

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 5 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：23659952

研究課題名（和文）口腔癌化学放射線療法の併発障害に対する骨髄由来幹細胞を用いた革新的細胞療法の確立

研究課題名（英文）Development of stem cell therapy for the oral tissues damaged by chemo-radiation therapy

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、口腔癌に対する超選択的動注化学・放射線療法（SSCR）の副作用として惹起される重度唾液腺萎縮と晩期顎骨壊死を対象にした骨髄由来細胞（BMDC）による細胞治療について、その可能性を検討するものである。

本研究期間では、まず唾液腺萎縮・顎骨壊死併発障害モデルを作出した上で、特に萎縮唾液腺への BMDC 投与の効果について、詳細に検討を行なった。まず BMDC の投与方法について、尾静脈投与と顎下腺への直接投与を行ない比較した。その結果、投与後の唾液分泌量や唾液腺の重量の回復について大きな差は認められなかった。さらに、投与する BMDC のドナーの年齢について 8 週齢と 22 週齢のマウスについて検討したところ、これについても効果に大きな差は認めなかった。又、BMDC から培養増殖させた間葉系幹細胞（MSC）の投与を行なったが、培養 MSC の群では投与直後に死亡するマウスが多く、又、その効果も BMDC と比較して大きな差は認めなかった。

BMDC の萎縮唾液腺への投与に関して、非培養 BMDC の静脈投与は、唾液腺への直接投与と効果に大差なく、栓塞も起こしにくいと、将来的に有用な方法であると考えられた。又、ドナーの年齢が高齢であっても一定の効果が得られる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）

Salivary gland atrophy or osteonecrosis are serious side effects for patients with head and neck cancer who received radiation- and/or chemo-therapy. It causes the harmful effects on the quality of life after cancer treatment. However, current clinical strategies cannot efficiently prevent the occurrence of these side effects. Therefore, effective therapy should be developed urgently. Recently, we have shown that cell therapy with bone marrow derived cells (BMDCs) displays the preventive effects to the radiation-induced salivary gland hypofunction. Therefore, to develop this strategy, we examined the detailed condition of cell transplantation in mouse model that has radiation-induced salivary gland atrophy and osteonecrosis. As results, both intra-glandular or intra-venous injections of BMDCs, and both young and older mouse donors were as effective in repairing irradiated salivary gland. However, though the

cultured mesenchymal stem cells (MSCs) were also effective to rescue the salivary hypofunction by its injection via tail vein, the survival rate of mice was seriously decreased. Cultured MSCs seemed to cause the acute pulmonary embolism after injection.

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：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：口腔粘膜炎、細胞治療

1. 研究開始当初の背景

口腔癌治療において、近年、不破、藤内らによって開発され、浅側頭・後頭動脈からのカテーテル長期留置を可能にした超選択的動注化学・放射線療法 (SSCR) は、連日の放射線療法と動注化学療法の同時併用を可能にした。この方法は、高い治療効果を持ち、原発組織の機能と形態の温存を図る低侵襲療法であることから、患者の QOL 維持を図る上で、頭頸部癌領域の新しい戦略として期待されている。しかし、一方で SSCR の副作用として現れる重度口内炎や骨髄抑制、そして、唾液腺萎縮による口腔乾燥と晩期顎骨壊死の障害は、治療遂行の障害となると同時に、術後 QOL を著しく低下させる。そして、これらの障害に対する有効な治療法は、現在までに確立されていない。口腔癌の SSCR は、今後の適応拡大が期待される低侵襲療法であるが、それに伴う副作用の根治的治療を含めた真の低侵襲治療体系の確立が強く望まれる。

一方、近年成体の組織幹細胞を使用した再生医療に高い注目が寄せられている。なかでも、骨髄に由来する血管内皮前駆細胞 (EPC)

が、末梢血中の単核球成分の一部として存在することが示されて以降、骨髄由来細胞 (BMDC) を用いた細胞治療の有効性が、血管、心筋、肝臓、骨組織等の再生や脳梗塞治療などで示唆されている。例えば、骨折治療においては、尾静脈経由で注入した BMDC が骨折部へ遊走し、仮骨形成の促進による創部治療促進の効果が報告され (Granero-Molto F et al. 2009)、骨のリモデリングや新生が必要な部位で BMDC の細胞治療の可能性が示唆されている。そして、われわれも BMDC の局所への遊走・生着能や分化能に注目し、唾液腺萎縮マウスの尾静脈へ BMDC を注入することで、萎縮腺組織の再生と機能回復について、その有効性を一部確認している (Sumita Y et al. 2010)。これらの知見は、BMDC による細胞治療が SSCR 後の障害を大きく軽減させ得ることを示唆しており、細胞の採取も容易なことから、早期の臨床応用モデルの確立が望まれる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、口腔癌に対する超選択的

