

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293416

研究課題名(和文)細胞移植による唾液腺再生メカニズムの解明と臓器再生を目指した器官培養法の開発

研究課題名(英文)The investigation on salivary gland regeneration mechanisms with cell transplantation and the development of salivary gland organ regeneration

研究代表者

各務 秀明(Kagami, Hideaki)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：80242866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌に対する放射線治療により唾液腺は萎縮し、口腔乾燥が引き起こされる。口腔乾燥によって咀嚼、嚥下などさまざまな障害が引き起こされるが、根治できる治療法はない。本研究では、細胞を用いた再生医療により、萎縮唾液腺の再生の可能性とそのメカニズムについて検討を行った。骨髄間質細胞(間葉系幹細胞)のみならず、骨髄単核球細胞およびヒト臍帯由来間葉系幹細胞の移植により、放射線照射による唾液腺機能の回復が得られることが明らかとなった。また、in vitroモデルを用いた検討により、この効果は液性因子によって引き起こされ、特に腺房細胞の機能回復によることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Radiation for head and neck cancer induces salivary gland atrophy, which leads to xerostomia. Xerostomia affects various oral functions and causes masticatory dysfunction and swallowing problem. However, there is no treatment to regenerate damaged glands. In this study, we focused on cell-based regenerative medicine to explore the possibility to regenerate atrophic salivary gland and also its potent mechanisms. Not only bone marrow stromal cells but also monocytes from bone marrow aspirate and human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells can induce recovery of saliva flow after radiation damage. From in vitro model study, it has been suggested that the molecules from transplanted cells induce the functional recovery of acinar cells, which may lead to the recovery of saliva flow from the damaged gland.

研究分野：再生医療

キーワード：唾液腺 放射線障害 骨髄単核球細胞 骨髄間質細胞 臍帯由来間葉系幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

唾液腺萎縮症と再生研究：唾液腺の萎縮は、口腔腫瘍の放射線治療やシェーグレン症候群などによって引き起こされる。腺組織の萎縮によって唾液量が減少するため、う蝕や歯周疾患の悪化のみでなく、義歯の不適合、咀嚼、嚥下困難、そして味覚異常などのさまざまな障害が起こる。しかしながら、現在の治療は副交感神経刺激薬による分泌増加や人工唾液など一時的な治療であり、萎縮した腺組織そのものを再生させる方法はない。これまで再生医療が実用化されている皮膚、粘膜、軟骨、骨などと比べて、唾液腺は導管系を持ち、血管や神経が高度に組織化された複雑な臓器である。現在のところ臓器再生のハードルは高く、いまだ基礎研究段階にある。

臓器再生法の一つとして、臓器全体の再生ではなく、疾患によって失われた細胞のみをドナー臓器から単離し、移植する治療方法が行われている。最も広く行われているのは白血病患者に対する骨髄移植である。また、近年糖尿病患者への膵島移植が研究され、細胞調製法や移植法の改良により、80%以上の患者が糖尿病から離脱可能であることが報告されている。しかしながら細胞移植治療における大きな問題はドナー不足であり、他人からの移植（他家移植）であるため免疫拒絶も問題となる。もし、患者本人に残されたわずかな幹細胞を培養によって増幅し、治療に用いることができれば、免疫拒絶がなく、ドナーも不要な新たな治療が可能となる。したがって、現在の臓器再生研究の一つの方向性は、本人の幹細胞を培養して移植し、失われた機能を再生する治療法の開発である。

唾液腺に関しても、機能回復のために幹細胞移植が試みられている。唾液腺より培養された組織幹細胞を放射線により障害を受けた唾液腺に移植することで唾液量は増加し、唾液腺機能は回復する。さらに、唾液腺以外から採取された体性幹細胞である間葉系幹細胞を移植しても、治療効果が得られることが明らかとなってきた。しかしながら、移植細胞の多くは腺組織の再生には関与せず、機能回復のメカニズムはわかっていない。さらに細胞移植による唾液量の増加は最大 1.5 倍程度であり、膵島移植のように重度の唾液腺萎縮の患者に対する効果は不十分である。そこで、細胞移植による再生メカニズムの解明により、さらに高い機能回復を達成するための研究が必要とされている。

細胞移植による萎縮唾液腺治療の有用性が示されているが、組織幹細胞の大半が失われるような重度の唾液腺萎縮では、治療が困難であることも予測される。このような重症例に対する根本的な治療は、唾液腺そのものを再生させることである。これまで、生体吸収性のポリマーで作製した足場上で細胞を培養するティッシュエンジニアリングの手法で、人工唾液腺の作製が試みられてきた。しかしながら、複雑な臓器の構造を再生する

