

マウス胎児顎下腺上皮細胞の初代培養におけるSerum ReplacementとRho-associated protein kinase阻害剤Y-27632の効果

推名祐美*, 本間千明*, 阿蕪裕子*, 柳橋志帆*, 関亦正幸***, 関亦明子***

*山形大学医学部看護学科基礎看護学講座基礎生命科学分野

**山形大学大学院医学系研究科看護学専攻看護病態機能学領域

***福島県立医科大学医学部放射性同位元素研究施設

(平成30年4月25日受理)

抄 録

【目的】我々は、がん治療の有害事象である唾液分泌低下や口腔粘膜炎の軽減を目指し、唾液腺の防護方法の開発に必要な唾液腺細胞の体外培養モデルの構築を行ってきた。本研究においては、マウス胎児の顎下腺 (ME-SMG : mouse embryonic submandibular gland) 上皮細胞の無血清单層培養に対する選択した4つの添加因子の効果を検討した。

【方法】胎生13日目のME-SMG原基から上皮組織を単離後、ME-SMG上皮組織を単一細胞に分散して96穴培養プレートに播種した。添加因子の効果は、基礎培地への添加の有無による細胞の増殖性で判定した。

【結果】選択した4種の添加因子を基礎培地にすべて加えることで、単一細胞に分散したME-SMG上皮細胞の体外培養に成功した。このうち、KnockOut™ Serum Replacement (KSR) とY-27632の添加はME-SMG上皮細胞の培養に必須であった。また、幹細胞性の維持や細胞の分化に関わるWnt-3a、R-spondin 1の添加によるME-SMG上皮細胞の増殖促進作用を観察したが、どちらを添加しても増殖の促進は観察されなかった。

【結論】本研究において、KSRとY-27632を基礎培地に添加することでME-SMG上皮細胞の無血清培地による単層での安定した培養に成功した。

キーワード：顎下腺、上皮細胞、唾液分泌低下、口腔粘膜炎、がん治療

緒 言

化学療法を受ける患者の約50~75%、頭頸部放射線照射を受ける患者の約70~90%で唾液分泌障害が発生しており¹⁾、それにより引き起こされる口腔粘膜炎や嚥下困難、味覚異常等は、がん治療中の感染の増加や治療の完遂率、がんサバイバーの生活の質にも影響する大きな問題である。しかし、唾液分泌障害による口腔粘膜炎は、これまで対症療法が主であり根本的な解決法はなかった。我々は、この口腔粘膜炎の発症原因のひとつである唾液分泌障害に注目し、唾液腺防護ケア開発による口腔粘膜炎予防を目指している。

唾液腺は皮膚や消化管等と比較して放射線の感受性

が低いと考えられているが、放射線照射により早期に唾液分泌障害が生じる。障害の様態は照射後の時期によって異なり、照射直後の急性期反応では細胞の喪失がないまま唾液の分泌が障害され、照射後1ヶ月から2年程度の慢性期反応では幹細胞やプロジェニター細胞の喪失により唾液腺が不可逆的に傷害される²⁾。一度不可逆的に傷害された唾液腺は治癒することがなく、患者は一生唾液腺の機能低下を抱えて生きることになる。急性期に唾液分泌低下が引き起こされるのは、唾液腺の単なる細胞死によるものではなく、細胞膜やタンパク質、神経の傷害によるものなどの、複雑な要因が絡み合っていることが分かってきた³⁾⁻⁵⁾。しかし、唾液腺機能障害のメカニズムについては未だ不明点も多い。我々は、放射線や化学療法による急性期や慢性

期の唾液腺傷害のメカニズムを明らかにし、唾液腺傷害や唾液分泌障害の予防法を開発することによって、がん治療における唾液分泌低下や口腔粘膜炎の予防に貢献したいと考えている。そこで本研究は、唾液分泌障害を予防する唾液腺防護剤の探索や唾液腺防護ケア開発に必要な、唾液腺細胞-培養モデルの構築を行うために唾液腺の長期培養に向けた培地条件を検討した。

