

## 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 6 月 10 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659955

研究課題名（和文） 細胞活性化能を付与したチタンファイバーによる唾液腺再生

研究課題名（英文） Salivary gland regeneration using titanium fiber scaffold.

## 研究代表者

青木 伸二郎 (AOKI SHINJIRO)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：50231759

## 研究成果の概要（和文）：

チタンファイバーを不織布状にした多孔質体であるチタンファイバースキャホールドにハイドロキシアパタイト薄膜をコーティングすることで細胞親和性を付与し、同材料内でラット唾液腺細胞を培養した。アパタイト薄膜コーティングを実施することにより、唾液腺細胞の付着性増殖性は向上したが、腺組織の形成には至らなかった。スキャホールド内での唾液腺組織の構築には様々な因子が関わると考えられ、さらなる検討が必要であると考えられた。

## 研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was evaluation of the salivary gland regeneration properties of titanium fiber scaffold (TFS) that had been coated with a thin hydroxyapatite (HA) layer. Rat submandibular gland cells seeded on the hydroxyapatite coated scaffold showed higher cell attachment and proliferation activity. But, cell differentiation as well as tissue reconstitution were not seen on that scaffold. To archive tissue reconstitution of salivary gland cell, many kind of factors should be considered in further study.

## 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	2,700,000	810,000	3,510,000

## 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, チタンファイバースキャホールド

## 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。申請代表者は放射線治療後の顎口腔組織障害に対する治療方法に関する検討(青木ら, *日本口腔腫瘍学会雑誌*, 2006)を行った後、放射線照射を受けたヒト唾液腺組織を用いた研究指導で、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、単細胞からのコロニー形成と多分化能を観察できる培養系を樹立し(Tatsuishi et al., *International Journal of Molecular Medicine*, 2009)、放射線照射後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/前駆細胞が存在することを実証した。また、分担者は、チタンファイバー綿を用いた細胞培養実験を実施し、チタンファイバー綿を、その3次元構造に影響を与えないハイドロキシアパタイト薄膜でコーティングすることで、細胞の活動性が促進されることを実証しており (Hirota et al., *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 2010, 2011)、この両者の実験系を組み合わせることで、複雑な構造を有する唾液腺組織が再現できるのではないかと考えて本研究の発想に至った。

## 2. 研究の目的

口腔癌の放射線治療後の唾液腺組織障害にて必発する口腔乾燥症に対する新しい治療を確立するため、3次元細胞培養基材を用いた唾液腺再生の検討を行う。独自の培養方法によって確立した単一唾液腺細胞から唾液腺各構成細胞への分化までが観察できる低密度コロニーアッセイ法を、細胞活性化能を付与した50ミクロンのチタンファイバーからなる3次元多孔質体内で行うことによって複雑な唾液腺組織構造を再現する。

## 3. 研究の方法

(1) チタンファイバー綿性3次元スキャホルドの作製と分子プレカーサー法によるハイドロキシアパタイト薄膜コーティングを実施した。分子プレカーサー法では、Ca/P比が1.67となる水溶液中にチタンファイバー綿性スキャホルドを20分間浸漬した後、60℃で20分間予備加温し、次いで600℃で2時間加熱し、ハイドロキシアパタイトをコーティングした。

(2) 唾液腺細胞の採取は12週齢、♂、wister系ratを使用した。ネンブータルによる全身麻酔下にて頸部正中に切開線を加えて両側顎下腺を明示し、まず導管部を結紮し、舌下線と分離した後に顎下腺を摘出した。皮膚を丁寧に除去し、メス・ハサミなどで組織を粉砕し、0.01%コラゲナーゼにて唾液腺細胞を分離した。40μmメッシュのセルストレ

イナーにて細胞抽出液を濾過後、1300rpm・5分間遠心分離をした。沈殿物を洗浄し、唾液腺細胞として播種した。

(3) 細胞培養において、抽出した唾液腺細胞は12wellプレート上に、1000個/cm<sup>2</sup>の濃度になるように播種した。細胞培養培地はEMEM/F12培地を使用し、10%ウシ血清、抗菌薬等を添加した。細胞播種1日後に成長因子であるEGFを添加した。

