HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	唾液腺組織に関連した再生医学研究の進展
Author(s)	高橋, 茂
Citation	北海道歯学雑誌, 35(1), 73-76
Issue Date	2014-09
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/57402
Type	journal article
File Information	35-01-11takahashi.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

最新の歯学

唾液腺組織に関連した再生医学研究の進展

The progress of the research for regenerative medicine related with salivary gland tissue

北海道大学大学院歯学研究科　口腔機能学講座　口腔機能解剖学教室
髙橋　　茂

1．はじめに

現代のライフサイエンスにおいて注目を浴びている研究テーマの１つとして再生医学が挙げられる．失われた組織や機能しなくなった器官の再生を目指す研究であり，幹細胞が基盤となる．良く知られている幹細胞は1981年にEvansらによって確立されたES細胞（embryonic stem cell：胚性幹細胞）[1]や2006年にYamanakaらによって確立されたiPS細胞（induced pluripotent stem cell：人工多能性幹細胞）[2]であろう．これらは当初いずれもマウスで作製されたが，ヒトES細胞がそれから17年後に確立され[3]，iPS細胞はわずか１年後にヒトでの作製に成功している[4]．そして，ヒト幹細胞の確立により再生医学研究は臨床応用に向け大きく前進した．一方，組織幹細胞は発生期だけでなく成体においても存在し，いろいろな組織や器官の損傷修復などに役立っている．この組織幹細胞を応用した再生研究は比較的古くから行われており，造血幹細胞を利用した骨髄移植のようにすでに臨床応用されているものもある．

幹細胞を利用した再生医学研究は様々な組織や器官を対象として行われているが，本稿では口腔内環境の維持に重要な役割を果たしている唾液腺組織に関連した再生医学研究をリードしている日本の二つの研究グループについて紹介させていただく．

2．器官原基法による唾液腺の再生

様々な器官の発生では，将来器官が形成される部位において上皮と間葉から器官原基が形成され，いわゆる上皮間葉相互作用によって発生が進行していく．辻らの研究グループではこうした器官の再生実現には，器官原基を人為的に再生するための三次元的な細胞操作技術の開発が必要であると考え[5]，マウス胎仔を用いて器官原基法を開発した[6]．この方法は上皮細胞と間葉細胞を分離し，それぞれを高濃度で凝集させコラーゲンゲルの中に交互に注入し区画化して配置するものである[5]．この方法を応用して作製した再生歯胚をマウス抜歯窩に移植し歯の再生に成功[7]，またマウス腎被膜下に移植し，歯，歯根膜，歯槽骨からなる歯ユニットを異所性に再生させることにも成功した[8]．

次に，辻らは毛の再生研究に器官原基法を応用した．毛包には成体においても上皮幹細胞，間葉幹細胞が存在しているので，成体マウスの毛包から細胞を採取して再生毛包原基を作製した．これをヌードマウスの皮膚内へ移植すると発毛が認められ[9]，立毛筋やこれに分布する神経線維も合わせて確認された[10]．以上の研究結果から，辻らが開発した器官原基法は再生医療にとってかなり有効な手段であると考えられる．さらに彼らはこの器官原基法によって唾液腺の再生に成功しており，その成果はNature Communicationsに掲載された[11]．以下にその研究内容の一部を紹介する．