我々の目指す唾液腺細胞-培養モデルに求める条件は2つあり、1)均質で大量の細胞を長期間培養できること、2)必要時に腺細胞に分化させ、分化の指標となる唾液成分の分泌が検出可能であること、である。唾液腺防護剤の探索において、数千の化合物のスクリーニングを自動化して行う際、この2つの条件が重要になると考えている。唾液腺細胞の培養はすでに多くの研究グループによって様々な方法で試みられている。しかし、ES細胞やiPS細胞から唾液腺細胞への分化誘導に成功した報告はなく、マウスの成体から分離して培養を試みた唾液腺細胞⁶⁾には間葉系(間充織)細胞の混入の問題があり、また、移植医療の開発を目的としたマウス唾液腺幹細胞を分離して培養したsphereの長期培養⁷⁾⁻⁹⁾やbioengineered organ¹⁰⁾の作成も試みられているが、我々が目指す唾液腺細胞-培養モデルに求める上述の2つの条件を満たしているものは未だ無い。本研究においては、条件のひとつである「均質で大量の細胞を長期に培養できること」の達成に向けて、培地への添加因子を検討することにより間葉系細胞の混入のないマウス顎下腺上皮細胞単独の無血清培地を用いた単層培養に成功したので報告する。

対象と方法

1. 実験動物

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った。

2. 顎下腺上皮細胞の分散培養と観察

E13のマウス胎児から顎下腺原基をHanks' Blanced Salt Solution (+) [HBSS (+), 和光純薬, Tokyo, Japan] 中に摘出した。次にディスパーゼ[®] II (合同酒精, Tokyo, Japan) で処理し、顎下腺原基を覆っている間葉組織を除去して、上皮組織を単離した。上皮組織は、HBSS (-) 中の2mM EDTAで処理した後、細胞を単一細胞に分散させて96穴プレートに以下に記載する培地を用いて播種した。単一細胞に分散した顎

下腺上皮細胞は、5%CO₂、37°Cで2~4日間培養した。培養後の細胞は、倒立位相差顕微鏡(BZ-X700, キーエンス、大阪)で細胞の形態を撮影し、0.25%クリスタルバイオレット-70%エタノール溶液で染色を行った。定量は、0.1 Mクエン酸ナトリウム-50%エタノール溶液で染色後のクリスタルバイオレットを可溶化し、可視光吸光プレートリーダー(サンライズ, テカン・ジャパン 神奈川)を用いて570 nmで吸光度の測定を行った。

3. 培地の組成と本研究で添加した因子

培地はDulbecco's modified Eagle's medium and Ham's F-12(和光純薬)を用い、これに1×GlutaMAX[™](Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), 0.1% bovine serum albumin: BSA (Sigma, St. Louis, MO), 1×Insulin-Transferrin-Selenium-G supplement (Thermo Fisher Scientific), 1×Penicillin-Streptomycin(和光純薬), 20 ng/ml neuregrin 1 (human recombinant, Peprotech EC, London, UK), 200 ng/ml fibroblast growth factor 1 (human recombinant, Peprotech)を添加して基礎培地とした。

添加因子として5~20% KnockOut[™] Serum Replacement (Thermo Fisher), 10 μM Y-27632(和光純薬), 20 ng/ml Wnt-3a (human recombinant, R&D systems), 100 ng/ml R-spondin 1 (human recombinant, Peprotech)を使用し、様々な組み合わせによる添加の有無で細胞の増殖性を観察した。

結 果

1. マウス胎児顎下腺上皮細胞の無血清単層培養にはKSRとY-27632の両方の添加が必須であった。

マウス胎児顎下腺(ME-SMG: mouse embryonic submandibular gland)の発生において、妊娠16日目(E16)までにME-SMGの分枝と幹細胞が増加していき、E16では、ME-SMG上皮細胞におけるc-Kit (+)細胞の割合が20%程度となるが、E17以降は急速に減少して出生後(P1)にはc-Kit (+)細胞の割合は数パーセントとなることが報告されている¹¹⁾。これはME-SMGの幹細胞(前駆細胞)がE16以降で腺細胞に分化していくことに伴うと考えられている。我々は、c-Kit (+)細胞の割合が10%以上と高く、増殖性を維持した幹細胞(前駆細胞)が多く得られることが期待でき、また、間葉組織を上皮組織から容易に剥離できる限界の時期であるE13に注目して、ME-SMG原基の上皮組織を単離し、単一細胞に分散して初代培養

