

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 5 日現在

機関番号：32667

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670908

研究課題名(和文) 歯肉上皮幹細胞より分化誘導した唾液腺細胞の3次元唾液腺構築とその移植

研究課題名(英文) Regenerative three dimensional salivary gland from human gingival epithelial stem cell

研究代表者

石川 博 (ISHIKAWA, Hiroshi)

日本歯科大学・生命歯学部・その他

研究者番号：30089784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：感染の無いBFPの幹細胞から唾液腺を誘導分化させることにした。これに成功したので、歯肉上皮の薄片から上皮細胞を分離し、Friedenstein法にて上皮幹細胞を単離した。これをヒト唾液腺由来線維芽細胞と共培養して唾液腺上皮細胞へと分化誘導した後、還流培養により3次元唾液腺を構築させることに成功した。この介在部からは随意に3次元唾液腺を構築できる。介在部は大量のHIF-1 とVEGFを産生することが判明した。現在、放射線照射して作製した唾液腺不全マウスの口腔粘膜下と顎下腺に分化誘導して作成した唾液腺介在部を移植し、唾液腺分泌の有無を観察している。

研究成果の概要(英文)：First, induction decided to make a salivary gland differentiate from a stem cell of the BFP which has no infection. I succeeded in this, then an isolation an epithelial stem cell from a fragment of a gingival tissue by the Friedenstein method. In order to induced differentiation salivary gland epithelial cell, co-cultivation performed a human salivary gland origin fibroblast and isolated epithelial stem cell of gingival tissue. I succeeded to get salivary epithelial cell, then we try to build a three-dimensional salivary gland by a circumfusion culture. We isolated intercalated duct from these reconstructed salivary gland under a microscope. A three-dimensional salivary gland can be built voluntarily from this interstitial segment. It was revealed that the intercalated duct produces a great deal of HIF-1 and VEGF. Now, fragment of intercalated duct was implanted under the oral mucous membrane of scid mouse.

研究分野：再生医療の基礎研究

キーワード：ヒト唾液腺 歯肉上皮幹細胞 共培養 3次元唾液腺 唾液腺介在部 HIF-1alpha VEGF 移植

## 1. 研究開始当初の背景

唾液の欠乏による口腔乾燥症は著しく QOL を低下させる。そこで口腔乾燥症を再生医療で治療する試みが行われているが、現在は唾液腺の原基を動物の胎仔から分離して、マトリゲルや寒天中で幼弱な唾液腺が構築されるのを観察している段階である。あるいは、上皮幹細胞を培養下に唾液腺上皮細胞に誘導し、RT-PCR や免疫染色によって評価しているに過ぎない。我々は、マウスの 2 細胞期胚から作製した early ES 細胞とヒト唾液腺由来の線維芽細胞とを共培養して唾液腺上皮を培養下に分化誘導させることに成功した<sup>1)</sup>。当初、歯肉を採取したが枯草菌の感染が認められたため、まず感染の無い BFP の肝細胞を細胞源として使うことにした。

## 2. 研究の目的

(1) 唾液腺の発生を考慮し、口腔内組織で容易に採取できる歯肉から上皮幹細胞を分離し、これとヒト唾液腺由来線維芽細胞とを共培養し、だれも成功していないヒトの 3 次元唾液腺を構築させる方法を開発する。つぎに、構築させた唾液腺から介在部を採取し、これを免疫不全動物の口腔粘膜下に移植し評価する。

(2) 放射線照射により唾液腺機能不全 scid マウスを作製し、この口腔粘膜下に 3 次元構築させた唾液腺介在部を移植して作成した唾液腺の機能を評価する。

## 3. 研究の方法

(1) ヒトの口腔内で感染の無い組織として頬脂肪体 (BFP) を選び、ここからの間葉系幹細胞と Friedstein 法で分離する。あるいは FACS (CD90, CD29, CD44) で分離する。ヒト唾液腺由来の線維芽細胞 (hSD-Fb) と間葉系幹細胞 (BFP 由来幹細胞) を共培養 (静置培養) して、唾液腺上皮を分化させる。培養液には DMEM/F12 + 15% FBS を用いる。共培養で成功したら、線維芽細胞を培養した conditioned medium で分化誘導できるか確かめる。分化誘導した上皮細胞

