

マウス胎児唾液腺上皮組織の体外培養におけるneuregulin 1とfibroblast growth factor 1の細胞分化への作用

早坂勇人*, 野川宏幸**, 関亦正幸***, 関亦明子*

*山形大学大学院医学系研究科看護学専攻病態機能学分野感染防御・遺伝科学研究室

**千葉大学大学院理学研究科地球生命圏科学専攻形態形成学研究室

***福島県立医科大学医学部放射性同位元素研究施設

(平成28年3月30日受理)

抄 録

唾液分泌障害は、がん放射線治療、化学療法などによって引き起こされ、患者の生活の質 (quality of life: QOL) を低下させる。我々は、このような唾液分泌障害が生じるメカニズムの解明や、がん治療時の有害事象の予防的ケアの開発に使用できる唾液腺体外培養系の構築を目標としている。この唾液腺体外培養系の構築にあたり、本研究では、増殖因子添加による体外培養マウス顎下腺上皮組織において、形態と、フローサイトメトリーによる細胞表面マーカーの変化を観察した。

培養顎下腺上皮組織に、ニューレグリン1 (neuregulin1: NRG1)、トランスフォーミング増殖因子 α (transforming growth factor alpha: TGF- α) を添加したところ、小葉 (腺房) の分枝と増加がみられ、線維芽細胞増殖因子1 (fibroblast growth factor-1: FGF1) を添加したところ、導管の伸長がみられた。これらの形態的变化は他のグループの結果とも一致した。細胞表面マーカー (c-Kit, aquaporin5 : AQP5) を用いた、フローサイトメトリーによる解析では、幹細胞と考えられているc-Kit陽性細胞 (c-Kit+細胞) の割合はNRG1または、NRG1 + FGF1の組み合わせで増加した。唾液分泌細胞の分化マーカーであるAQP5陽性細胞 (AQP5+細胞) が最も増加したのは、NRG1単独添加の場合であった。

本研究の結果、マウス培養唾液腺上皮組織にNRG1+FGF1を添加することにより、c-Kit+細胞を維持し、またNRG1のみを添加することでAQP5+細胞を増殖させる等のように、培地に添加する増殖因子の組み合わせを変えることで唾液腺体外培養系を構築できる可能性が示唆された。

キーワード : 唾液分泌障害、唾液腺体外培養、ニューレグリン1、線維芽細胞増殖因子1、細胞分化

緒 言

唾液分泌低下は、がん放射線治療、化学療法、外科的治療、あるいはシェーグレン症候群等の疾病や加齢などによって引き起こされ、患者の生活の質 (quality of life: QOL) を低下させる様々な問題、例えば味覚障害、嚥下障害、齲歯、口腔内乾燥、誤嚥性肺炎などを引き起こす^{1), 2)}。唾液分泌低下の原因のなかでも、放射線治療は頭頸部癌の治療で適用されることが多く、唾液分泌障害を引き起こしやすい²⁾⁻⁴⁾。また、唾液腺は中程度の放射線感受性を持ち、総線量が60 Gyを超えると唾液腺細胞が永久的な障害を受けるため、唾液

分泌障害は不可逆的なものになる⁵⁾。

そこで、我々は唾液分泌障害に対して予防的かつ非侵襲的なケアの開発に取り組むことにした。例えば放射線治療時に唾液腺防護剤等で唾液腺細胞を保護することができれば、患者に身体的負担を与えることなく唾液分泌低下によるQOL低下を予防できると考えられる。これまで、唾液分泌障害に対しては、唾液分泌促進薬の投与や人口唾液の塗布などによる対処が行われており²⁾、また唾液腺の幹細胞移植などの再生医療の研究も進んでいる⁶⁾⁻⁹⁾。しかし、唾液分泌促進薬は唾液分泌細胞やその機能が残存していなければ効果を示さず、人口唾液の塗布は対症療法であり、幹細胞移植も患者に侵襲を与える可能性がある。

唾液分泌障害の予防的ケア開発にあたって、放射線やがん化学療法剤による唾液腺障害のメカニズムを研究し、唾液腺防護剤の検索・同定を可能にするために、唾液腺の機能を客観的に評価できる唾液腺体外培養系の構築が必要である。分泌機能を維持した唾液腺細胞株はこれまでにいくつか知られている¹⁰⁾。しかし、これらの唾液腺細胞株は癌細胞から樹立されたもの、他の細胞の混入が疑われているもの、また不死化のために外来遺伝子を導入したものであり、正常細胞で分泌機能を維持した株化細胞は報告されていない。そこで我々は唾液腺の初代培養細胞を用い、正常細胞による唾液腺体外培養系の構築を目指すことにした。本報告では、唾液腺培養モデルの培地に添加する増殖因子の組み合わせについて、形態と細胞分化に注目して検討し、唾液腺体外培養系の構築が可能であるのかを考察した結果を示す。