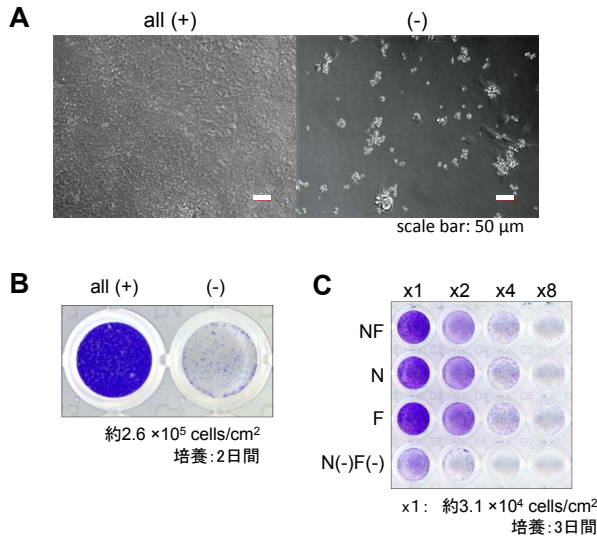


図1. 基礎培地に4種の添加因子を加えた際のME-SMG上皮細胞の増殖性
 A. all (+): 4種の添加因子を基礎培地に全て加えた場合、(-): 加えなかった場合の細胞形態の位相差顕微鏡による写真を示す。
 B. (A) のクリスタルバイオレット染色像
 C. 基礎培地中のneureglin 1 (N) とfibroblast growth factor 1 (F) の添加の有無による3日間培養後のクリスタルバイオレット染色像。パネル上部に細胞の希釈系列を1倍(x1)から8倍(x8)まで示した。A-Cの結果は、独立に行った3回以上の実験のうち代表的なものを示す。

を行った。初めに、これまでME-SMG原基の三次元培養で使用し、唾液腺組織の分枝と増殖を確認できていた基礎培地を用いて、ME-SMG上皮細胞の単層培養を行ったが、細胞が増殖する場合としない場合があり、その増殖は不安定であった。増殖した際の培養条件を詳細に検討したところ、ME-SMG上皮細胞が増殖できたのは、播種時の細胞濃度が約 1.4×10^5 cells/cm²以上の場合のみであった。基礎培地単独では、細胞の増殖は細胞の播種濃度に大きく依存し、また増殖可能な細胞播種濃度であっても増殖効率が低かったことから、安定した培養は困難と思われた。そこで、他に4種の因子を選択して基礎培地に添加して培養を試みた。選択した4種の添加因子は、血清代替因子としてKnockOut™ Serum Replacement (KSR)、Rho-associated protein kinase (ROCK) 阻害剤であるY-27632¹²⁾⁻¹⁴⁾、幹細胞性の維持・増殖に関わり多くの組織培養に用いられているWnt-3aとR-spondin 1¹⁵⁾⁻¹⁷⁾である。これら4種の添加因子の効果は劇的で、すべてを加えると単一細胞に分散したME-SMG上皮細胞の増殖が基礎培地単独と比べて大きく促進した(図1-A, B)。

