射線性の萎縮唾液腺組織に残存する導管細胞から腺房細胞への直接的な分化増殖を試みる。

3. 研究の方法

1) DNCC の抽出・濃縮；

ヒト歯髄・歯根膜組織から単離し、接着培養にて増殖させた細胞群を、無血清培地に 10ng/ml hbFGF と 20ng/ml hEGF を添加した無血清培地に移し、1-2 週間程度培養を続けることで、浮遊細胞塊を得た。

次に、その浮遊細胞塊を低酸素 ($O_2 < 5\%$) 環境に数時間晒すことで、DNCC の抽出・濃縮を試みた。われわれは、歯髄の間葉系幹細胞を無酸素 ($O_2 < 0.1\%$) 下で培養すると、sox2 や oct4 などの初期化因子が誘導されることを既に確認している。低酸素に晒した細胞は、その特性を神経堤細胞 (p75^{ntr} など) や幹細胞 (oct4 など)、神経細胞 (β 3tublin や TH など) に発現する遺伝子や蛋白の発現についての解析を行なった。

2) DNCC と唾液腺上皮細胞との共培養；

DNCC を唾液腺上皮細胞と共培養をすることで、DNCC との相互作用により唾液腺上皮細胞が唾液腺の腺房細胞に分化する可能性を評価した。

① 浮遊培養下における共培養：

C3H マウスの顎下腺から単離した唾液腺上皮細胞を、DNCC と共培養を行う。浮遊培養において、唾液腺上皮細胞から浮遊細胞塊を形成する細胞は c-kit や sca-1 を発現し、導管部の前駆細胞の特性を備えていることが知られている。この浮遊培養において、DNCC と共培養を行うことで、唾液腺由来の浮遊細胞から腺房細胞への特性変化を解析した。共培養は、トランスウェルを使用して行なった。

② 接着培養細胞との共培養：

われわれの実験において、浮遊培養後の唾液腺由来浮遊細胞が培養皿に接着し、無血清下で増殖した細胞は、導管系か筋上皮細胞の特性を持った細胞であり、腺房細胞への分化は認められない。そこで、この唾液腺浮遊細胞由来の接着培養細胞と DNCC を、トランスウェルを用いて共培養することで、接着培養細胞の腺房細胞への特性変化を評価した。

3) 放射線性唾液腺萎縮モデルへの移植；

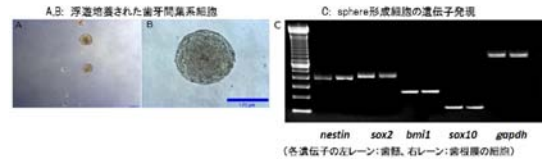
頭頸部への放射線照射モデルをヌードマウスにより作出し、DNCC を移植することで、導管部細胞から腺房細胞の誘導を試みた。12Gy の頭頸部放射線照射により唾液腺萎縮モデルを作出した後、照射 5 日後と腺房細胞の消失が顕著になる照射後 13 週の両時点において、 5×10^5 個の DNCC を顎下腺への直接投与を行なった。評価は、唾液腺の分泌量や唾液の性状検査を始め、唾液腺特異的抗体などによる免疫染色と性染色体の FISH による 2 重染色により移植細胞と導管細胞を詳細に評価することにした。

4. 研究成果

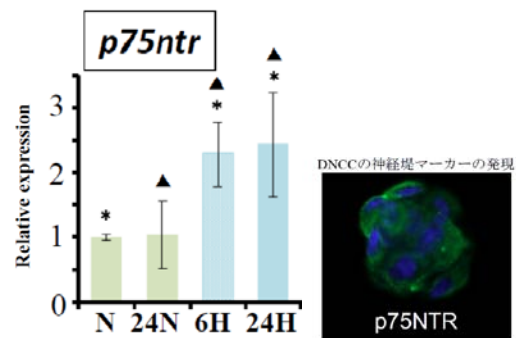
1) DNCC の抽出・濃縮；

最初に歯髄・歯根膜由来の MSC を浮遊培

養下において 1 週間培養を行ない、得られた浮遊細胞塊の特性を解析したところ、nestin や sox2、sox10、bmi1 などの神経堤細胞や幹細胞関連因子の上昇を確認した（下図）。



そこで、さらにこの浮遊細胞塊を $O_2 < 5\%$ の低酸素環境下に 24 時間置いたところ、培養開始 6 時間後から神経堤マーカーである p75ntr や他の幹細胞因子の発現上昇が認められた（下図）。



又、この DNCC を骨、軟骨、脂肪分化培地にて培養を行なったところ、分化誘導は可能であった。そのため、24 時間経過時点の細胞を DNCC として回収し、実験に使用することにした。

