

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861668

研究課題名(和文) 唾液腺細胞の長期安定培養法を用いた唾液腺機能再生療法の開発

研究課題名(英文) Establishment of long-term stability culturing system for salivary gland cells

研究代表者

笠松 厚志 (KASAMATSU, Atsushi)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60375730

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)：唾液分泌量の低下は口腔機能障害の原因となり、QOLに直結する問題になってしまう。唾液腺機能再生の研究が必要とされているが、現在有効なデータがなく、対症療法が主体の治療になっている。今回我々は、Rho Kinase作用薬を用いた新規の唾液腺培養法を考案し、その有用性の検索を行った。結果として、Rho Kinase作用薬を用いて長期培養を行い、放射線によって萎縮しているヌードラットの顎下腺に細胞移植したところ、唾液腺細胞非移植群に比べ、移植群において唾液流出量の回復を確認した。したがって、本研究が近い将来、放射線照射後等の重症口腔乾燥症患者の唾液腺機能回復につながると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Salivary glands (SGs) are one of the necessary organs for maintaining human oral health, and their functions are degenerated by various reasons, including radiation therapy for head and neck cancers. The irreversible damage of salivary gland degrades quality of life. Therefore, developments of therapies for a regeneration of salivary gland are clearly required, however current therapies for hypofunction of the salivary gland only depend on symptomatic therapy. In this study, we presented a new cell-based therapy for a regeneration of SG using Rho kinase inhibitor. The salivary flow rate was dramatically improved after transplantation of SG cells into nude rat SGs via a catheter. Thus, the present study might have the possibility of cell therapy for the damaged salivary gland and other organs in the future.

研究分野：医歯薬学

キーワード：唾液腺 長期培養 Rho Kinase 作用薬 唾液腺再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

放射線治療による唾液腺萎縮によって引き起こされる口腔乾燥症は、咀嚼障害・嚥下障害等の機能障害だけでなく、義歯の適合問題や多数歯齲蝕にも深く関与している。そこで唾液腺再生医療の研究が盛んに行われているものの、実用化には程遠いのが現状である。理由としては唾液腺細胞の初代培養が非常に困難である点があげられる。

本研究に先立ち、研究者は若手研究スタートアップおよび若手研究(B)において、ヒト唾液腺細胞の不死化を目指し正常唾液腺細胞(口唇腺由来)を Rho Kinase 作用薬を含む培地にて培養を行い、唾液腺細胞の初代培養を可能とした。その細胞は細胞増殖、細胞形態、唾液腺マーカー等の発現は正常唾液腺とほぼ同等の特徴を有しているため、唾液腺再生療法の糸口になることが大いに期待できる。さらに放射線治療前に患者の口唇腺から唾液腺細胞を採取し培養・増殖させ、治療後に萎縮した唾液腺に移植することで、我々の目指す唾液腺再生医療の最終段階に入る。

本研究では実験動物を用いて、唾液腺長期培養法で増殖させたラット唾液腺細胞を放射線性唾液腺萎縮ラットに移植し、唾液腺機能回復を検証するものである。本研究の結果を基に、再生医療の現場への応用が可能となれば、頭頸部癌放射線治療後の唾液分泌障害を持つ患者にとって朗報となる事は間違いない。

## 2. 研究の目的

本研究では実験動物を用いて、唾液腺長期培養法で増殖させたラット唾液腺細胞を放射線性唾液腺萎縮ラットに移植し、唾液腺機能回復を検証するものである。これらのデータは再生医療等の安全性の確保に関する法律に準ずる重要なデータとなり、今後の唾液腺再生医療の基盤データとなると考えられる。

## 3. 研究の方法

(1) ラットの唾液腺細胞を Rho Kinase 作用薬を用いた長期培養法にて増殖させ、形態および唾液腺マーカー等の発現を確認する。

- ① Rho Kinase 作用薬の有無によって引き起こされる細胞形態学的変化を細胞骨格の細胞免疫蛍光染色法を用いて解析する。
- ② 唾液腺特異的マーカーの発現解析をリアルタイム PCR、ウエスタンブロット法を用いて解析する。
- ③ 本研究に先立ち研究済みであるヒト口唇腺細胞の長期培養法と比較する。

(2) カテーテルを用いてラット顎下腺への細胞移植法を確立する。

・本研究に先立ちラット舌下小丘からチューブを挿入し、確実に顎下腺体内に交通していることを確認している。

- ① GFP ラット由来の顎下腺細胞をヌードラットの顎下腺に移植し免疫組織化学染色法を用いて生着を解析する。
- ② 効率的な生着をするための移植細胞数を検討する。