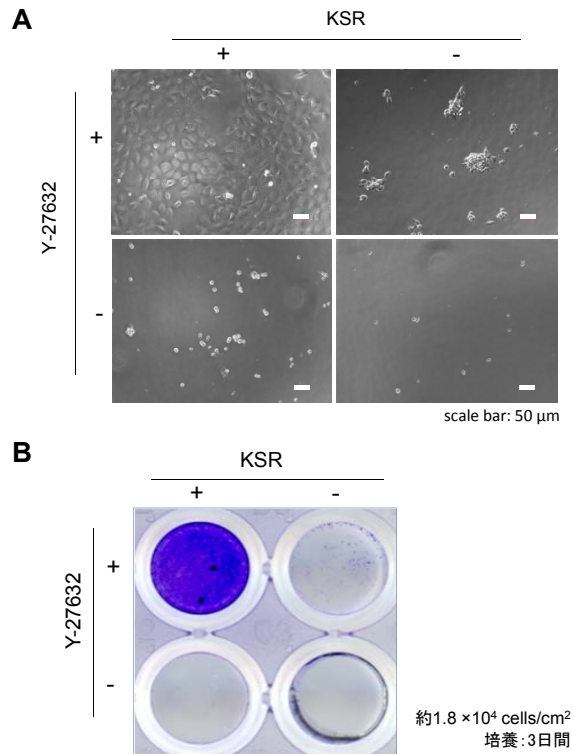


図2. KSRとY-27632のME-SMG上皮細胞への効果
 A. KSRの有無(+または-)、Y-27632の有無(+または-)における位相差顕微鏡による写真を示す。
 B. (A) のクリスタルバイオレット染色像。A-Cの結果は、独立に行った3回の実験のうち代表的なものを示す。

neureglin 1 (NRG1) とfibroblast growth factor 1 (FGF1) は、我々の行ってきたME-SMG原基の「三次元培養」において、同時添加により幹細胞のマーカーであるc-Kit (+) 細胞が、分化マーカーであるAQP5 (+) 細胞より増加することが示されている¹⁸⁾。本研究では両方を基礎培地に含めて使用したが、NRG1とFGF1それぞれ単独での増殖に与える影響を分散単層培養において観察したところ、NRG1とFGF1のどちらも含まない培地では著しく細胞の増殖性が悪化し、少なくともそのどちらか一方が細胞の増殖促進に必要であった(図1-C)。

次に、今回基礎培地に加えた4種の因子の中で、ME-SMG上皮細胞の増殖に必須の因子の同定を試みた。まず、血清代替因子KSRとY-27632の添加の有無で細胞の増殖を観察したところ、KSR無添加では、細胞の小さなコロニーがみられたが、それ以上増殖することはなく、Y-27632無添加では、細胞はすべて死滅していた(図2-A, B)。KSRとY-27632の両方を添加した時のみ細胞の増殖がみられることがわかった。このことから、KSRとY-27632の両方がME-SMG上皮細胞の単層培養に必須であることが示された。組

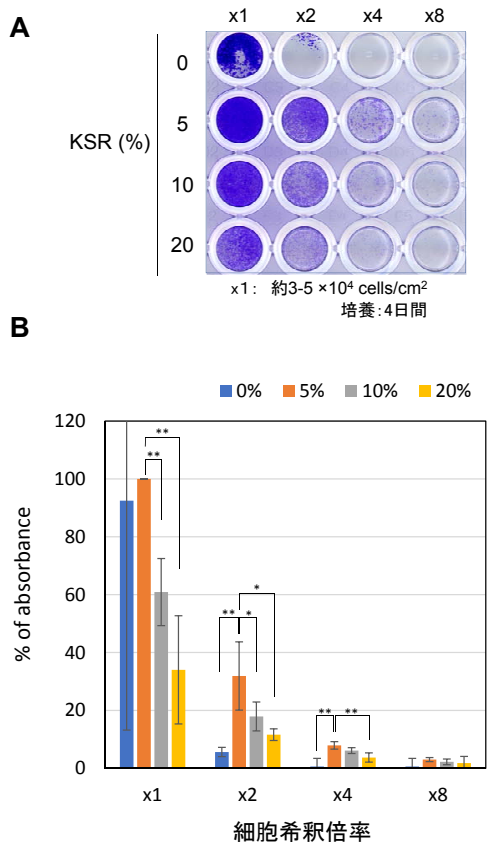


図3. KSRの濃度によるME-SMG上皮細胞の増殖効果
 A. KSRの濃度 (0, 5, 10, 20%) による増殖程度を培養シャーレのクリスタルバイオレット染色像で示す。パネル上部に細胞の希釈系列を1倍 (x1) から8倍 (x8) まで示した。
 B. 染色後のクリスタルバイオレットを可溶化し、定量を行った。グラフは独立に行った3回の実験結果を示している。5% KSR存在下で細胞濃度1倍希釈 (x1) を100%として標準化を行った。一元配置分散分析後、Student-Newman-Keuls (SNK) testを行った。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