まず，マウス胎仔から顎下腺，舌下腺を採取し，酵素を用いて上皮と間葉に分離した．次にコラゲナーゼⅠ，トリプシンによって単一化細胞を調整した後，器官原基法によって唾液腺原基を再構築し，その唾液腺原基を耳下腺，顎下腺，舌下腺をすべて除去したマウスの耳下腺管に接続し，咬筋上に30日間固定した．これらの組織を組織学的に観察してみると，通常の顎下腺や舌下腺と同様の組織像を呈し，PAS（過ヨウ素酸シッフ反応）染色に対しても正常唾液腺と同様の反応が認められた．また，膜水チャネルタンパクであるアクアポリン-5の発現が腺房細胞の腺腔側に蛍光抗体法によって確認された．筋上皮細胞に関してはマーカーであるカルポニンやα-アクチンの局在が腺房周囲に認められ，またこれらに連続するニューロフィラメント陽性反応が認められた．以上の所見は移植した再生唾液腺が形態学的に正常構造を有し，神経刺激に対して唾液を分泌しうることを示している．機能的な解析によると，再生唾液腺はピロカルピンを投与すると唾液分泌が誘導され，これはアトロピンにより抑制された．また，クエン酸による味覚刺激では正常唾液腺と同様の分泌反応を示していた．これらのことは，再生唾液腺が正常唾液腺と同様の唾液分泌能を有していることを示している．さらに，口腔乾燥に対する再生唾液腺の効果を検討するために，三大唾液腺すべてを除去したマウス（口腔乾燥モデルマウス）とこれに再生唾液腺を移植したマウスについて比較検討を行っている．まず，舌の上に蛍光色素ペーパーをつけてからピロカルピン刺激してみると口腔乾燥マウスでは蛍光色

素がその場に留まっているのに対して，移植マウスでは蛍光色素が時間の経過とともに周囲へ拡散していった．また，糸状乳頭の角化層の厚さを組織学的に測定してみると移植マウスの方が薄く，口腔細菌のコロニー形成能に関しては移植マウスの方が低いというデータが得られていた．これらの結果は再生唾液腺が口腔清浄能を有しており，口腔乾燥と細菌成長を阻害できるということを示している[11]．

この研究はマウスを用いた段階であるが，今後の発展により器官原基法による唾液腺の再生医療が現実のものになる日も遠くないものと思われる．補足しておくと，辻らのグループは涙腺に関する同様の研究も成功させており[12]，こちらはドライアイに対する根本的な治療法に発展する可能性を持っている．本項では唾液腺自身の再生に関する辻らのグループによる研究を紹介してきたが，次項では唾液腺組織幹細胞を利用して肝や膵の再生を目指している遠藤らのグループによる研究について紹介する．

3．唾液腺由来幹細胞による肝や膵の再生

唾液腺の損傷と修復に関しては臨床的な観点から比較的古くより実験的研究が行われてきた．その際，しばしば用いられてきたのが導管結紮・解除実験である．唾液腺の導管を結紮すると唾液腺は萎縮する．萎縮腺組織内では腺房細胞はアポトーシスによって消失する一方，導管細胞は残存する[13,14]．結紮を解除すると，残存していた導管細胞から腺房細胞が分化するとともに分化間もない腺房細胞が活発に増殖することによって唾液腺は再生することが明らかとなっている[15,16]．この現象に着目したのが遠藤らの研究グループである．彼らは萎縮唾液腺内に残存している導管細胞の中に唾液腺の組織幹細胞があり，その細胞には多分化能があるのではないかと考え，以下の研究に着手した．

ラット顎下腺の導管を６日間結紮した後，顎下腺を摘出し細胞分散液を調整した．これを培養し，小型上皮からなるコロニーを分離したものをラットSGP（salivary gland progenitor）細胞と名付けた．この細胞は肝や膵細胞の分化マーカーに対して陰性であったがⅠ型コラーゲン上で培養したところ，小細胞塊を形成するようになり肝細胞マーカー（アルブミン，アルファフェトプロテイン，サイトケラチン19等）や膵細胞マーカー（インスリン，グルカゴン）に対して陽性となった．一方，先程の細胞分散液を肝組織再生実験モデルラット（薬剤によって障害を受けた肝の部分切除実験）に移植すると，再生肝組織中にドナー由来の肝細胞や胆管上皮細胞が観察されたという[17]．次に彼らはマウスで実験を行った．萎縮顎下腺内では残存小型導管細胞は$Sca\text{-}1^{+}$，$c\text{-}kit^{+}$を示していたので，今度は導管結紮萎縮顎下腺を調整した細胞分散液からFACS（fluorescence-activated cell sorting）法により$Sca\text{-}1^{+}$，$c\text{-}kit^{+}$細胞を回収しマウスSGP細胞とした．マウスSGP細胞からマトリゲルを用いてスフェロイド体（三次元細胞塊）を形成させるとアルブミンとサイトケラチン19に陽性を示すようになり，このスフェロイド体を肝へ移植すると生着し，肝細胞へ分化した[18]．以上のラットやマウスを用いた研究はSGP細胞が組織幹細胞の特徴を有しており，肝や膵の細胞へ分化しうることを示している[17,18]．