(4) 細胞接着の評価。細胞播種後3時間後、24時間後に生細胞数を計測し、接着細胞数を評価した。生細胞数の計測はWST-1試薬を使用して行った。WST-1は細胞播種後3時間または24時間後に各wellにそれぞれ100ml添加し、1時間反応させた後、各wellから100mlずつを96wellプレートに移し、吸光度450nmの波長をプレートリーダーにて計測した。また計測後に各wellの細胞をトリプシン処理にて回収し、細胞数計算盤にて各well内の実細胞数を計測した。さらに、播種後の細胞をAlexa488-actinにて染色し、スキャホルド内での細胞の状態を確認した。

(5) 細胞増殖の評価。細胞播種後4日、7日後に生細胞数を計測し、細胞数を評価した。生細胞数の計測はWST-1試薬を使用して行った。WST-1は細胞播種後4日または7日後に各wellにそれぞれ100ml添加し、1時間反応させた後、各wellから100mlずつを96wellプレートに移し、吸光度450nmの波長をプレートリーダーにて計測した。また計測後に各wellの細胞をトリプシン処理にて回収し、細胞数計算盤にて各well内の実細胞数を計測した。

(6) 細胞分化の評価。細胞播種後4日、7日後に各wellよりRNAを抽出し、RT-PCRにて唾液腺細胞マーカーの発現を検討した。RNAはトリゾールにて抽出し、抽出したRNAはナノドロップにて量を測定後、cDNAを作製

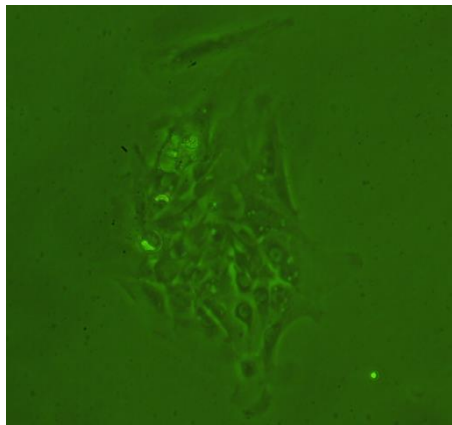
した。唾液腺細胞マーカーは、導管細胞マーカーとしてサイトケラチン、腺房細胞マーカーとしてアクアポリン5、筋上皮細胞としてsmooth-muscle actin (SMA)を使用した。それぞれのプライマーより作製したcDNAからRT-PCRを実施し、電気泳動にて各マーカーのPCR産物の有無を半定量的に計測した。

#### 4. 研究成果

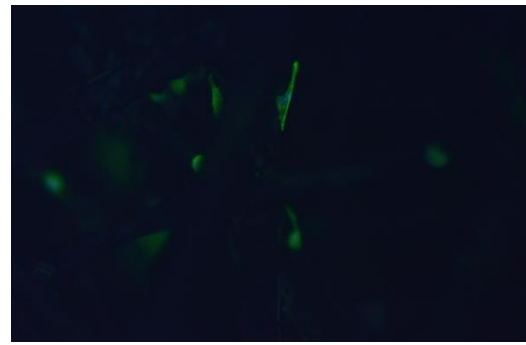
(1) チタンファイバーは直径50 $\mu$ mのものを使用し、空隙率が87%となるように作製した。分子プレカーサ法によるハイドロキシアパタイト薄膜コーティングでは、複雑なチタンファイバーの3次元構造を損なうことなく均一なハイドロキシアパタイト薄膜コーティングが行なえることが観察できた。

(2) 採取した唾液腺細胞は、細胞の濃度にしておよそ20000個/cm<sup>2</sup>であり、各顎下腺組織から得られる単一唾液腺細胞は約10000個/cm<sup>2</sup>であった。

(3) 播種した唾液腺細胞は播種後3~24時間後に接着し、コーティングプラスチックwell上では、24時間後よりコロニー形成が確認できた。ハイドロキシアパタイト薄膜コーティングチタンファイバースキャホールド上に播種した細胞は、非コーティングスキャホールドと比較し、細胞骨格が明瞭であった。