組織培養にKSRを使用する場合、通常5~20%の範囲で用いられるが、今回の実験では5%で効果がみられていたことから、次に、KSRの添加濃度について検討した。細胞の2倍希釈系列を作成し、細胞播種濃度の違いにおけるKSRの効果をみたところ、濃い細胞播種濃度 (約 $3-5 \times 10^4$ cells/cm²) では、KSR無しでも増殖がみられる場合があったが (図3-A)、その増殖は不安定であり、細胞播種濃度1倍希釈 (x1) のKSR 5%を「100%」として標準化した場合、3回の独立した実験の平均値 ± 標準偏差は $92.5\% \pm 79.3$ とデータの散らばりが大きかった (図3-B)。2倍希釈以上の薄い細胞播種濃度では、KSR無しでは増殖が困難であり、KSR依存性が高いことが分かった。KSRの濃度を比較すると、どの細胞希釈倍率においても、5%の時に細胞の増殖性が大きい傾向にあった (図3-B)。

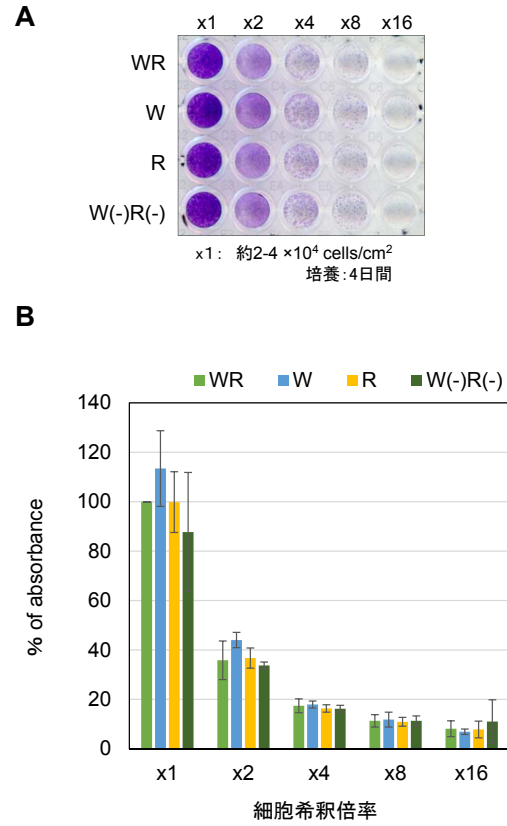


図4. Wnt-3aとR-spondin 1添加のME-SMG上皮細胞への増殖効果
 A. Wnt-3a (W) とR-spondin 1 (R) の添加の有無による4日間培養後のクリスタルバイオレット染色像を示す。パネル上部に細胞の希釈系列を1倍 (x1) から16倍 (x16) まで示した。
 B. 染色後のクリスタルバイオレットを可溶化し、定量を行った。グラフは独立に行った3回の実験結果を示しており、Wnt-3aとR-spondin 1を両方添加した場合 (WR) の細胞濃度1倍希釈 (x1) を100%として標準化を行った。

2. Wnt-3aとR-spondin 1 は見かけの細胞増殖性に影響しなかった。

次に、幹細胞性維持・増殖のために多くの実験で使用されているWnt-3aやR-spondin 1の単層培養ME-SMG上皮細胞への増殖効果を観察した。Wnt-3aやR-spondin 1は、細胞の平面増殖や発生における細胞の増殖・分化にも効果があるとされていることから、ME-SMG上皮細胞の単層培養においても細胞の平面的な増殖への効果を期待した。特に細胞濃度が薄い場合にこれら2つの因子が効果的なのではないかと考えていたが、実際には、Wnt-3aとR-spondin 1の有無で細胞の増殖性に違いはみられなかった (図4-A)。3回の独立した実験の定量結果を用いて一元配置分散分析を行ったが、有意な差はみられなかった (図4-B)。

考 察

本研究において、KSRとY-27632を添加することにより、ME-SMG上皮細胞単独の安定した無血清单層培養に成功した。加えて、NRG 1とFGF 1も三次元組織培養時のみでなく単層の細胞培養においてもME-SMG上皮細胞の増殖促進に必要であることを示した。