研究にあたりこれまで発生過程の研究が進んでいるマウス胎児の顎下腺を用いて、まず3つの増殖因子、ニューレグリン1 (neureglin1: NRG1)、トランスフォーミング増殖因子 α (transforming growth factor alpha: TGF- α)、線維芽細胞増殖因子1 (fibroblast growth factor-1: FGF1) の体外培養における効果を観察した。NRG1とTGF- α は、表皮増殖因子 (epidermal growth factor: EGF) ファミリーに属し、マウスの顎下腺で発現¹¹⁾している。Keraら¹²⁾は、NRG1とTGF- α の培養顎下腺上皮組織への添加によって小葉が増殖すると報告している。また、Steinbergら¹³⁾は、線維芽細胞増殖因子の1つであるFGF1が顎下腺上皮組織の導管を伸長させることを報告している。本研究の結果、これら3つの増殖因子のうち、NRG1とFGF1を組み合わせることで培養することによって、唾液腺培養モデルを構築できる可能性が示唆されたので以下に報告する。

研究方法

1. 使用したマウスについて

生後8週以降の雌と10週以降の雄 [Jcl: ICRマウス (日本クレア)] を18時以降に同一ケージに入れて掛け合わせ、翌日の朝に膣栓を確認し妊娠0日目 (E0) とした。妊娠13日目 (E13) のマウスを顎下腺上皮組織の培養実験に使用した。動物実験は山形大学動物実験規定に従い行った。

2. 顎下腺上皮組織の培養

E13の胎児をHanks' Blanced Salt Solution (+) [HBSS (+), 和光純薬, Tokyo, Japan] 中に取り出した。さらに胎児から顎下腺原基を摘出した。次に顎下

腺原基を覆っている間葉組織を除去するためにディスペパーゼ[®] II (合同酒精, Tokyo, Japan) で15分間37°Cで保温した。保温後の顎下腺原基の間葉組織を精密ピンセットで除去し顎下腺上皮組織のみにした。次にNuclepore[™] Membrane (Whatman, Kent, UK) を培養プレートに敷き、Matrigel[®] (BD Biosciences, Bedford, MA) を載せ、37°Cで5分間保温した。Matrigel[®]がゲル化したのを確認後、顎下腺上皮組織をのせ、Matrigel[®]でさらにその上を覆った。最後に増殖因子を添加した培地を加え、5% CO₂インキュベーターで3日間培養した。顎下腺上皮組織の培養を開始した日をDay0として、24時間毎に3日目 (Day3) まで観察し、写真撮影を行った。写真の撮影には蛍光実体顕微鏡 (MZ FLIII, Leica)、カラー冷却CCDカメラ [Q550 (IM50), Leica] を使用した。顎下腺上皮組織の写真はImageJ 1.49v (National Institute of Health) で二階調化し、その上皮組織の平面全体 (Area) を測定して増殖サイズを数値化した。

3. 培地の組成と添加した増殖因子

培地はDulbecco's modified Eagle's medium and Ham's F-12 (和光純薬) を用い、これに0.1% bovine serum albumin: BSA (Sigma, St. Louis, MO)、Insulin-Transferrin-Selenium-G supplement (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)、10 μ M Lysophosphatidic acid: LPA (Avanti Polar Lipids Inc. Alabaster, AL) を添加して基礎培地とした。

増殖因子は20 ng/ml NRG1 (human recombinant, Peprotech EC, London, UK)、20 ng/ml TGF- α (human recombinant, Peprotech EC)、500 ng/ml FGF1 (human recombinant, Peprotech EC) をそれぞれ基礎培地に添加して使用した。

4. フローサイトメトリーのためのサンプル調整

3日間培養した顎下腺上皮組織 (4.0-8.0 \times 10⁵ cells) を500 μ l ディスペパーゼ[®] II 溶液中に回収した。その後37°Cで30分間保温した。保温後5,000 rpmで3分間遠心分離 (HITACHI CT15E) した。上清を捨て500 μ l isolation buffer [IB: 1% BSA in HBSS(-)]、6.25 μ l Collagenase II 溶液 (23 mg/ml) (Worthington Biochemical Corp. Lakewood, NJ)、6.25 μ l Hyaluronidase enzyme 溶液 (40 mg/ml) (nacalai tesque Inc., Kyoto, Japan)、62.5 μ l CaCl₂ (50 mM)、6.25 μ l DNase (28,000 KU/ml) (Worthington Biochemical Corp.) を加えて細胞を懸濁し37°Cで30分間保温した。5,000 rpmで3分間遠心分離し上清を捨てた後、500 μ l のIBに2 μ l の0.5 M EDTAを加えた緩衝液で2回洗浄した。上清を捨てた後1 mlのIBを加え細胞を