動注化学・放射線療法 (SSCR) の副作用として惹起される唾液腺萎縮、及び晩期顎骨壊死を対象に、骨髓由来細胞 (BMDC) による細胞治療を展開することで、これらの障害の予防や組織の再生を図る治療技術を開発することにある。申請者らは、静脈内投与した BMDC の局所への遊走・生着能や分化能に注目し、それを用いた唾液腺萎縮症に対する細胞治療法の開発に取り組んでおり、現在までにその有効性を一部確認している。

本研究は、これまでの研究をさらに発展させ、唾液腺萎縮と顎骨壊死モデルにおいて、BMDC の投与方法や時期、ドナーの年齢などの検討を行なうことで、効果的な細胞投与の条件や効果発現のメカニズムを解析することを目標としている。

3. 研究の方法

1) 唾液腺萎縮と顎骨壊死モデルへの BMDC 移植；

① モデルの作出；

SSCR に併発する組織障害モデルの作出については、C3H マウスへの顎下腺や耳下腺領域まで含んだ頭頸部のみ放射線照射を与えることの出来る器具を用いて、15-20 Gy (X-ray) の線量を照射することで、照射後約 8 週で約 50% 以下の唾液分泌量の低下を導く障害を唾液腺に与えることが出来る。本実験では、この照射条件のうち 16 Gy を使用し、それに併せて抗癌剤の投与を行ない、モデルを作出した。抗癌剤 (シスプラチン 8mg/kg) の投与は、放射線照射の 4 時間前に腹腔内投与にて行なった。

その後、照射後 8、13、24 週にてマウスの体重計測と唾液分泌量の計測を行ない、唾液腺障害の状態を確認した上で、さらに照射後 13 週にて顎骨壊死の発症状態を組織学的に観察し、モデルの作出とした。

② BMDC の単離と投与；

BMDC は雄 C3H マウス (8 週齢、もしくは 22 週齢) より採取した骨髓から、DMEM 培地にてセルストレーナーを用いて単離した。その後、約 1×10^7 個の細胞を 400 μ l の DMEM に濃縮し、1 匹のマウスへの 1 回投与に用いた。投与は、障害モデルの雌 C3H マウス (8 週齢) の尾静脈と顎下腺にそれぞれ投与を行ない、投与は放射線照射直後と照射後 7 日後に行なった。BMDC は、細胞投与の度に、ドナーから採取した。

又、骨髓から採取した非培養の新鮮 BMDC と培養 MSC の投与効果を比較するため、MSC の培養を行なった。MSC は、BMDC のみを接着培養に移しても細胞数の確保が困難であったため、フラッシュアウト時に大腿骨を粉砕した cortical bone と一緒に培養を行ない、細胞を増殖させた。その後、増殖した細胞が *in vitro* assay において骨、軟骨、脂肪に分化可能なことを確認した後、MSC として使用した。

2) BMDC 移植後の評価；

照射後 8、13、24 週にてマウスの体重計測と唾液分泌量の計測を行ない、唾液分泌障害の状態を確認した。さらに、各週において顎下腺を採取し、組織学的・免疫組織学的にも唾液腺の萎縮状態を観察した。又、照射後 13 週では下顎骨も採取し、顎骨壊死の発症状態を組織学的に観察した。

4. 研究成果

本研究期間では、唾液腺萎縮と顎骨壊死モデルの作出を行なった後、主に萎縮唾液腺において、以下の評価を行なった。

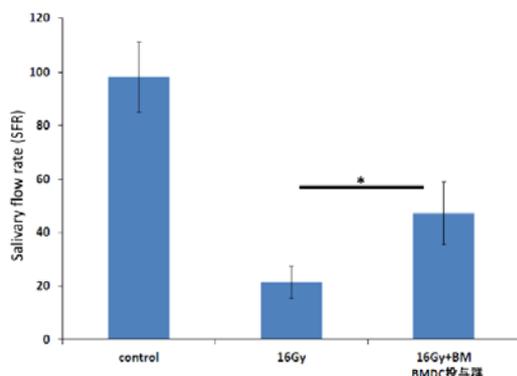
1) BMDC の投与方法の検討

われわれは、放射線性唾液腺萎縮モデルにおいて、BMDC の尾静脈投与により、唾液分泌量の回復、および腺房細胞の再生が促され

ることを見出している。そして、この効果は、投与された **BMDC** の局所での血管新生や幹細胞増殖活性の誘導といったパラクリンの影響によることが大きいと示唆された。しかしながら、放射線照射による腺房細胞の消失が顕著になる照射後 13 週前後になると、細胞投与群においても唾液分泌量の低下を認めるようになり、その効果は十分とは言えなかった。そこで、まず **BMDC** を直接唾液腺に投与することで、局所に生着する細胞数を直接的に増加させることが出来れば、その効果も大きくなるのではないかと考え、実験を行なった。

その結果、照射後に顎下腺に直接 **BMDC** を投与した群の唾液分泌量を計測したところ、照射後 8 週にて唾液の分泌量がコントロール（照射のみ）と比較して回復していた。しかしながら、この時点での分泌量の回復は、正常マウスの 50%程度（図 1）と尾静脈投与した時の程度（80%）と比較して十分ではなかった。又、採取した唾液腺の重量を計測しても、尾静脈投与の試料と比較して、有意な差は認められなかった。現時点で照射後 13 週における解析まで行なっているが、現在までに顎下腺への直接投与による一定の効果は認められるものの、尾静脈した群と比較して明らかな差は認めていない。