幹細胞移植による再生医療をヒトへ適用することを考えると大動物を用いた実験的研究が必要である．そこで，遠藤らのグループは次にブタを用いて小動物と同様の実験を行い，ブタSGP細胞の分離に成功した．ブタSGP細胞から三次元細胞塊を形成させるとインスリン$^{+}$，アルブミン$^{+}$となり，また遺伝子発現も確認された．このことからブタSGP細胞も機能的に肝細胞や膵細胞へ分化できることが示された[19]．さらに，遠藤らはブタSGP細胞の核移植ドナーとしての可能性を探るために長嶋らと共同研究を実施した．その結果，ブタSGPを核移植ドナーとして用いた場合の胚盤胞形成率は胎児線維芽細胞を用いた場合の２倍以上できわめて高率であった．また，胚（計615個）を雌ブタの子宮に入れると計12匹のクローンブタが作製され（うち６匹は死産），生後16か月まで正常に発育することが確認された．これらのことはブタSGP細胞が核移植ドナーとしても優れていることを示している[20]．

ブタSGP細胞の確立に成功した遠藤らのグループは次にヒトSGP細胞に挑戦した．しかし，対象がヒトになるとこれまでの実験のように唾液腺の導管を結紮して効率よく細胞を回収することができなくなる．この問題点を解消するためにFACS法を用いることにした．ヒト歯肉腫瘍あるいは頬粘膜腫瘍手術の際，切除された耳下腺および顎下腺の正常部分の組織を研究対象とし懸濁液を作製した．これまでの動物実験から共通する細胞マーカーを組み合わせてFACS法を行い，試行錯誤の結果CD49f，Thy-1に対してともに陽性の細胞を回収した．これらをⅠ型コラーゲン上で培養すると活発に増殖し，他のSGP細胞と同様に細胞内ラミニンが陽性となったのでこの細胞をヒトSGP細胞とした．この時点ではヒトSGP細胞は膵細胞マーカーに対して陰性であったが，６日間三次元的に培養しスフェロイド体を形成させると，インスリン，C-ペプチド，グルカゴンに対して陽性を示すようになった．これらの結果はヒトSGP細胞が膵内分泌細胞への分化能を有していることを示唆している[21]．

遠藤らの確立したヒトSGP細胞は肝や膵の再生医療を目指す上で１つのアドバンテージを持っていると思われる．それは唾液腺が体表面に近い部分に位置しているので他の器官よりもその元となる組織を採取することが比較的容易であるということである．糖尿病の患者から局所麻酔下で唾液腺を採取し，作製したSGP細胞を移植して膵細胞の再生を図るといった医療が近い将来実現するかもしれない．

4．おわりに

本稿では唾液腺に関連した再生医学研究を行っている二つの研究グループについて紹介させていただいた．いずれの研究も進展著しいが最終的なゴールであるヒトへの再生医療適用までにはまだ多くの困難が予想される．それらを克服すべく，今後の両研究グループの健闘に期待したいと思う．

参考文献

1）Evans MJ, Kaufman MH : Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 292 : 154–156, 1981.

2）Takahashi K, Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126 : 663–676, 2006.

3）Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM : Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 282 : 1145–1147, 1998.

4）Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki N, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 131 : 861–872, 2007.

5）辻　孝：器官再生医療の実現に向けた戦略と研究の展開．Organ Biol 20 : 97–106, 2013.

6）Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, Ogawa M, Saitoh M, Tomooka Y, Tsuji T : The development of a bioengineered organ germ method. Nat Methods 4 : 227–230, 2007.

7）Ikeda E, Morita R, Nakao K, Ishida K, Nakamura T, Takanao-Yamamoto T, Ogawa M, Mizuno M, Kasugai S, Tsuji T : Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. Proc Natl Acad Sci USA 106 : 13475–13480, 2009.