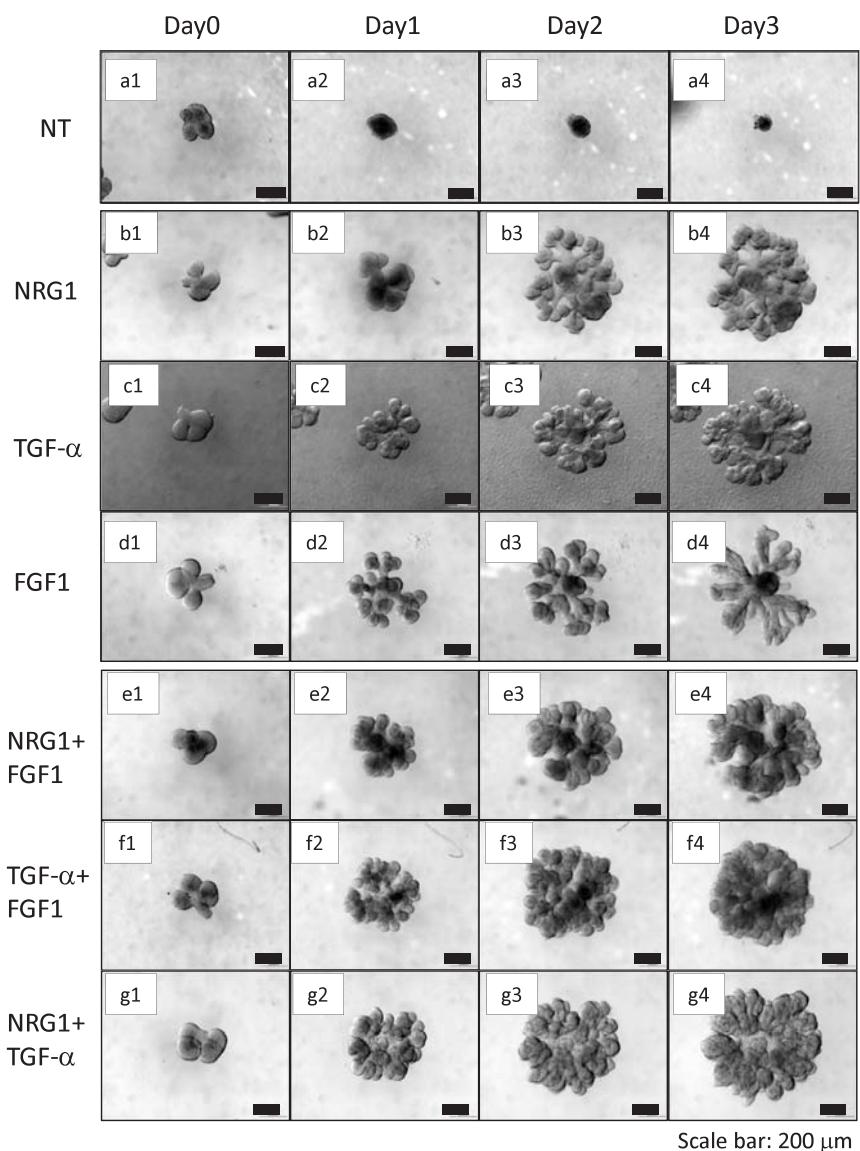


図 1. 顎下腺上皮組織の体外培養による形態変化

E13顎下腺原基の上皮組織に基礎培地のみ (NT: non-treatment, a1-4)、NRG1 (b1-4)、TGF- α (c1-4)、FGF1 (d1-4) をそれぞれ単独で添加し3日間 (Day0-3) 培養した場合、2種類の増殖因子を組み合わせ、NRG1+FGF1 (e1-4)、TGF- α +FGF1 (f1-4)、NRG1+TGF- α (g1-4) で3日間培養した場合の形態変化を示した。それぞれ5-20サンプル培養したうちの代表的な写真である。各サンプルの培養における増殖サイズの平均は表1に示した。