を scid マウスの顎下腺に移植し、ヒトの細胞が唾液腺を作ること、s-アミラーゼを産生していることを確認する。歯肉上皮由来の幹細胞も BFP と同様の方法で分化誘導し唾液腺上皮を得る。

(2) 3 次元構築には、アテロコラーゲンビーズ (ミネラルオイル中で作製する) に分化誘導唾液腺上皮を旋回培養で付着させ (細胞ビーズと呼ぶ) これを旋回培養すると、短時間のうちに細胞ビーズが互いに接着して細胞ビーズ塊を形成する。細胞ビーズは球形であるため、培養液は塊の内部にまで入ることが出来る。この細胞ビーズ塊を Rose ' s chamber に入れ還流培養装置を用いて培養する。培養下に 3 次元構築した唾液腺を位相差顕微鏡、RT-PCR, 免疫染色で評価する。

(3) 細胞が産生する s-アミラーゼ、HIF-1、VEGF は ELISA にて assay する。

## 4. 研究成果

ヒト BFP 由来の幹細胞をヒト唾液腺由来線維芽細胞と共培養して分化誘導唾液腺上皮細胞をえた免疫による評価を (図 1) に示す。次に分化誘導唾液腺細胞を scid マウスの顎下腺に移植した。移植した細胞はホストの顎下腺内に散在して存在するのではなく、唾液腺を囲む被膜下にヒトの唾液腺組織を形成した (図 2)。新たに形成された唾液腺組織がヒトの細胞で構成されていることを、ヒトのミトコンドリアの特異抗体を用いた免疫染色と s-アミラーゼ、AQP-5 の発現を RT-PCR で確認した (図 2)。生体内で唾液腺組織を構築することが明らかになったので、コラーゲンスポンジ内に分化誘導した唾液腺上皮細胞を注入して培養したところ、3 次元構築した唾液腺を形成した (図 3)。また分泌機能の存在を推察するため、s-アミラーゼ、AQP-5 の発現を RT-PCR で確認した (図 3)。s-アミラーゼの産生には、3 次元構造が必須であるか否かを確かめるため、唾液腺由来線維芽細胞と BFP 由来幹細胞との共培養、BFP 由来幹細胞のみ、唾液腺由来線維芽細胞のみ、骨髄由来線維芽細胞と BFP 由来幹細胞、皮下脂肪由来線維芽細胞と BFP 由来

幹細胞の組み合わせで、それぞれアミラーゼの産生量を調べた。その結果、分化誘導された唾液腺上皮細胞はアミラーゼを産生するが、その産生は3次元唾液腺を形成させると約20倍高まった(図4)。これらの結果を基に、歯肉上皮幹細胞から培養下に唾液腺を構築させることを試みた。アテロコラーゲンビーズに分化誘導して作成した唾液腺上皮細胞を巡回培養法で接着させて培養し細胞ビーズ塊を作製する。これをRose's chamberに入れて唾液腺由来線維芽細胞のconditioned mediumを添加した培養液で還流培養すると3次元唾液腺構築物を作った。3次元構築過程を位相差顕微鏡で観察すると唾液腺の介在部(腺房が付着している管)から小さな腺房が出芽することが確認できる(図5)。S-アミラーゼの産生は3次元構築した唾液腺の方が誘導唾液腺上皮細胞に比べて非常に高かった(図6)。そこで介在部を実体顕微鏡下に採取し3次元唾液腺が形成されることを確かめた。また、Scid マウスへの移植が成功するか否かを推定するために3次元構築唾液腺を低酸素下(5%O<sub>2</sub>)にて3日間培養した際のHIF-1とVEGFの産生量をassayした(表1)。低酸素下にHIF-1が産生され、これがVEGFの産生を誘導することが推定されたので、現在、3次元構築唾液腺の介在部をscid マウスの口腔粘膜下に移植し、唾液腺が構築されるか否かを確かめている。