ことは困難であり、十分な成果を上げていない (Kagami et al., 2010)。一方、臓器再生のために、発生過程を再現する方法が研究されている。臓器の発生は上皮-間葉相互作用によって行われるが、この過程を人為的に再現することで、小さな胚から複雑な形態を持つ臓器を作ることが出来る。さらに、歯などの比較的単純な臓器では、単離された胚の細胞や、培養細胞を用いても、上皮-間葉相互作用を人工的に再現可能であることが報告された (Duailibi et al., 2004)。本来唾液腺も含めた臓器の発生は類似のメカニズムであることが知られているが、唾液腺についても同様の方法が可能かについては検討されていない。

## 2. 研究の目的

本研究の最終的な目標は、幹細胞による萎縮唾液腺の新たな治療法の開発である。そのために、幹細胞移植による萎縮唾液腺組織の再生と、幹細胞を用いた臓器再生の2つのプロジェクトを実施する。これまでに確立した *in vitro* 放射線性唾液腺萎縮モデルを用いて、細胞移植による機能回復メカニズムの解明を行い、さらに効果的な治療法開発へつなげる。また、新規培養法により得られた唾液腺幹細胞と器官培養を用いることで、臓器再生の基盤技術を開発する。

1. これまでに確立した *in vitro* における唾液腺の放射線障害モデルを用いて、体性幹細胞との共培養による唾液腺細胞の機能回復を検証する。

2. 唾液腺の放射線障害モデルを用いた体性幹細胞との共培養において、培地中のタンパクと遺伝子発現の解析を行い、唾液腺組織の再生に関与する因子とターゲット細胞を明らかにする。

3. 唾液腺上皮幹細胞を器官培養へと移行し、上皮-間葉相互作用の再現による唾液腺原基再生のための手技を確立する。

## 3. 研究の方法

(1) 唾液腺の *in vitro* 放射線障害モデルを用いた体性幹細胞による唾液腺細胞の機能回復

終末分化した唾液腺上皮細胞の培養

細胞移植による機能回復のメカニズムを解析するためには、より単純な系、特に *in vitro* における放射線障害モデルが必要である。そこで、唾液腺上皮幹細胞の培養法を用いた。単離した唾液腺細胞をスフィア培養することで幹細胞分画を抽出した。さらに接着培養を継続することで、上皮細胞は導管、および腺房へと分化させた。

*in vitro* 放射線障害モデル

この唾液腺上皮細胞の培養系に対して放射線照射を行うことで、唾液腺細胞の増殖の抑制と機能低下が起こることを確認した。

共培養による解析

本研究では、放射線照射後に細胞移植に用

いられて治療効果が確認されている骨髄単核球分画(MNC)と共培養を行い、唾液腺の *in vitro* 放射線障害モデルにおいても、(MNC) による唾液腺の機能回復が認められるかを検証した。

次に、同様の共培養がヒト臍帯由来間葉系幹細胞で可能かどうかを検討した。研究協力者より臍帯由来間葉系幹細胞を入手し、解凍後洗浄を行った。得られた細胞を唾液腺上皮細胞とともに共培養を行い、生存可能であることを確認した。さらに、放射線照射後に腺房細胞マーカーおよび導管マーカー遺伝子の発現を Real time PCR にて解析し、機能回復の程度について検討を行った。

(2) 共培養系における細胞動態の解明と培地中のタンパク、および唾液腺細胞における遺伝子発現の網羅的解析

#### 細胞動態の解明

共培養における機能回復のメカニズムを明らかにするために、アポトーシス細胞と増殖する細胞分画を明らかにすることで、機能回復を担っているターゲット細胞の分画の解明を試みた。

#### 遺伝子発現の網羅的解析

実際に唾液腺細胞に対する作用については、共培養後の唾液腺上皮細胞における網羅的遺伝子解析が必要である。特に間葉系幹細胞由来の因子を特定するために、遺伝子発現の網羅的解析を行った。臍帯由来間葉系幹細胞および骨髄間質細胞を対照として total RNA を抽出し、発現遺伝子の網羅的解析を行った。