懸濁した。細胞が十分に分離できていることを細胞数の計測によって確認し、解析のために各種抗体を添加した。細胞解析にはフローサイトメーター (FACSCanto™ II, BD Biosciences) を使用した。

5. フローサイトメリーに使用した抗体

c-Kit 検出のために FITC conjugated anti-CD117 (c-Kit) (Bio Legend, San Diego, CA) を、E-Cadherin 検出のために PE conjugated anti-E-Cadherin (R&D Systems, Minneapolis, MN) を、Aquaporin5 (AQP5) 検出のために anti-AQP5, rabbit monoclonal (NOVUS

BIOLOGICALS, Littleton, CO) とそれに対する二次抗体として、Alexa Fluor® 647 conjugated anti-rabbit を使用した。

結 果

1. 顎下腺上皮組織培養における形態への増殖因子の効果

唾液腺の構造は大きく導管と腺房に分けられる。成体の腺房は唾液分泌細胞で占められている¹⁴⁾⁻¹⁶⁾ が、

表 1. 顎下腺上皮組織の体外培養における増殖サイズの変化

	Day0	Day1	Day2	Day3	n
NT	133 ± 40	98 ± 46	65 ± 25	46 ± 31	6
NRG1	130 ± 16	258 ± 53**	499 ± 155**	660 ± 172**	20
TGF- α	112 ± 25	320 ± 76**	558 ± 123**	804 ± 194**	15
FGF1	141 ± 52	289 ± 134**	643 ± 102**	709 ± 187**	5
NRG1+FGF1	121 ± 31	270 ± 50**	562 ± 108**	685 ± 173**	20
TGF- α +FGF1	122 ± 41	327 ± 92**	558 ± 226**	690 ± 245**	6
NRG1+TGF- α	125 ± 28	346 ± 73**	574 ± 156**	831 ± 244**	19

NT: non-treatment (基礎培地のみの結果)

数字はImageJによるAreaスケールの標本平均値 (単位無) ± 不偏標準偏差を示す。

** $p < 0.01$ (vs. NT) : unpaired, non-parametric

本研究ではE13顎下腺の3日間体外培養において腺房への分化が確認できていないため、腺房にあたる部分を小葉と呼ぶことにした。Keraら¹²⁾、Steinbergら¹³⁾の培養唾液腺上皮組織の形態形成の再現性を確認するために、NRG1, TGF- α , FGF1をそれぞれ単独で添加した培地で顎下腺上皮組織を3日間培養し、形態変化を観察した。基礎培地のみでは、Day3までに上皮組織の萎縮がみられた(図1 a)が、NRG1, TGF- α を添加した上皮組織では小葉の増殖が観察され(図1 b, c)、FGF1を添加した場合は、導管の伸長が観察された(図1 d)。上皮組織はDay4以降では組織に気泡状の空洞が出現し、組織の形態が崩れ始めるため、本報告ではDay3までの結果を示した。本研究においても、他のグループで観察されているそれぞれの増殖因子の効果が再現された。

次に増殖因子2種類の組み合わせによる組織培養を行った。その結果、NRG1+ FGF1, TGF- α +FGF1, NRG1+TGF- α のどの組み合わせでも小葉の増殖が観察された(図1 e, f, g)。唾液腺幹細胞の多くが導管に局在していると考えられており^{7), 17), 18)}、我々の培養実験でもFGF1単独の添加で導管が伸長したことから、唾液腺幹細胞を増殖させるにはFGF1が有効なのではないかと推測された。しかし、FGF1単独の培養と違い、NRG1やTGF- α をFGF1と組み合わせても顕著な導管の増殖は観察されなかった。培養した顎下腺上皮組織の増殖サイズを数値化すると、基礎培地のみ(NT, 表1)では、培養開始時点(Day0)では133±40であったが、Day3では46±31となり、組織が萎縮した。基礎培地に増殖因子を添加した場合はDay3までそのサイズが増大した(表1)。実験日毎に、各増殖因子添加群で対応のないノンパラメトリック多重検定(Kruskal Wallis H-test)をおこなったところ有意差がみられたため、次に各増殖因子添加群間で比較を行った。Day1-3ですべての増殖因子添加群でNTに対して有意差がみられたが、各増殖因子

添加群間ではみられなかった。

唾液腺幹細胞が増加しているのか、唾液分泌細胞へ分化した細胞が増加しているのか、ここまでの形態の観察からでは、増加している細胞の性質を知るには限界があった。そこで次に、幹細胞増殖におけるFGF1の効果を3日間培養した顎下腺上皮組織細胞の表面マーカーを用いたフローサイトメーターで解析した。