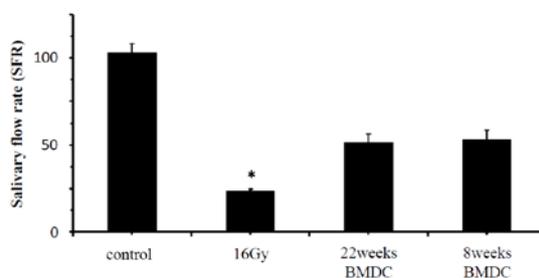
(図 1)



2) ドナーの年齢による検討

次に、われわれは **BMDC** を採取するドナーの年齢による効果発現の差異について、解析を行なっている。これまでの実験では、8 週齢と比較的若いマウスをドナーとして使用していたため、実際に臨床応用した場合の高齢者を想定し、22 週齢マウスをドナーとし、その **BMDC** の尾静脈投与の効果について検討を行なった。その結果、照射後 24 週において、22 週齢のマウスの **BMDC** によっても唾液分泌量の回復が認められ、その回復の程度は 8 週齢の **BMDC** とほぼ同程度であった（図 2）。

(図 2)



3) 培養 MSC による検討：

さらに、培養 **MSC** を投与に用いて実験を行なった。われわれは、**BMDC** による効果発現のメカニズムとして、投与細胞による局所での血管新生や幹細胞増殖活性の誘導といったパラクリンの影響を確認していることから、この影響が **BMDC** に含まれる **MSC** などの幹細胞群により発揮されている可能性が高いと考えた。そこで、細胞投与の効果発現のさらに詳細なメカニズムを解析することと、効果的な幹細胞濃縮投与の条件を検討するために培養 **MSC** の投与を行ない、その効果を **BMDC** 投与時と比較した。その結果、培養 **MSC** を移植した場合、移植直後に肺栓塞にて死亡するマウスが多く、生存したマウスについても、唾液分泌量の回復は **BMDC** を投与した時と比較して大きな差は認められなかった。培養細胞は細胞のサイズが組織

から単離したばかりの新鮮細胞と比べて大きいため、静脈投与により栓塞をきたしやすと思われる。このことから、BMDC に関しては、効果に大差がないならば、新鮮細胞を使用した静脈投与モデルが今後細胞治療の戦略として有用である可能性が示唆された。

以上から、非培養 BMDC の静脈投与は、唾液腺への直接投与と効果に大差なく、栓塞も起こしにくいと、将来的に有用な方法であると考えられた。又、ドナーの年齢が高齢であっても一定の効果が得られる可能性が示唆されたことから、本戦略の臨床応用が容易である可能性が示された。現在、これらの実験については、評価する各週の試料を作製し、組織学的・免疫組織学的な観察を加え、さらに詳細な解析を行なっているところである。これにより、BMDC の効果的な投与条件が明らかになっていけば、将来の細胞治療の確立に重要な知見をさらに得ることができると思われる。又、顎骨壊死についても、現在 BMDC 投与の効果の解析を行なっているところであるが、BMDC の細胞投与により唾液腺萎縮と顎骨壊死の 2 障害を網羅的に軽減できる条件を検討していくつもりである。

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 13 件)

- 1) 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.
- 2) Uehara M*, Ikeda H, Nonaka M, Sumita Y, Nanashima A, Nonaka T, Asahina I.

Predictive factor for photodynamic therapy effects on oral squamous cell carcinoma and oral epithelial dysplasia. *Arch Oral Biol.*, vol.56(11):1366-1372, 2011.

- 3) Zhong W, Sumita Y, Ohba S, Kawasaki T, Nagai K, Ma G, Asahina I*. *In vivo* comparison of the bone regeneration capability of human bone marrow concentrate vs. platelet-rich plasma. *PLoS One.*, vol.7(7):e40833, 2012.
- 4) 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.

(他 9 件)

[学会発表] (計 20 件)

- 1) Asahina I: Over view on regenerative therapy for alveolar bone (Keynote lecture) 2nd International Auto-Tooth Bone Bank Symposium(I.A.B.B), Fukuoka, Japan, 2011
- 2) Shiraishi T, Ikeda H, Sumita Y, Ohba S, Wakamatu Y, Nagai K, Asahina I: Bone regeneration using adipose-derived stromal cells ADSCs prepared from human cheek fat pads, Asian Congress on Oral & Maxillofacial Surgery 2010.11.25 - 28 Kuala Lumpur
- 3) Asahina I: Alveolar bone regeneration using mesenchymal stem cells. Second International Congress for Regenerative Surgery 2010.10.28-30 Roma

(他 17 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
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

大場 誠悟 (SEIGO OHBA)
長崎大学・大学病院・講師
研究者番号：80363456

南里 篤太郎 (MINAMIZATO TOKUTARO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：50529807