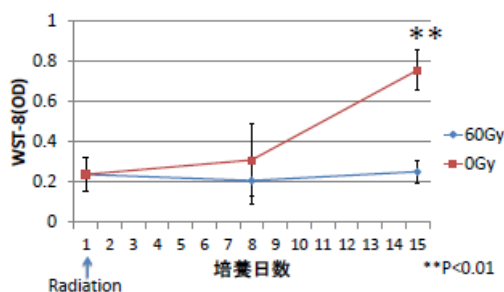
(3) 培養唾液腺上皮幹細胞と器官培養系を用いた上皮 間葉相互作用の再現と唾液腺原基再生

培養唾液腺上皮幹細胞については、の培養法により得られる細胞を、分化させない条件(50-60%コンフルエントの状態における継代)により得る。培養によって得られた間葉系幹細胞と共培養を行うことにより、形態変化により解析をおこなった。

## 4. 研究成果

### *in vitro* 唾液腺機能障害モデル

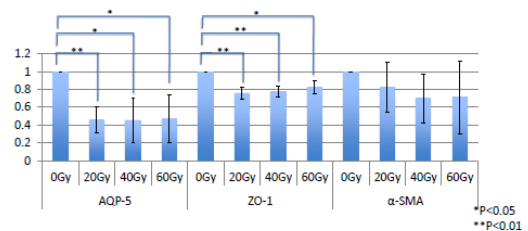
下の図に示すように、唾液腺上皮細胞の培養系に対して放射線を 60 Gy 照射することで、唾液腺上皮細胞の増殖は抑制された。



*in vitro* 唾液腺萎縮モデルにおける遺伝子

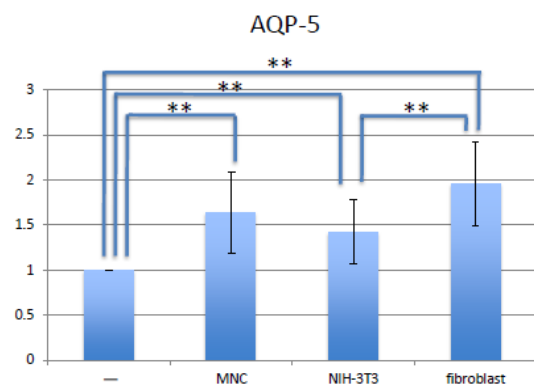
## 発現

60 Gy 放射線照射後の遺伝子発現を解析したところ、腺房細胞マーカーである AQP-5 と導管マーカーである ZO-1 の遺伝子発現の低下を認めたが、筋上皮細胞マーカーである SMA の発現には有意な低下を認めなかった。



### 骨髄単核球 (MNC) による腺房マーカーの発現回復

骨髄単核球による機能回復を検討するため、*in vitro* 唾液腺萎縮モデルを用いて、腺房マーカーである AQP-5 の遺伝子発現への影響を検討した。

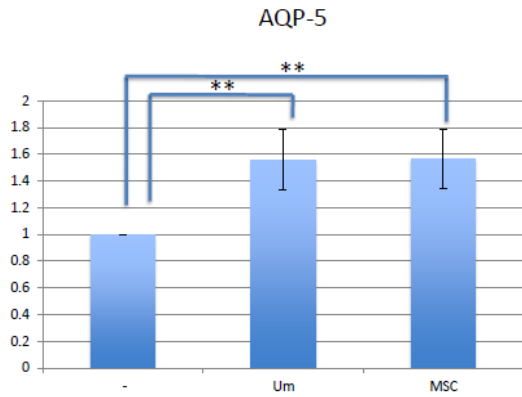


MNC との共培養では、AQP-5 遺伝子発現の有意な増加が認められた。コントロールとして使用した NIH-3T3 およびマウス線維芽細胞でも同様の効果が認められた。その効果は NIH-3T3 と比較して MNC および線維芽細胞で有意に高かった。

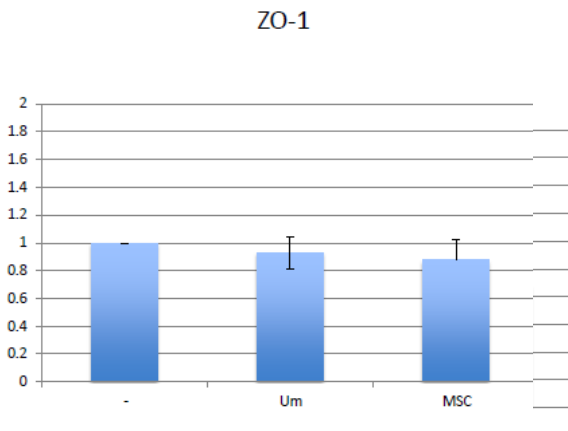
### 臍帯由来間葉系幹細胞による機能回復

次に、将来的に有望な治療用細胞源として、ヒト臍帯由来間葉系幹細胞が考えられる。これは治療用細胞として安全性を検証された細胞が凍結保管されており、必要に応じて移植することが可能である。今回製剤化されているヒト臍帯由来間葉系幹細胞を用いて、同様の効果が得られるかどうかを検証した。また、コントロールとしては、すでに唾液腺機能回復効果が知られている骨髄間質細胞(骨髄由来間葉系幹細胞)を用いた。