2. 細胞表面マーカーを用いた細胞解析

形態の観察においてNRG1とTGF- α は形態的に同じ特徴を示したが、細胞表面マーカーの解析においてFGF1と組み合わせて添加する増殖因子は、以降NRG1を使用した。また、顎下腺上皮細胞は細胞接着分子E-Cadherin (E-CDH)を発現している¹⁹⁾。今回の実験では細胞解析において、増殖因子存在下で3日間培養した顎下腺上皮細胞を識別するためにE-CDHを、唾液腺幹細胞にはc-Kitを、唾液分泌細胞にはAquaporin5 (AQP5)をそれぞれマーカーとして解析に用いた。

フローサイトメトリーによる解析後、その解析過程で、小さすぎるものや死細胞集団を除き、抗体未処理群(none, 図2-A, Bともに上段パネル)を基礎として、抗c-Kit抗体、抗AQP5抗体の単独染色の結果を考慮して、4分割の陰性ラインを決定した。培養や解析に供する顎下腺上皮のサンプル数の限界から、各増殖因子群はそれぞれ非依存的に解析したため、毎回陰性ラインを個別に決定した。E-CDH陽性かつc-Kit陽性(c-Kit+ E-CDH+)細胞とE-CDH陽性かつAQP5陽性(AQP5+ E-CDH+)細胞のそれぞれの二重陽性(double positive cells, 図2-A, B, 各パネル4つのエリアの右上)の細胞存在率を調べた。細胞解析は生物学的に非依存的に3回ずつ行い、その結果を図2-Cにグラフとして示した。AQP5+ E-CDH+細胞の割合は、NRG1, FGF1それぞれ単独の添加でDay0と比較して増加がみられ、特に効果が大きかったのは、NRG1単独の添加で、29.9 ± 4.8%であった。この割