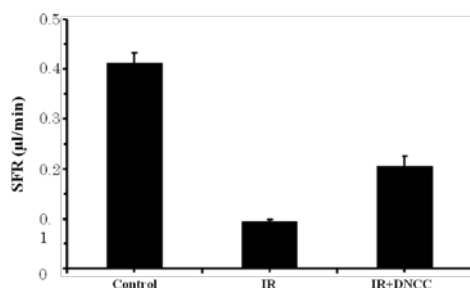
2) DNCC との共培養による唾液腺上皮細胞からの腺房細胞の誘導；

この実験では、C3H マウスの顎下腺から単離した細胞を遊培養下に置き、浮遊細胞塊が得られた時点（3-5 日後）で、DNCC との共培養を行なった。しかしながら、唾液腺由来の浮遊細胞塊に明らかな腺房細胞への分化を認めることは出来なかった。そこで、唾液腺由来の浮遊細胞塊を無血清下で接着培養を行なった。この接着培養では、一定期間唾液腺の幹細胞マーカーが維持され、3 週間以

上の長期培養を行なうと、増殖した細胞の中に導管様の構造を示す細胞塊を多数認めるようになる。そこで、接着培養開始3週間の時点から無血清下において DNCC と共培養を行なった。しかしながら、この培養においても AQP5 や NKCC1 など明らかな腺房細胞の特徴を示す細胞の増殖を見出すことは出来なかった。

3) 放射線性唾液腺萎縮モデルへの移植；

In vivo において、萎縮唾液腺組織内に残存する導管部細胞が、DNCC との相互作用によって、直接腺房細胞へ分化する可能性を考え、DNCC の移植腺組織への移植を行なった。実験は、まず前述したように放射線照射直後となる5日目に DNCC のマウス顎下腺への移植を行なった。その結果、照射後8週において、唾液腺分泌量の増加（下図）、および摘出した顎下腺の重量の増加が認められた。



そこで、現在、摘出した唾液腺組織内における移植 DNCC の挙動解析を行なうと同時に、唾液腺の萎縮が顕著になる照射後13週に DNCC を移植する実験を行なっているところである。本研究は、今後は移植組織内の DNCC の挙動解析に主眼を置き、in vivo における導管細胞から腺房細胞への直接分化誘導の可能性を探求していく予定である。

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 12 件)

- 1) Tran SD, Sumita Y, Khalili S. Bone Marrow Derived Cells: a potential approach for the treatment of xerostomia. *Int J Biochem Cell Biol.*, vol.43(1):5-9, 2011.
- 2) Sumita Y, Liu Y, Khalili S, Maria OM, Xia D, Key S, Cotrim AP, Mezey E, Tran SD. Bone marrow-derived cells rescue salivary gland function in mice with head and neck irradiation. *Int J Biochem Cell Biol.*, vol.43(1):80-87, 2011.
- 3) Agata H, Sumita Y, Asahina I, Tojo A, Kagami H. Ischemic culture of dental pulp-derived cells is a useful model in which to investigate mechanisms of post-ischemic tissue recovery. *Histol Histopathol.*, in press, 2013.

(他 9 件)

[学会発表] (計 8 件)

- 1) Sumita Y, Khalili S, Liu Y, Mario OM, Key S, Mezey E, Tran SD. Bone Marrow Derived Cells: a Potential Approach for the Treatment of Xerostomia. 第3回 口腔先端応用医科学研究会 (東京), 2011. (招待講演)
- 2) 住田吉慶, Tran SD, 各務秀明, 朝比奈 泉. 細胞治療による唾液腺再生療法に関する基礎的研究. 第11回 再生医療学会総会 シンポジウム 2, SY-2-2 「歯科領域の再生医療」(横浜), 2012. (シンポジウム)
- 3) 住田吉慶. 細胞治療による唾液腺再生療法に関する基礎的研究. 第57回日本口腔

外科学会総会 ワークショップⅡ「唾液腺研究の最前線」(横浜) 2012. (ワークショップ)

(他 5 件)

〔図書〕(計 1 件)

- 1) 住田吉慶、朝比奈泉、各務秀明. 唾液腺の再生. 再生医療叢書 第 8 巻 歯学系, 朝倉書店, 2012.

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

住田 吉慶 (SUMITA YOSHINORI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授
研究者番号：50456654

(2) 研究分担者

朝比奈 泉 (ASAHINA IZUMI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
教授
研究者番号：30221039

各務 秀明 (KAGAMI HIDEAKI)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：80242866

長井 一浩 (KAZUHIRO NAGAI)
長崎大学・大学病院・講師
研究者番号：30304942

縣 秀樹 (AGATA HIDEKI)
東京大学・医科学研究所・特任助教
研究者番号：20511177