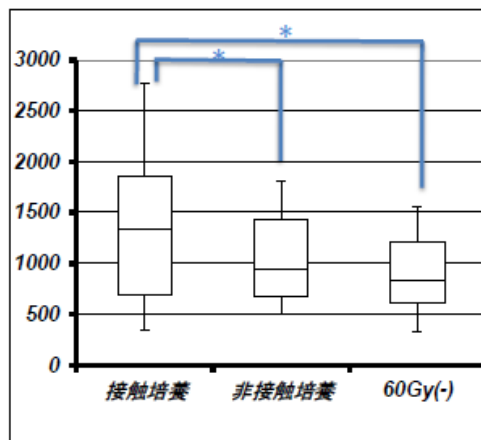
唾液腺腺房マーカーである AQP-5 の発現は、臍帯由来間葉系幹細胞と共培養を行う事で回復した。また、その程度は骨髄間質細胞と同程度であった。



次に、同様の検討を導管マーカーであるZO-1について行った。ZO-1への放射線照射の影響は腺房マーカーと比較して少なく、また共培養によって明らかな改善は認められなかった。



腺房機能回復のメカニズムに関する検討  
腺房機能の回復が共培養によって再現可能なことが明らかとなった。この共培養は非接触で行われるため、幹細胞由来の増殖因子、あるいは microRNA などによる影響が考えられた。その一方で、細胞間の接触による直接の影響があるかについては明かではない。したがって、本研究では細胞間の接触が及ぼす影響についても検証を行った。

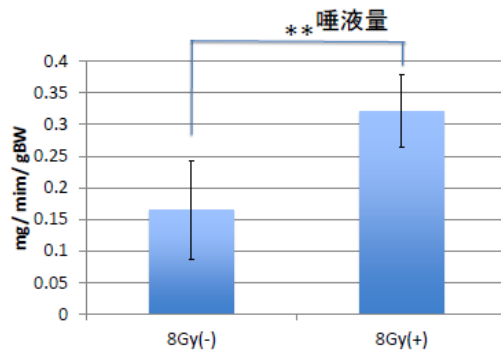


コントロールとしては非接触培養における細胞数を用いた。接触培養では単離した細胞数を直接計測することは困難であったため、上皮細胞コロニーを撮影し、その大きさの変化を計測した。その結果、接触培養では細胞増殖の回復が認められた。一方、非接触培養では細胞増殖の回復は認められなかった。

#### in vivo モデルによる機能回復

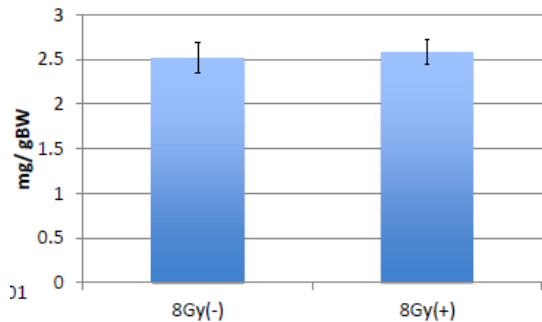
次に、実際の in vivo 唾液腺萎縮モデルを作製し、臍帯由来間葉系幹細胞における唾液腺機能回復効果について検討を行った。マウス頸部にエリアを局限して 8 Gy 照射を行うことで、唾液腺機能低下を認めることを確認した。それ以上の照射量では放射線障害により死亡するマウスが多くなったため、この照射量とした。

尾静脈より X 線照射時と 1 週後に  $1 \times 10^6$  個の臍帯由来間葉系幹細胞を注入した。コントロールとしては、同数のヒト骨髄間質細胞を用いた。