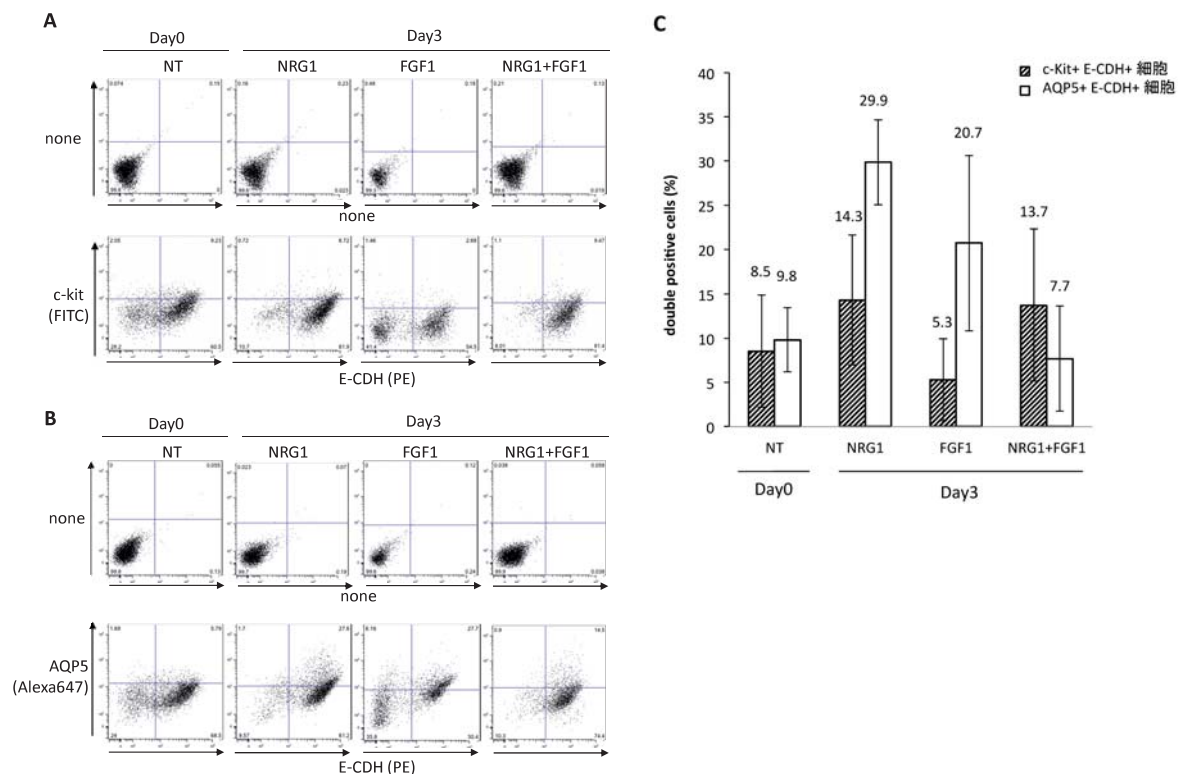


図2. 顎下腺上皮組織の細胞表面マーカーによる細胞解析結果

A, B: フローサイトメトリーによる代表的な結果、C: フローサイトメトリーによる生物学的に非依存的な3回の結果の平均をグラフとして不偏標準偏差と共に示したもの。縦軸は、double positive 細胞の割合 (%) を示している。A. c-Kitは唾液腺幹細胞、B. Aquaporin5 (AQP5)は唾液分泌細胞のマーカーとして用いた。A,BともにE-Cadherin (E-CDH)は上皮細胞のマーカーとして用い、4分割の陰性ラインは、抗体未処理 (none)を基本としてc-Kit抗体、AQP5抗体の各々単独染色による結果を考慮して決定した。添加した増殖因子は図に示すとおりであり、培養初日 (Day0)と3日目 (Day3)の結果を示した。PE: phycoerythrin, FITC: fluorescein isothiocyanate, Alexa647: Alexa Fluor[®]647

合はDay0と比較して3.1倍であった。c-Kit+ E-CDH+細胞の割合は、NRG1単独の添加でも増加がみられたが、NRG1+FGF1の組み合わせでAQP5+細胞の割合を上回っていた。以上の傾向がみられたが、NTに対する対応のないノンパラメトリック多重検定 (Kruskal Wallis H-test)をおこなったところ、有意差はみられなかった。

考 察

本研究の結果、マウス顎下腺上皮組織の体外培養においてNRG1とFGF1の2種類の増殖因子を組み合わせることによって、幹細胞のマーカーと考えられているc-Kit^{7), 19), 20)}を発現している細胞がAQP5を発現している細胞の割合を上回っていた。また、NRG1のみの添加で唾液分泌細胞の分化マーカーであるAQP5を発

現している細胞の増加傾向が観察された。これらの結果から、培地に添加する増殖因子の組み合わせを変えることで培養細胞の性質が変化し、唾液腺細胞を継代培養し、必要時に唾液分泌細胞に分化誘導させることのできる唾液腺体外培養系を構築できる可能性が示唆された。

NRG1の添加でAQP5+細胞が最も増加したが、この理由としてAQP5+細胞は腺房に局在^{14)-16), 21)}することが報告されており、NRG1は組織培養で腺房 (小葉)を増殖させていたことが理由として考えられる。FGF1のみの添加でc-Kit+細胞が最も増加すると推測されたが、この予想に反して、NRG1のみかNRG1+FGF1の添加でc-Kit+細胞の割合が増加した。この理由として2つの可能性が考えられる。1つはNRG1のシグナル経路がc-Kit+細胞の増殖に必要な可能性と、もう1つはNRG1による腺房 (小葉)の

増殖に伴って、腺房（小葉）に局在する少数のc-Kit+細胞が増加した可能性である。FGF1単独の添加による導管の伸長は、NRG1を加えたNRG1+FGF1では抑えられており、小葉の分枝と増殖が観察された。これはOkamotoら²²⁾の結果とも一致している。実際、c-Kit+細胞は腺房（小葉）にも局在する可能性^{19), 20)}が報告されている。腺房に局在するc-Kit+細胞が幹細胞だとすると、唾液腺幹細胞の供給は導管と腺房の両方からということになる。実際、一度切断した導管を、障害を受けた腺房（小葉）と結合させることで、腺房（小葉）組織の障害を回復させることができた^{23), 24)}という報告がある一方、導管からの唾液腺幹細胞の供給がない状態でも腺房細胞は増殖できた²⁵⁾という報告もある。このことから本研究でもNRG1添加による腺房（小葉）の増加に伴って、小葉に局在する唾液腺幹細胞も増殖した可能性が考えられる。

また今後いくつか検討すべき課題も見いだされた。ひとつは、NRG1+FGF1の添加によるc-Kit+細胞の特異的な増加や、NRG1添加による唾液分泌細胞の分化マーカーであるAQP5+細胞の特異的な増加の割合が低いことである。本研究で用いた増殖因子以外にも、形態が唾液腺に類似し、同様にアミラーゼを分泌する膵臓の培養モデル研究において使用されている因子（Noggin, R-spondin, Wnt-3A, Nicotinamide等）²⁶⁾、c-Kitのリガンドであるstem cell factor (SCF)¹⁹⁾や副交感神経刺激因子であるCarbachol (CCh)^{17), 27)}等を候補因子として今後検討していく必要があると考えている。