8）Oshima M, Mizuno M, Imamura A, Ogawa M, Yasukawa M, Yamazaki H, Morita R, Ikeda E, Nakao K, Takano-Yamamoto T, Kasugai S, Saito M, Tsuji T : Functional tooth regeneration using a bioengineered tooth unit as a mature organ replacement regenerative therapy. PLoS ONE 6 : e21531, 2011.

9）Toyoshima K, Asakawa K, Ishibashi N, Toki H, Ogawa M, Hasegawa T, Irie T, Tachikawa T, Sato A, Takeda A, Tsuji T : Fully functional hair follicle regeneration through the rearrangement of stem cells and their niches. Nat Commun 3 : 784, 2012.

10）Asakawa K, Toyoshima K, Ishibashi N, Tobe H, Iwadate A, Kanayama T, Hasegawa T, Nakao K, Toki H, Noguchi S, Ogawa M, Sato A, Tsuji T : Hair organ regeneration via the bioengineered hair follicular unit transplantation. Sci Rep 2 : 424, 2012.

11）Ogawa M, Oshima M, Imamura A, Sekine Y, Ishida K, Yamashita K, Nakajima K, Hirayama M, Tachikawa T, Tsuji T : Functional salivary gland regeneration by transplantation of a bioengineered organ germ. Nat Commun 4 : 2498, 2013.

12）Hirayama M, Ogawa M, Oshima M, Sekine Y, Ishida K, Yamashita K, Ikeda K, Shimmura S, Kawakita T, Tsubota K, Tsuji T : Functional lacrimal gland regeneration by transplantation of a bioengineered organ germ. Nat Commun 4 : 2497, 2013.

13）Walker NI, Gobe GC : Cell death and cell proliferation during atrophy of the rat parotid gland induced by duct obstruction. J Pathol 153 : 333–344, 1987.

14）Takahashi S, Nakamura S, Suzuki R, Islam N, Domon T, Yamamoto T, Wakita M : Apoptosis and mitosis of parenchymal cells in the duct-ligated rat submandibular gland. Tissue Cell 32 : 457–463, 2000.

15）Takahashi S, Schoch E, Walker NI : Origin of acinar cell regeneration after atrophy of the rat parotid induced by duct obstruction. Int J Exp Pathol 79 : 293–301, 1998.

16）Takahashi S, Shinzato K, Nakamura S, Domon T, Yamamoto T, Wakita M : Cell death and cell proliferation inthe regeneration of atrophied rat submandibular glands after duct ligation. J Oral Pathol Med 33 : 23–29, 2004.

17）Okumura K, Nakamura K, Hisatomi Y, Nagano K, Tanaka Y, Terada K, Sugiyama T, Umeyama K, Matsumoto K, Yamamoto T, Endo F : Salivary gland progenitor cells induced by duct ligation differentiate into hepatic and pancreatic lineages. Hepatology 38 : 104–113, 2003.

18）Hisatomi Y, Okumura K, Nakamura K, Matsumoto S, Satoh A, Nagano K, Yamamoto T, Endo F : Flow cytometric isolation of endodermal progenitors from mouse salivary gland differentiate into hepatic and pancreatic lineages. Hepatology 39 : 667–675, 2004.

19）Matsumoto S, Okumura K, Ogata A, Hisatomi Y, Sato A, Hattori K, Matsumoto M, Kaji Y, Takahashi M, Yamamoto T, Nakamura K, Endo F : Isolation of tissue progenitor cells from duct-ligated salivary glands of swine. Cloning Stem Cells 9 : 176–190, 2007.

20）Kurome M, Tomii R, Ueno S, Hiruma K, Matsumoto S, Okumura K, Nakamura K, Matsumoto M, Kaji Y,

Endo F, Nagashima H : Production of cloned pigs from salivary gland-derived progenitor cells. Cloning Stem Cells 10 : 277-286, 2008.

21) Sato A, Okumura K, Matsumoto S, Hattori K, Hattori S, Shinohara M, Endo F : Isolation, tissue localization, and cellular characterization of progenitors derived from adult human salivary glands. Cloning Stem Cells 9 : 191-205, 2007.