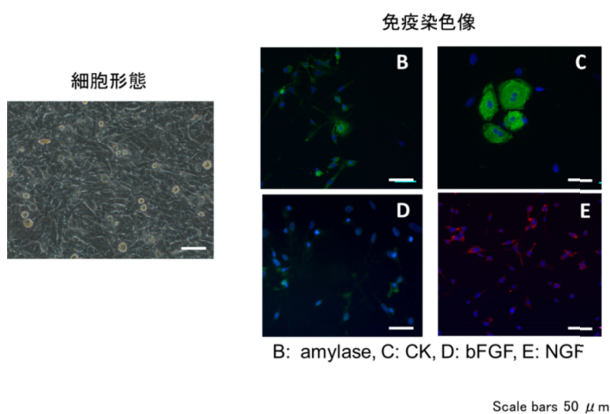


図1 分化誘導後の唾液腺細胞

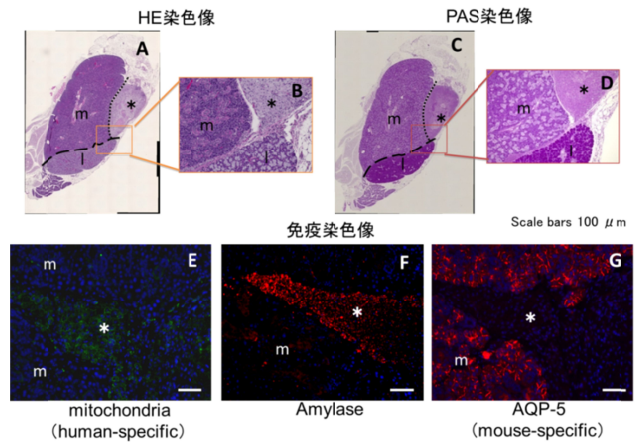


図2 scid マウスへの移植

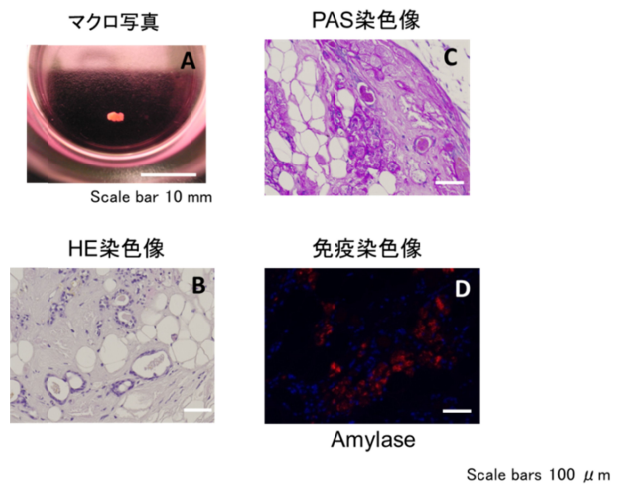


図3 コラーゲンスポンジ内での3次元培養

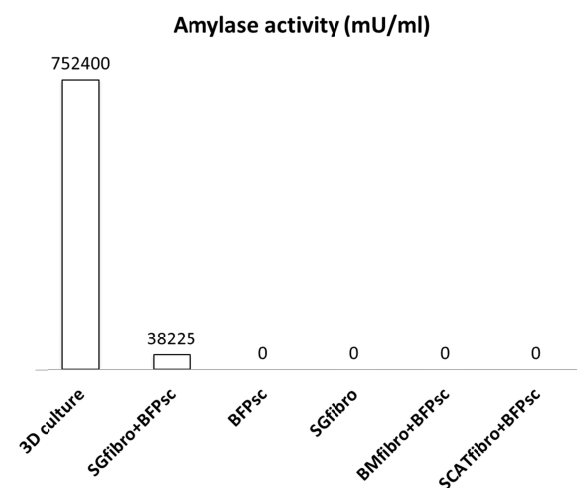


図4 頬脂肪体幹細胞から誘導分化させた唾液腺上皮細胞のS-アミラーゼ産生の比較

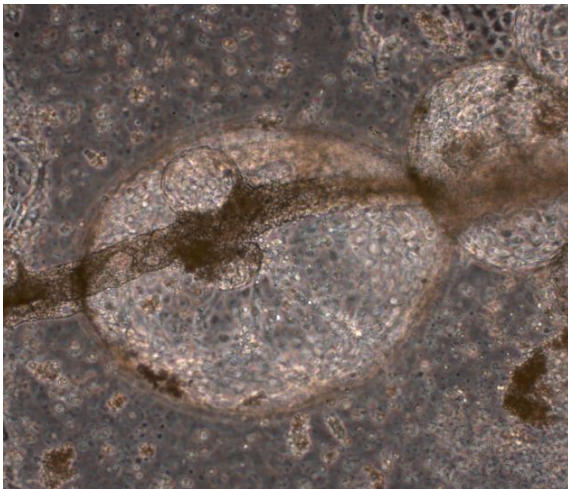


図5 歯肉上皮幹細胞からの唾液腺形成

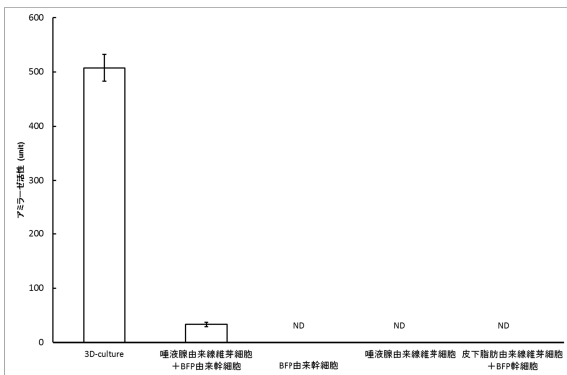


図6 歯肉上皮幹細胞から誘導分化させた唾液腺上皮細胞のS-アミラーゼ産生の比較

表1 3次元構築唾液腺を低酸素下(5%O<sub>2</sub>)にて3日間培養した際のHIF-1とVEGFの産生量

サンプル	A	B	C
HIF-1 (ng/ml)	16.3	17.2	16.5
VEGF(ng/ml)	21.6	18.7	20.6

#### 引用文献

Kawakami M, Ishikawa H, Tachibana T, Tanaka A, Mataga I. Functional transplantation of salivary gland cells differentiated from mouse early ES cells in vitro. Human Cell (2013) 26:80-90.