さらに、唾液腺の幹細胞マーカーについても検討すべき課題が残されている。本研究ではc-Kitを唾液腺幹細胞の細胞表面マーカーとして利用したが、それは以下のふたつの知見に基づいている。1) 唾液腺を障害したマウスにc-Kit+細胞を移植すると、その機能が回復すること⁸⁾、2) 唾液腺前駆細胞のマーカーとしてCytokeratin-5 (K5)とCytokeratin-14 (K14)が同定されており、どちらもc-Kit+細胞の集団に含まれる¹⁷⁾⁻¹⁹⁾ことである。しかし、c-Kit以外にも、CD24, CD29, CD49f等が幹細胞マーカーである可能性^{6), 7), 20)}が報告されている。したがって増殖因子の添加によってこれらのc-Kit以外のマーカーの発現と細胞増殖の関連性を検討する必要がある。

今後は本研究で見いだしたNRG1+FGF1を組み合わせた培地で、single cellに分離した唾液腺幹細胞を長期間継代培養することができるか、また、その後NRG1のみの培地にした場合に、唾液分泌細胞へ分化誘導され唾液成分が分泌されるか検討する予定であ

る。

文 献

1. Jellema AP, Slotman BJ, Doornaert P, Leemans CR, Langendijk JA: Impact of radiation-induced xerostomia on quality of life after primary radiotherapy among patients with head and neck cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 69: 751-760
2. 丹生健一, 佐々木良平: カラーアトラス 目で見て学ぶ放射線療法の有害反応 多職種チームで実践する治療と患者支援. 東京: 日本看護協会出版会, 2011: 51-61
3. Burlage FR, Coppes RP, Meertens H, Stokman MA, Vissink A: Parotid and submandibular/sublingual salivary flow during high dose radiotherapy. *Radiation Oncol* 2001; 61: 271-274
4. Malouf JG, Aragon C, Henson BS, Eisbruch A, Ship JA: Influence of parotid-sparing radiotherapy on xerostomia in head and neck cancer patients. *Cancer Detect Prev* 2003; 27: 305-310
5. Vissink A, Mitchell JB, Baum BJ, Limesand KH, Jensen SB, Fox PC, et al.: Clinical management of salivary gland hypofunction and xerostomia in head-and-neck cancer patients: successes and barriers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010; 78: 983-991
6. Nanduri LS, Baanstra M, Faber H, Rocchi C, Zwart E, de Haan G, et al.: Purification and *ex vivo* expansion of fully functional salivary gland stem cells. *Stem Cell Reports* 2014; 3: 957-964
7. Pringle S, Van Os R, Coppes RP: Concise review: Adult salivary gland stem cells and a potential therapy for xerostomia. *Stem Cells* 2013; 31: 613-619
8. Lombaert IM, Brunsting JF, Wierenga PK, Faber H, Stokman MA, Kok T, et al.: Rescue of salivary gland function after stem cell transplantation in irradiated glands. *PLoS One* 2008; 3: e2063
9. Ogawa M, Oshima M, Imamura A, Sekine Y, Ishida K, Yamashita K, et al.: Functional salivary gland regeneration by transplantation of a bioengineered organ germ. *Nat Commun* 2013; 4: 2498
10. 吉垣純子: 唾液腺初代培養細胞の可能性を探る. *日本唾液腺学会誌* 2015; 56: 49-56
11. Nitta M, Kume T, Nogawa H: FGF alters epithelial competence for EGF at the initiation of branching morphogenesis of mouse submandibular gland. *Dev Dyn* 2009; 238: 315-323
12. Kera H, Yuki S, Nogawa H: FGF7 signals are relayed to autocrine EGF family growth factors to induce branching morphogenesis of mouse salivary