その結果、細胞移植により有意に唾液量の回復が認められた。

#### 顎下腺重量



その一方で唾液腺重量の変化は認められなかったことから、唾液量の回復は唾液腺細胞数の回復より、機能の回復によるものと推測された。

#### 遺伝子の網羅的解析

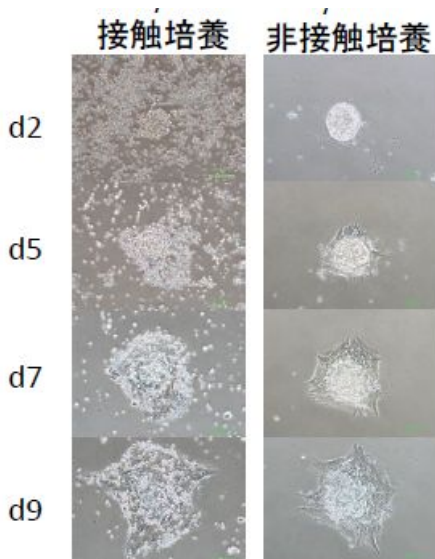
間葉系幹細胞由来の液性因子が唾液腺機能回復には影響していることが明らかとな

\* : P < 0.05

った。その因子について解析を進めるため、臍帯由来間葉系幹細胞の発現遺伝子について網羅的解析を行うこととした。その方法はRNAseqを用いた解析とし、骨髄間質細胞と比較することで、間葉系幹細胞に共通する因子を抽出した。さらに、それらの中で細胞の機能回復に影響すると考えられる候補遺伝子を抽出した。約300の候補遺伝子の中から、機能に着目してさらに絞り込みを行ったが、現時点では候補遺伝子の特定にはいたっていない。

上皮 間葉相互作用による器官形成について

これまで胚由来の上皮細胞あるいは間葉系幹細胞を用いた共培養にて、器官形成が起こることが示されている。しかしながら、これらの培養では、再生のために胚を破壊する必要があり、また細胞源を治療のために確保することは困難である。本研究では、これまでに開発した成体唾液腺由来の培養された唾液腺上皮幹細胞と間葉系幹細胞との共培養による器官形成の可能性について検討を行った。



接触により唾液腺上皮細胞は腺房マーカーの発現は増加し、導管マーカーの発現には変化は見られなかった。このことから、間葉系幹細胞との接触による機能分化を確認することはできたが、試みた条件下では胚の再生は認められなかった。

まとめと考察

放射線照射による唾液腺萎縮の治療法の開発のため、in vitro および in vivo における唾液腺萎縮モデルを作製し、検討を行った。in vitro モデルにおいては、骨髄液中の単核球細胞、骨髄間質細胞（間葉系幹細胞）およびヒト臍帯由来間葉系幹細胞とヒト骨髄間質細胞との比較検討を行った。その結果、培養を行わない骨髄単核球細胞でも、一定の唾液腺機能の回復が認められたが、その効果

はわずかに培養された骨髄間質細胞より少なかった。また、ヒト臍帯由来間葉系幹細胞では、骨髄由来の間葉系幹細胞と同等の機能回復が見られたことから、今後の臨床応用に向けて有用な細胞源と考えられた。

細胞による唾液腺機能の回復は、接触と非接触とで異なる可能性が示唆された。接触では細胞増殖の促進、非接触では腺房細胞の機能回復が主な作用と考えられた。ただし、具体的な候補となる液性因子については今後さらに検討する必要がある。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

Kawasaki T, Sumita Y, Egashira K, Ohba S, Kagami H, Tran SD, Asahina I. Transient exposure to hypoxic and anoxic oxygen concentrations promotes either osteogenic or ligamentogenic characteristics of PDL cells. *Biores Open Access*. (査読有) 4:175-187, 2015.

Hori A, Agata H, Takaoka M, Tojo A, Kagami H. Effect of cell seeding conditions on the efficiency of in vivo bone formation. *Int J Oral Maxillofac Implants* (査読有), 31:232-239, 2016.

Akiyama H, Kobayashi K, Ichimura M, Tone H, Nakatani M, Inoue M, Tojo A and Kagami H. Comparison of Manual and Automated Cultures of Bone Marrow Stromal Cells for Bone Tissue Engineering. *J Bioeng Biosci* (査読有) 120:570-576, 2015.

Zhang Y, Li X, Chihara T, Mizoguchi T, Hori A, Udagawa N, Nakamura H, Hasegawa H, Taguchi A, Shinohara A, Kagami H. Comparing immunocompetent and immunodeficient mice as animal models for bone tissue engineering. *Oral Diseases* (査読有), 21:583-592, 2015.

Matsuoka F, Takeuchi I, Agata H, Kagami H, Shiono H, Kiyota Y, Honda H, Kato R. Characterization of time-course morphological features for efficient prediction of osteogenic potential in human mesenchymal stem cells. *Biotechnol Bioeng*. (査読有) Vol.111, No.7, 2014, pp1430-1439.

