

氏名(本籍)	常 楽 晃 (神奈川県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第4158号
学位授与年月日	平成18年7月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	<b>Tissue Engineering of Functional Salivary Gland Tissue</b> (機能を有する唾液腺組織の再生)
主査	筑波大学教授 医学博士 原 晃
副査	筑波大学教授 医学博士 野口雅之
副査	筑波大学教授 歯学博士 吉田 廣
副査	筑波大学助教授 博士(医学) 山縣邦弘

## 論文の内容の要旨

### (目的)

頭頸部腫瘍に対する化学療法、放射線治療により原疾患への非侵襲的治療が可能になってきたが、一方では照射領域に含まれる唾液腺も被爆するため、唾液腺機能低下にともなう口腔内乾燥は、原疾患治療後の quality of life を著しく低下させる。現在のところ唾液腺機能低下に対する根本的治療はなく、人工唾液の口腔内投与や残存する唾液分泌機能を刺激するコリン作動薬の投与など姑息的治療に限られている。そこで、放射線治療前に患者自身の唾液腺組織を採取、保存し、放射線治療後の唾液分泌機能低下に対して移植可能な形状の唾液腺組織を作製、移植することで唾液腺機能を補充することができれば、生理的な解決手段になるものと考えられる。本研究では、ヒトの唾液腺組織からの唾液腺上皮細胞の初代培養法を確立し、生体分解性のある poly glycolic acid 製のスカフォールドと組み合わせ、マウスの皮下に移植することで、水輸送タンパク、アミラーゼ産生能を備えた in vivo における唾液腺再生の可能性について検討した。

### (対象と方法)

ヒト唾液腺組織の使用にあたり IRB にて承認を受けた。患者からインフォームド・コンセントを受けた上で、頭頸部手術により合併切除されたヒト唾液腺の正常組織を用いて初代培養を行った。唾液腺組織を 1mm 角に細断し、エキスプラント法により Epithelial growth factor 5 ng/ml, Bovine pituitary extract を含む Keratinocyto-SFM 培養液を用いて、37℃で 5% CO<sub>2</sub> 環境下に初代培養を行った。培養細胞が唾液腺上皮細胞の phenotype を維持していることを確認するため、抗アミラーゼ抗体、抗 Aquaporin 5 抗体、抗 Cytokeratins AE1/AE3 抗体を用いて免疫染色を行った。次に、poly glycolic acid 繊維からなる 1×1×0.3 cm, 95% porosity を有するシート状のスカフォールドに 1cm<sup>3</sup> あたり 50×10<sup>6</sup> 個の唾液腺初代培養細胞をまき、麻酔下に免疫寛容マウスの皮下に総数 48 個を移植した。コントロールは細胞を使用せずスカフォールドのみを総数 16 個移植した。移植後 2, 4, 8 週に移植片を摘出し、HE 染色、免疫染色により腺構造再生の組織学的評価を行った。また、摘出した移植片から RNA およびタンパクを抽出し、それぞれ Reversed-Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) および Western blot により遺伝子ならびにタンパクレベルでの機能発現(アミラーゼ、Aquaporin 5)の確認を行った。移植した組織からのアミラーゼ分泌を証明するため、抽出した移植片を

1 ml の培養液中で 2 日間 ex vivo にて培養し、培養液中のアミラーゼ値を定量的に測定し評価した。

(結果)

培養皿にエクスプラントしたヒト唾液腺組織の細切片からは、約 5 日目までに細胞が接着、増殖し始めた。これらの初代培養細胞は少なくとも第 5 継代まで抗アミラーゼ抗体、抗 Aquaporin 5 抗体、抗 Cytokeratins AE1/AE3 抗体陽性細胞を含んでいた。唾液腺初代培養細胞を用いた in vivo 実験においては 2～4 週までにスカフォールド中で腺様構造を形成することが HE 染色により確認された。スカフォールド自体は移植後 8 週でほぼ完全に分解された。この腺様構造は、免疫染色で Aquaporin 5, Amylase, Cytokeratins AE1/AE3 に陽性であり、Western blot で同タンパクの存在が確認された。また、RT-PCR により唾液腺型アミラーゼおよび Aquaporin 5 の mRNA 発現が確認された。摘出した移植片の ex vivo 培養実験では培養液中の高いアミラーゼ活性が認められた。

(考察)

本研究の結果、ヒト唾液腺組織から唾液腺上皮細胞としての phenotype を維持した初代培養法が確立された。この初代培養細胞と生体分解性の poly glycolic acid のスカフォールドを組み合わせ移植し、生体内で腺構造の再生と、水輸送タンパクを保有していることが明らかとなり、再生した組織からはアミラーゼの産生も認められた。これらの結果から、ヒト唾液腺組織から上皮細胞を採取し、移植できる形態の唾液腺組織を作製し得ることが示唆された。

唾液成分の 99.5% は水であり、再生唾液腺が水分分泌機能を有することは重要である。本実験では移植部周囲に水の集積は認められなかったが、これは例え水分分泌があったとしても host の体内に吸収された可能性がある。一方、再生した腺構造を有する細胞は抗 Aquaporin 抗体陽性であり、同遺伝子の発現も認めたことから、唾液腺上皮細胞を介した腺腔内への水輸送機能を有している腺が形成されたことが示唆された。

スカフォールド内に再生した腺構造は、抗アミラーゼ抗体陽性であり、移植後 4 週目までは mRNA, タンパクレベルでの唾液腺型アミラーゼの発現が確認された。また、摘出した再生組織の ex vivo 培養では培養液中へのアミラーゼ分泌が直接証明された。

今回用いた、移植細胞の足場となるスカフォールドでは host における強い炎症反応は認められず、移植後 8 週目には分解、退縮したが、それにともない移植した唾液腺細胞も消退してしまった。これは移植部位である皮下が本来唾液腺組織の存在する環境ではないため、唾液腺組織として長期的に発育できなかったものと考えられる。

(結論)

ヒト唾液腺組織から確立したヒト初代唾液腺上皮細胞を用いて生体分解性のあるスカフォールドとともに移植することで、水輸送タンパクを有し、アミラーゼ分泌能を有する腺組織を再生することができた。将来、患者の自己細胞を用いた唾液腺組織を作製し、口腔粘膜下や唾液腺組織に移植する治療法に向け、より機能効率の高い組織再生の条件を検討する必要がある。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

頭頸部腫瘍に対する放射線治療後の口腔乾燥症はその後の quality of life の観点から極めて重要な問題であるが、現在のところ根本的治療はない。本研究では唾液腺組織の再生に成功し、かつ水分分泌、アミラーゼ分泌などの機能を有することが示唆された。実際の再生医療として臨床応用するには移植部位や分泌ルートの問題など問題は残されているが、放射線治療後の口腔乾燥症に対する画期的な根本治療の第一歩として極めて意義深い基礎的研究論文といえる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。