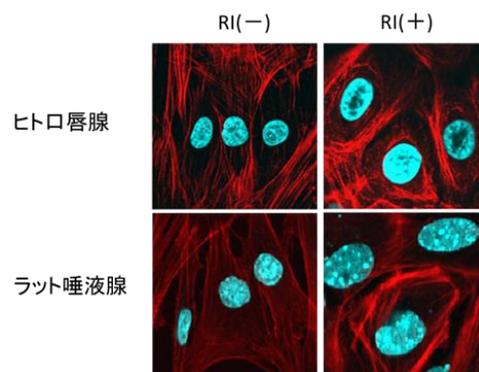
(3) 放射線性唾液腺萎縮ヌードラットの唾液腺機能回復の検証を行う。

- ① GFP ラット由来の顎下腺細胞を Rho Kinase 作用薬を用いて長期培養を行い、放射線によって萎縮しているヌードラットの顎下腺に移植する。
- ② 1週間おきに、移植を行ったヌードラットの腹腔内にピロカルピンを注射することで唾液分泌を促し、唾液腺細胞移植群と非移植群の唾液量の変化を比較する。

## 4. 研究成果

(1) ラットの唾液腺細胞を Rho Kinase 作用薬を用いた長期培養法にて増殖させ、形態および唾液腺マーカー等の発現を確認する。

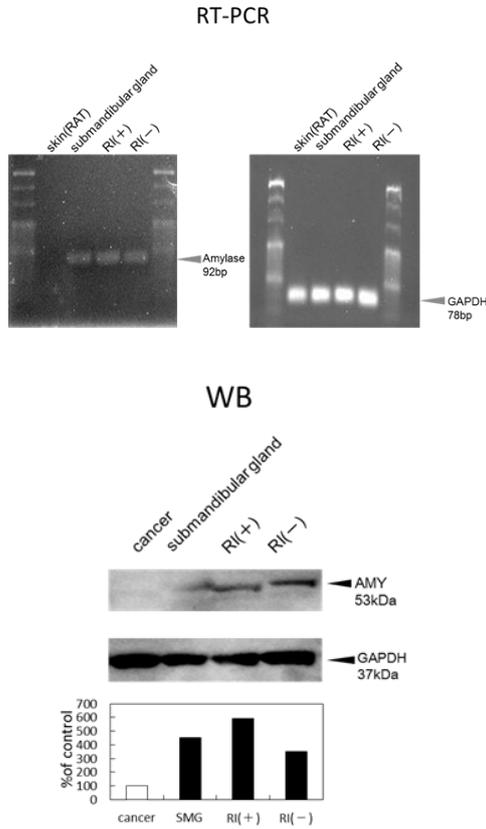
① Rho Kinase 作用薬の有無によって引き起こされる細胞の形態学的変化を免疫蛍光染色法を用いて解析したところ、ヒト口唇腺細胞およびラット唾液腺細胞ともに、Rho Kinase 作用薬を添加することで F-actin の走行に明らかな違いを認めた。Rho Kinase 作用薬によって唾液腺細胞に継代培養および初期形態の維持が可能になったメカニズムに Rock パスウェイが深く関与していることが示唆された。(図1)



赤:F-actin 青:細胞核

(図1:細胞骨格の発現確認)

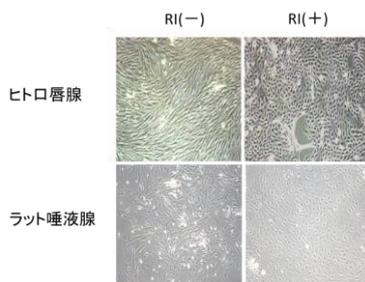
② ラットの唾液腺細胞を Rho Kinase 作用薬を用いた長期培養法にて増殖させ、唾液腺特異的マーカー (Amylase) の発現解析をリアルタイム PCR、ウエスタンブロット法を用いて解析した。(図 2)



(図 2: amylase の発現確認)

③ 先行実験[平成 24 年～平成 26 年若手研究 B]では、初代培養が困難であるヒト口唇腺細胞を Rho Kinase 作用薬を添加した培地で培養することで、唾液腺としての特徴を維持したまま継代可能な唾液腺長期培養法を確立した。

ラット唾液腺細胞においてもヒト口唇腺細胞と同様の処理を行うことで、形態を維持したまま培養が可能となった。(図 3)