Xia D, Sumita Y, Liu Y, Tai Y, Wang J, Uehara M, Agata H, Kagami H, Fan Z, Asahina I, Wang S, Tran SD. GDFs promote tenogenic characteristics on human periodontal ligament-derived cells in culture at late passages. *Growth Factors*. (査読有) Vol. 31, No. 5, 2013, 165-713.

Matsuoka F, Takeuchi I, Agata H, Kagami H, Shiono H, Kiyota Y, Honda H, Kato R.

Morphology-based prediction of osteogenic differentiation potential of human mesenchymal stem cells. PLoS One. (査読有) Vol. 8, No. 2, 2013, e55082.

Kagami H. The potential use of cell-based therapies in the treatment of oral diseases. Oral Dis (査読有). 21:545-549, 2015.  
Kagami H., Agata H, Inoue M, Asahina I, Tojo A, Yamashita N, Imai K. The use of bone marrow stromal cells (bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells) for alveolar bone tissue engineering: basic science to clinical translation. Tissue Eng Part B Rev(査読有). 20:229-232, 2014.

Agata A, Sumita Y, Asahina I, Tojo A, Kagami A. Ischemic culture of dental pulp-derived cells is a useful model in which to investigate mechanisms of post-ischemic tissue recovery. Histol Histopathol (査読有). 28:985-991, 2013.  
Tanigawa T, Yamashita JI, Sato T, Shinohara A. Shibata R, Ueda H, Sasaki H Efficacy and safety of pilocarpine mouthwash in elderly patients with xerostomia, Spec Care Dentist (査読有). 35:164-169, 2015.  
井上実、縣秀樹、朝比奈泉、各務秀明 特集高齢者医療における再生医療の可能性 3. 歯科領域における再生医療。老年医学 Geriat Med (査読無). 52:131-134, 2014

〔学会発表〕(計 4件)

各務 秀明、井上 実、宮林 秀企、杉野 紀幸、田口明、朝比奈泉「骨髄間質細胞を用いた歯槽骨再生：骨再生過程の解析」日本口腔インプラント学会 第34回近畿・北陸支部学術大会、2015.1.31-2.1(発表2015.2.1)京都大学百周年時計台記念館・医学部芝蘭会館(京都市)  
秋山裕和、小林麻子、市村昌紀、刀禰宏司、中谷勝、東條有伸、各務秀明「手作業による培養」と「自動培養装置による培養」で得られた骨髄間質細胞の比較評価 第14回日本再生医療学会総会 2015.3.19-21(発表3.20)パシフィコ横浜(横浜市)  
堀 暁子、長村 登紀子、東條 有伸、各務 秀明 ヒト臍帯由来間葉系幹細胞を用いた放射線性唾液腺機能障害治療の可能性 第14回日本再生医療学会総会 2015.3.19-21(発表3.21)パシフィコ横浜(横浜市)  
堀暁子、縣秀樹、上嶋伸知、東條有伸、各務秀明 骨髄単核球による放射線性

唾液腺萎縮の機能回復 第13回日本再生医療学会総会 2014.3.4-6、京都国際会議場(京都市)

〔図書〕(計 4件)

Sumita Y., Asahina I, Tran SD, Agata H, Inoue M, Tojo A, Kagami H. Potential cell-based therapies for irreversibly damaged salivary glands and atrophic alveolar bone. "New Trends in Tissue Engineering and Regenerative Medicine - Official Book of the Japanese Society for Regenerative Medicine", ed. Hibi H, and Ueda M., Open access, 2014, Intech.

Kagami H. Optimization of stem cell expansion, storage, and distribution. Chapter 25, in "Stem Cell Biology and Tissue engineering in Dental Science", Eds. Ajaykumar Vishwakarma, Paul Sharpe, Songtao Shi and Murugan Ramalingam. pp. 323-331, 2014 Elsevier.

井上実 朝比奈泉 各務秀明 第2章 骨髄間質細胞を用いた骨再生治療法「歯科再生・修復医療と材料」新材料・新素材シリーズ シーエムシー出版、東京、pp10-16, 2015

篠原 淳(分担執筆)第18章 D口腔・顎顔面疾患のその他の治療 薬物療法「標準口腔外科学」第4版 pp496-503, 2015.

〔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

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

### (2)研究分担者

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

### (3)研究分担者

篠原 淳(SHINOHARA Atsushi)  
松本歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：90196402