- epithelium. *Dev Dyn* 2014; 243: 552-559
13. Steinberg Z, Myers C, Heim VM, Lathrop CA, Rebutini IT, Stewart JS, et al.: FGFR2b signaling regulates *ex vivo* submandibular gland epithelial cell proliferation and branching morphogenesis. *Development* 2005; 132: 1223-1234
 14. Gresz V, Kwon TH, Hurley PT, Varga G, Zelles T, Nielsen S, et al.: Identification and localization of aquaporin water channels in human salivary glands. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281: G247-254
 15. Ma T, Song Y, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS: Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels. *J Biol Chem* 1999; 274: 20071-20074
 16. Edgar M, Dawes C, O' Mullane D: 唾液 歯と口腔の健康 原著第3版. 東京; 医歯薬出版株式会社, 2008: 11-26
 17. Knox SM, Lombaert IM, Reed X, Vitale-Cross L, Gutkind JS, Hoffman MP: Parasympathetic innervation maintains epithelial progenitor cells during salivary organogenesis. *Science* 2010; 329: 1645-1647
 18. Patel VN, Hoffman MP: Salivary gland development: a template for regeneration. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 25-26: 52-60
 19. Lombaert IM, Abrams SR, Li L, Eswarakumar VP, Sethi AJ, Witt RL, et al.: Combined KIT and FGFR2b signaling regulates epithelial progenitor expansion during organogenesis. *Stem Cell Reports* 2013; 1: 604-619
 20. Nanduri LS, Maimets M, Pringle SA, van der Zwaag M, van Os RP, Coppes RP: Regeneration of irradiated salivary glands with stem cell marker expressing cells. *Radiother Oncol* 2011; 99: 367-372
 21. Larsen HS, Ruus AK, Galtung HK: Aquaporin expression patterns in the developing mouse salivary gland. *Eur J Oral Sci* 2009; 117: 655-662
 22. Okamoto K, Kikuchi-Handa T and Nogawa H: Evidence of interlobular repulsion during branching morphogenesis in mouse salivary glands. *Dev Dyn* 2010; 239: 2208-2218
 23. Cotroneo E, Proctor GB, Paterson KL, Carpenter GH: Early markers of regeneration following ductal ligation in rat submandibular gland. *Cell Tissue Res* 2008; 332: 227-235
 24. Cotroneo E, Proctor GB, Carpenter GH: Regeneration of acinar cells following ligation of rat submandibular gland retraces the embryonic-perinatal pathway of cytodifferentiation. *Differentiation* 2010; 79: 120-130
 25. Aure MH, Konieczny SF, Ovitt CE: Salivary gland homeostasis is maintained through acinar cell self-duplication. *Dev Cell* 2015; 33: 231-237
 26. Boj SF, Hwang CI, Baker LA, Chio II, Engle DD, Corbo V, et al.: Organoid models of human and mouse ductal pancreatic cancer. *Cell* 2015; 160: 324-338
 27. Nedvetsky PI, Emmerson E, Finley JK, Ettinger A, Cruz-Pacheco N, Prochazka J, et al.: Parasympathetic innervation regulates tubulogenesis in the developing salivary gland. *Dev Cell* 2014; 30: 449-462

The effects of neuregulin 1 and/or fibroblast growth factor 1 on the differentiation of mouse embryonic submandibular gland *ex vivo* culture cells

Yuto Hayasaka*, **Hiroyuki Nogawa****, **Masayuki Sekimata*****,
Akiko Murakami-Sekimata*

**Theoretical Nursing and Genetics, School of Medicine, Yamagata University*

***Department of Biology, Graduate School of Science, Chiba University*

****Radioisotope Center, School of Medicine, Fukushima Medical University*

ABSTRACT

Radiotherapy for head and neck cancers and/or chemotherapy can cause salivary gland dysfunction and subsequent xerostomia, leading to poor quality of life (QOL) in cancer survivors. To understand the molecular mechanism of the salivary gland dysfunction and develop a preventive care, we are trying to establish an *ex vivo* salivary gland culture system. To develop the culture system, we tested the effects of growth factors on cultured epithelia of mouse embryonic submandibular glands by morphological observation and flow cytometry.

Neuregulin 1 (NRG1) or transforming growth factor alpha (TGF- α) caused branching of the lobes and fibroblast growth factor 1 (FGF1) caused the elongation of the stalk when added to the cultures. These morphological changes were comparable to those reported by other groups. The data by flow cytometry showed that the population of c-Kit positive (c-Kit+) cells, which could be stem cells, increased when NRG1 alone or a combination of NRG1 and FGF1 was added. However, the population of aquaporin 5 positive (AQP5+) cells, which are differentiated cells, increased by adding NRG1 alone.

This study showed that it is possible to establish the *ex vivo* salivary gland culture system which can maintain c-Kit+ cells by adding NRG1 + FGF1 and differentiate into AQP5+ cells by removing FGF1 whenever necessary.

Key words : xerostomia, *ex vivo* salivary gland culture, neuregulin 1, fibroblast growth factor 1, cell differentiation