#### 5. 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕

Kawakami M, Ishikawa H, Tanaka A, Mataga I. Induction and differentiation of adipose-derived stem cells from human buccal fat pads into salivary gland cells. Human Cell DOI 10, 1007/s13577-016-0132-z (2016). 査読有

##### 〔学会発表〕

川上未有希、石川博、高橋悠、大山晃弘、中原貴、田中彰。歯科領域にて採取可能な生体材料を用いたオーダーメイドの唾液腺再生医療に関する検討。平成26年度日本歯科大学歯学会第1回ウインターミ-ティング、日本歯科大学生命歯学部九段ホール(千代田区)、2015年12月13日

望月真衣、中原貴、石川博。マウス多能性幹細胞とヒト体性幹細胞の細胞周期に基づいた増殖能の比較解析。第33回日本ヒト細胞学会、ホテルスカイタワー(宮崎市)、2015年8月22日

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

石川 博 (ISHIKAWA, Hiroshi)  
日本歯科大学・生命歯学部・客員教授  
研究者番号：30089784

##### (2) 研究分担者

中原 貴 (NAKAHARA, Taka)  
日本歯科大学・生命歯学部・教授  
研究者番号：10366768

大山 晃弘 (OHYAMA, Akihiro)  
日本歯科大学・生命歯学部・准教授  
研究者番号：90538232

豊村 順子 (TOYOMURA, Junko)  
日本歯科大学・生命歯学部・助教  
研究者番号：80645630

川上 未有希 (KAWAKAMI, Miyuki)  
日本歯科大学・新潟生命歯学部・助教  
研究者番号：4 0 7 0 7 9 8 1

富永 徳子 (TOMINAGA, Noriko)  
日本歯科大学・生命歯学部・助教  
研究者番号：9 0 5 4 6 5 3 2