唾液腺細胞培養モデル構築にあたって問題となっていた、低濃度で細胞を播種する際の細胞の生存（定着）は、今回Y-27632^{12)–14)}を添加することによって、可能になった（図2）。これまでヒトES細胞の培養においては、細胞継代時の生存率の低さが問題となっていたが、Y-27632を添加することにより、1%程度だった生存率が27%に向上した^{19)–20)}。細胞を分離して播種すると、ミオシンの過剰活性化が引き起こされ大部分の細胞がアポトーシスにより死滅することが報告されている。このミオシンの過剰活性化をROCK阻害剤であるY-27632で阻害することで、細胞はアポトーシスを回避したと考えられる^{21)–22)}。今回、おそらくヒトES細胞と同様の事象が分散培養したME-SMG上皮細胞にも起こっていた可能性が高い。

細胞の平面増殖や幹細胞性の維持・分化に関わるとされ、各種ミニ組織（organoid）作製¹⁵⁾に使用され、組織の幹細胞ニッチの維持に貢献するWnt-3aとR-spondin 1^{16)–17)}が細胞の単層培養に必要なのではないかと予想していたが、見かけの細胞の増殖性には影響がみられなかった（図4）。今回はME-SMG上皮細胞の初代培養の細胞増殖に必要な因子を決定することを目的としたため、増殖性のみを指標とした場合は基礎培地へのWnt-3aとR-spondin 1の添加は必要がないと思われる。しかし、添加濃度による違いや、幹細胞性の維持効果などの細胞の性質変化について今回は観察していないことから、ME-SMG上皮細胞のWntシグナル経路の長期継代への影響については今後の検討を待たねばならない。

NRG 1とFGF 1については、どちらか一方のみの添加でも細胞は増殖したが、両方を欠くとその増殖性が著しく落ちることを示した（図1–C）。これまでの我々の研究で三次元培養時にそのどちらもが顎下腺原基の形態維持に必要であり、また両方を添加することで、c-Kit (+) 細胞が増加することを示した¹⁸⁾。そのため、両方を常時基礎培地に添加していたが、単層培養においてはそのどちらか一方の添加で、細胞の増殖性が維持されることがわかった。唾液腺上皮組織は、筋上皮細胞、導管細胞、腺細胞（粘液性、漿

液性）が混在しており、本実験で使用している顎下腺の原基においてもこれらの前駆細胞が存在していると考えられる。また、唾液腺上皮の幹細胞・前駆細胞は、腺房と導管のそれぞれに存在している可能性^{23)–24)}が示されており、上皮成長因子（epidermal growth factor: EGF）ファミリーであるNRG 1は腺房の増加を、FGF 1, 7, 10をリガンドとするFGFR2bシグナル経路の活性化は導管の伸長を促進^{25)–26)}させることが分かっている。そのため、NRG 1とFGF 1は、それぞれ腺房や導管の細胞を増殖させていたのではないかと推測される。しかし、本研究においては、これらの唾液腺上皮由来の様々な細胞の前駆細胞は区別しておらず、NRG 1かまたはFGF 1単独の添加で実際に増殖している細胞がそれぞれ腺房細胞や導管細胞であったのか、あるいは同じ種類の細胞で同じ性質を維持できているのか等は不明であり、今後解析を行っていく必要がある。

幹細胞の培養では、その分化を阻害し、幹細胞性を維持した培養が必要である。これまで細胞培養に使用されてきたウシ胎児血清は細胞分化因子も含むため、幹細胞の培養には適さず、様々な添加因子が開発されてきた。KSRは、血清の代替品として開発され、ES細胞やヒト多能性幹細胞培養に長く使用されてきたが、その成分は非公開であり、その未知の成分のため、添加した増殖因子の実際の作用かどうか分かりにくい²⁷⁾という指摘もある。本研究でも、KSRは、細胞の生存に必須であった一方で、10, 20%の添加ではむしろ増殖性が低下した（図3）。KSRの非公開の成分中に細胞の増殖を阻害したり細胞の分化を促したりする成分が含まれている可能性も考えられる。今後、成分が公開されている他の血清代替因子と、添加する増殖因子の関係についても常に注目して継続した検討が必要であると思われる。