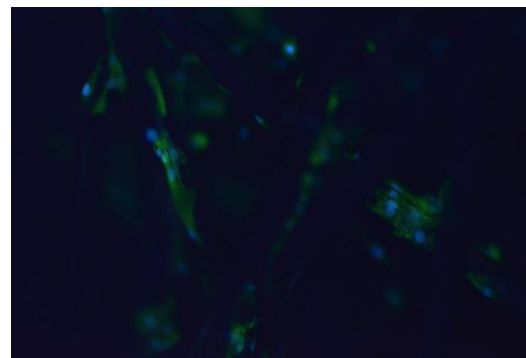


通常のプレート上に播種した唾液腺細胞の



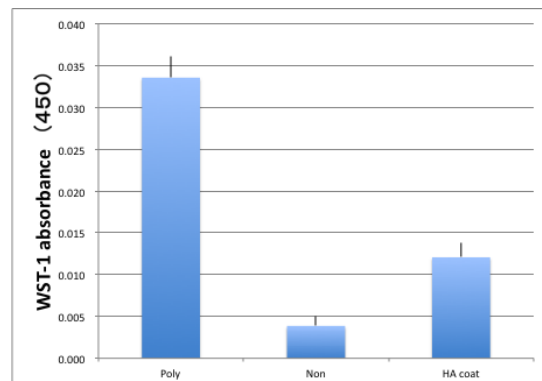
コロニー (播種後48時間後の観察)

非コーティングスキャホールドに播種した

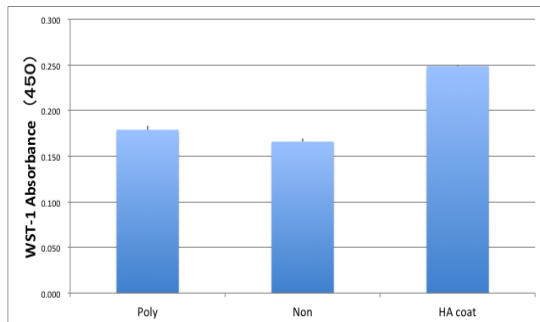


唾液腺細胞(24時間後)。細胞数は少なく、認める細胞も小さいものが多い。ハイドロキシアパタイト薄膜コーティングスキャホールドに播種した唾液腺細胞(24時間後)。細胞数は非コーティング群よりも多く、それぞれの細胞も大きい。

(4) 生細胞数の計測。細胞播種後、3時間、24時間、4日、7日後に生細胞数を計測したところ、24時間、4日後、7日後においてハイドロキシアパタイト薄膜コーティング群が有意に高い生細胞数を示した。



24時間後のWST-1試験。ハイドロキシアパタイト薄膜コーティング群(右)が非コート群よりも有意に高い生細胞数を示す。



7日後のWST-1試験。ハイドロキシアパタイト薄膜コーティング群(右)が非コート群よりも有意に高い生細胞数を示す。

(5) 細胞播種後の生細胞数。播種後3時間後、24時間後、4日後、7日後における生細胞数の実測数は、播種後3時間後においては、12wellプレート1wellあたり、非コーティング群では平均4個/cm<sup>2</sup>であったのに対し、ハイドロキシアパタイト薄膜コーティング群では1wellあたり平均7個/cm<sup>2</sup>であった。播種後24時間後では、非コーティング群では1wellあたり8個/cm<sup>2</sup>の細胞を認めたのに対し、ハイドロキシアパタイト薄膜コーティング群では1wellあたり13個/cm<sup>2</sup>であった。播種後4日目での細胞数は、非コーティング群では1wellあたり平均19個/cm<sup>2</sup>であったのに対し、ハイドロキシアパタイト薄膜コーティング群では1wellあたり21個/cm<sup>2</sup>であった。播種後7日目での細胞数は、非コーティング群では1wellあたり平均29個/cm<sup>2</sup>であったのに対し、ハイドロキシアパタイト薄膜コーティング群では1wellあたり41個/cm<sup>2</sup>であった。

(6) 唾液腺細胞マーカーのRT-PCRでは唾液腺細胞マーカーはサイトケラチンのみ同定され、その他のマーカーは同定できなかった。

サイトケラチンは非コーティングスキャホールド群、ハイドロキシアパタイト薄膜コーティングスキャホールド群両方で認められ、両者の発現に有意な差は認められなかった。またナノドロップにおけるtotalRNA量に関しても、両群の間に有意な差は認められな

った。

## 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)

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

青木 伸二郎 (AOKI SHINJIRO)

横浜市立大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：50231759

### (2) 研究分担者

廣田 誠 (HIROTA MAKOTO)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：20347305

### (3) 連携研究者

なし