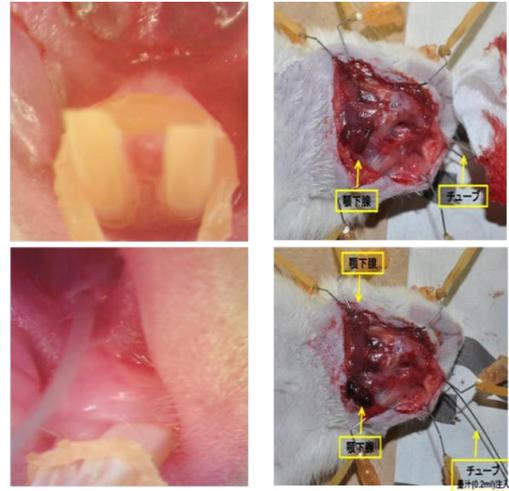


(図 3 ヒト口唇腺細胞とラット唾液腺細胞との長期培養法における比較)

(2) カテーテルを用いてラット顎下腺への細胞移植法を確立する。

[先行実験データ]

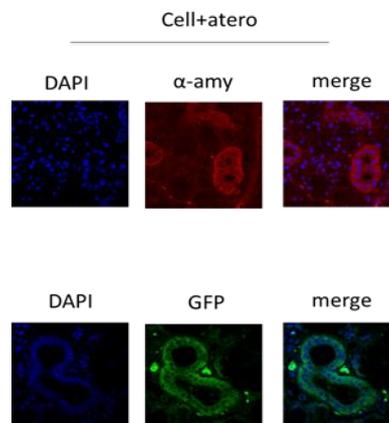
ラットの唾液腺開口部にカテーテルを挿入し顎下腺体へ墨汁の注入を行い、カテーテルを用いた顎下腺への細胞移植方法を決定している。(図 4)

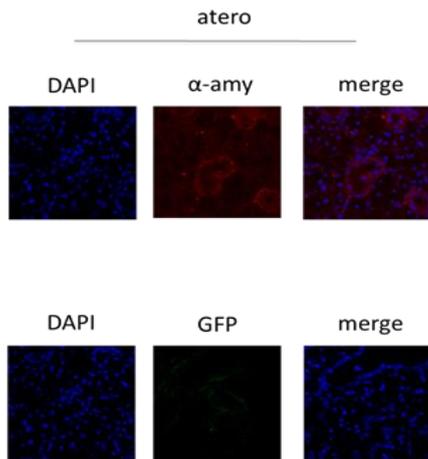


(図 4 左上:カテーテル挿入前  
右上:墨汁注入前  
左下:カテーテル挿入後  
右下:墨汁注後)

①, ②) GFP ラット由来の顎下腺細胞を Rho Kinase 作用薬を用いて長期培養を行い、カテーテル経由で細胞移植を行った。効率的に生着を認めたのは約  $2.0 \times 10^6$  個の顎下腺細胞を注入した条件であった。

GFP ラットの唾液腺細胞移植後、導管の周囲に GFP の蛍光細胞を認めた。(図 5)



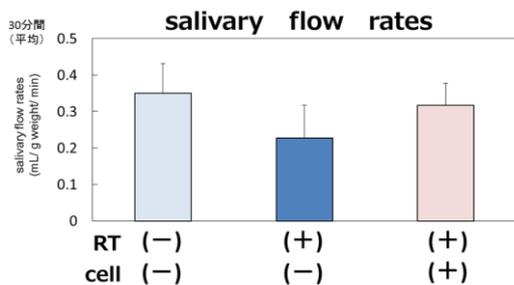


(図 5:GFP ラット由来細胞移植後の生着確認)

(3) 放射線性唾液腺萎縮ヌードラットの唾液腺機能回復の検証を行う。

ヌードラットの顎下腺に対し放射線 15Gy 単回照射を行い、放射線性唾液分泌量低下ラットを作成した。

①, ② Rho Kinase 作用薬を用いて長期培養を行い、放射線によって萎縮しているヌードラットの顎下腺に約  $2.0 \times 10^6$  個の顎下腺細胞を移植した。唾液腺細胞非移植群と比べ、細胞移植群においてピロカルピン刺激後の唾液流出量回復が確認された。(図 6)



(図 6 細胞移植後の唾液流出量の比較)

[まとめ]

本申請研究期間において、Rho Kinase 作用薬を用いた新規の唾液腺培養法を考案し、その有用性の検索を行った。Rho Kinase 作用薬を用いてラット唾液腺細胞の長期培養を行い、放射線によって萎縮しているヌードラットの顎下腺に約  $2.0 \times 10^6$  個の顎下腺細胞を移植したところ、唾液腺細胞非移植群に比べ、移植群において唾液流出量の回復が確認された。したがって、本研究結果は、今後の臨床応用の際に有益なデータになると思われる、頭頸部癌放射線治療後の唾液分泌障害を持つ患者にとって朗報となると考えられる。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠松 厚志 (KASAMATSU, Atsushi)  
千葉大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：60375730

(2) 研究分担者：なし

研究者番号：

(3) 連携研究者：なし

研究者番号：