今回我々は、これまでよく研究されており、培養の知見が長くにわたって蓄積されてきた顎下腺をモデルとして単層の初代培養に必須の培地を検討し、顎下腺原基の上皮のみの無血清单層培養が可能であることを示した。今後は、今回得られた培地に関する知見を元に、放射線療法による唾液腺の傷害で特に問題となっている耳下腺細胞の分散長期培養を目指したい。近頃、我々は、マウス胎児耳下腺が、顎下腺と同様に三次元培養可能であることを報告した²⁸⁾。三大唾液腺はその性質が唾液腺ごとに異なっているが、耳下腺や舌下腺も顎下腺と類似の条件で培養可能であることがわかった。今回使用したマウス顎下腺原基と同様の培地組成で、耳下腺細胞も分散培養可能と考えられる。将来の

放射線防護剤のスクリーニング等の唾液腺細胞を用いた研究に使用できる均質で大量の唾液腺細胞を得るためには、安定した継代方法の検討や、増殖した細胞集団の幹細胞性の長期維持法、唾液成分を分泌可能な腺細胞へと必要時に分化させる方法の検討など問題は山積している。

謝 辞

本研究はJSPS科研費16K15863の助成を受けたものです。2017年7月30日に急逝された共同研究者の故野川宏幸先生（千葉大学大学院理学研究科）はこの論文の共著者となるべきでした。野川先生は本研究の開始にあたって唾液腺の培養技術を伝授して下さり研究全般にわたってご助言くださいました。深く感謝いたすとともに心からご冥福をお祈り申し上げます。

文 献

1. Jensen SB, Pedersen AM, Vissink A, Andersen E, Brown CG, Davies AN, et al. : A systematic review of salivary gland hypofunction and xerostomia induced by cancer therapies: management strategies and economic impact. *Support Care Cancer*. 2010; 18(8): 1061-79
2. 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(4): 983-91
3. Konings AW, Faber H, Vissink A, and Coppes RP: Radioprotective effect of amifostine on parotid gland functioning is region dependent. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005; 63(5): 1584-91
4. Grundmann O, Mitchell GC, and Limesand KH: Sensitivity of salivary glands to radiation: from animal models to therapies. *J Dent Res*. 2009; 88(10): 894-903
5. Knox SM, Lombaert IM, Haddox CL, Abrams SR, Cotrim A, Wilson AJ, et al. : Parasympathetic stimulation improves epithelial organ regeneration. *Nat Commun*. 2013; 4: 1494
6. Lim JY, Yi T, Lee S, Kim J, Kim SN, Song SU, et al. : Establishment and characterization of mesenchymal stem cell-like clonal stem cells from mouse salivary glands. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015; 21(5): 447-57
7. Pringle S, Nanduri LS, van der Zwaag M, van Os R, and Coppes RP: Isolation of mouse salivary gland stem cells. *J Vis Exp*. 2011(48)
8. 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(6): 957-64
9. Xiao N, Lin Y, Cao H, Sirjani D, Giaccia AJ, Koong AC, et al. : Neurotrophic factor GDNF promotes survival of salivary stem cells. *J Clin Invest*. 2014; 124(8): 3364-77
10. 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
11. 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(6): 604-19
12. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, et al. : Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*. 1997; 389(6654): 990-4
13. Sakamoto K, Hori M, Izumi M, Oka T, Kohama K, Ozaki H, et al. : Inhibition of high K⁺-induced contraction by the ROCKs inhibitor Y-27632 in vascular smooth muscle: possible involvement of ROCKs in a signal transduction pathway. *J Pharmacol Sci*. 2003; 92(1): 56-69
14. Nishimaru K, Tanaka Y, Tanaka H, and Shigenobu K: Inhibition of agonist-induced positive inotropy by a selective Rho-associated kinase inhibitor, Y-27632. *J Pharmacol Sci*. 2003; 92(4): 424-7
15. Sato T, and Clevers H: SnapShot: Growing Organoids from Stem Cells. *Cell*. 2015; 161(7): 1700.e1
16. Clevers H, Loh KM, and Nusse R: Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science*. 2014; 346(6205): 1248012
17. Maimets M, Rocchi C, Bron R, Pringle S, Kuipers J, Giepmans BN, et al. : Long-Term In Vitro Expansion of Salivary Gland Stem Cells Driven by Wnt Signals. *Stem Cell Reports*. 2016; 6(1): 150-62
18. Hayasaka Y, Nogawa H, Sekimata M, and Murakami-Sekimata A: The effects of neurogulin 1 and/or fibroblast growth factor 1 on the differentiation of mouse embryonic submandibular gland ex vivo culture cells. *Yamagata Med J*. 2016; 34(2): 42-9
19. Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, et al. : A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2007; 25(6): 681-6

20. Emre N, Vidal JG, Elia J, O'Connor ED, Paramban RI, Hefferan MP, et al. : The ROCK inhibitor Y-27632 improves recovery of human embryonic stem cells after fluorescence-activated cell sorting with multiple cell surface markers. *PLoS One*. 2010; 5(8): e12148
21. Ohgushi M, Matsumura M, Eiraku M, Murakami K, Aramaki T, Nishiyama A, et al. : Molecular pathway and cell state responsible for dissociation-induced apoptosis in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010; 7(2): 225-39
22. Ohgushi M, and Sasai Y: Lonely death dance of human pluripotent stem cells: ROCKing between metastable cell states. *Trends Cell Biol*. 2011; 21(5): 274-82
23. Aure MH, Konieczny SF, and Ovitt CE: Salivary gland homeostasis is maintained through acinar cell self-duplication. *Dev Cell*. 2015; 33(2): 231-7
24. Pringle S, Van Os R, and Coppes RP: Concise review: Adult salivary gland stem cells and a potential therapy for xerostomia. *Stem Cells*. 2013; 31(4): 613-9
25. Morita K, and Nogawa H: EGF-dependent lobule formation and FGF7-dependent stalk elongation in branching morphogenesis of mouse salivary epithelium in vitro. *Dev Dyn*. 1999; 215(2): 148-54
26. 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(6): 1223-34
27. 菅-岸本, 三佳, 古江-楠田, 美保 : ヒト多能性間細胞培養用培地の開発の現状と課題. *生物工学*. 2014 ; 92(9): 487-90.
28. Nakao A, Inaba T, Murakami-Sekimata A, and Nogawa H: Morphogenesis and Mucus Production of Epithelial Tissues of Three Major Salivary Glands of Embryonic Mouse in 3D Culture. *Zoolog Sci*. 2017; 34(6): 475-83

The effects of serum replacement and Rho-associated protein kinase (ROCK) inhibitor, Y-27632 on the monolayer-culture of mouse embryonic submandibular gland epithelial cells in serum-free medium

Yumi Suina*, **Chiaki Homma***, **Yuko Aso***, **Shiho Yagihashi***,
Masayuki Sekimata***, **Akiko Sekimata*,****

**Division of Theoretical Nursing and Genetics, Faculty of Medicine Yamagata University*

***Division of Theoretical Nursing and Genetics, Graduate School of Medical Science Yamagata University*

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

ABSTRACT

Background: Our study focuses on the establishment of an *in vitro* culture model for salivary gland cells to develop strategies to protect salivary glands from adverse events, such as hyposalivation or oral mucositis, which are associated with cancer therapies. We tested four selected factors for their effect on monolayer-culture of mouse embryonic submandibular gland (ME-SMG) cells.

Method: The salivary gland epithelia were isolated from the ME-SMG rudiments at 13 days post coitum. The epithelia were dispersed into single cells, which were subsequently seeded on 96-well culture plate, and their growth was observed in culture medium with and in that without the selected factors.

Results: A monolayer of ME-SMG cells was able to proliferate when all four selected factors were added to the medium. Of these factors, KnockOut™ Serum Replacement (KSR) and Y-27632 were found to be essential for the growth of the cells. Further, we evaluated whether Wnt3a and R-sponding 1, which are involved in maintaining stem cell-ness and cell differentiation, promote cell growth; neither of these factors were found to promote cell growth.

Conclusion: The addition of KSR and Y-27632 to the basal medium enabled the successful culture of ME-SMG epithelial cells.

Key words: submandibular gland, epithelial cells, hyposalivation, mucositis, cancer therapy