

令和 元年 6 月 12 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17272

研究課題名(和文) 濃縮末梢血幹細胞群とmicroRNAによる腺房細胞分化誘導システムの開発

研究課題名(英文) Delivery of concentrated peripheral blood derived EPCs and functional miRNAs for atrophic salivary gland regeneration

研究代表者

野田 さわこ (NODA, Sawako)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：00713900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、濃縮末梢血血管内皮前駆細胞群(CP-EPC)と機能性miRNAをデリバリーすることで、放射線性萎縮唾液腺に対する新規細胞治療を開発することにある。萎縮腺組織に残存する導管部幹細胞の増殖や腺房細胞分化に関わるmiRNAのデリバリーを、CP-EPCの投与に併用することで腺組織の再生効果を増幅させることを企図する。研究期間中では、障害唾液腺に対するCP-EPC投与による血管誘導作用を確認することができたものの、miRNAの併用による機能増幅の知見を得るには至らなかった。そのため、引き続き有効性を認めるmiRNAの探索とそれらの細胞治療への併用を検証しているところである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的特色は、組織修復の起点となる抗炎症作用や血管新生を誘導した上で、障害組織の組織幹細胞に分化刺激を与えるという組織再生のオーソドックスなストラテジーを、細胞治療と核酸医薬デリバリーの2つの治療技術の併用により達成されるかを検証するところにある。CP-EPCの投与による組織再生効果は、期待される血管新生の効果から、萎縮腺組織に残存する導管部幹細胞の増殖や分化の活性を高めることが予想できる。さらに、機能性miRNAによって、その効果を増幅させることが出来れば、再生医療の新しい治療ストラテジーを提案することが出来る。

研究成果の概要(英文)：The specific hypothesis of this study is that concentrated peripheral blood-derived EPCs (CP-EPC) can rescue the radiogenic salivary gland atrophy. Furthermore, we hypothesized that the delivery of functional miRNA that contributes the proliferation or differentiation of salivary gland epithelial cells may be able to promote the efficacy of CP-EPC transplantation. As a result, administration of CP-EPC could induce the vasculogenesis in atrophic glands after 12Gy of head and neck irradiation. However, administration of miRNAs could not affect the efficacy of CP-EPC therapy. Therefore, we are currently trying to find the useful miRNAs to enhance the efficacy of CP-EPC transplantation.

研究分野：口腔外科学・再生医学

キーワード：唾液腺 再生 血管内皮前駆細胞 miRNA 唾液腺細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌治療の1つである化学放射線治療（CRT）の副作用として現れる重度口内炎、骨髄抑制、唾液腺萎縮による口腔乾燥や晩期顎骨壊死などの障害は、治療遂行の障害となると同時に、術後 QOL を著しく低下させる。そして、これらの障害に対する有効な治療法は、現在までに確立されていない。特に、唾液腺萎縮による口腔乾燥症は、嚥下・構音障害や多発性う蝕、味覚障害などを惹起し、口腔機能を著しく低下させる。そのため、CRT に伴う副作用の根治的治療を含めた低侵襲治療体系の確立が強く望まれている。

このような CRT 併発疾患に対して、われわれは萎縮唾液腺に対する細胞治療法の開発に取り組んできた。近年、骨髄に由来する血管内皮前駆細胞（EPC）が末梢血中の単核球成分の一部として存在することが示されて以降、骨髄由来細胞を用いた細胞治療の有効性が、血管や心筋、肝臓等の再生や脳梗塞治療等で示唆されている。その中で、われわれのグループは、唾液腺萎縮モデルへの BMDC の静脈内投与が、腺房細胞の再生と唾液分泌量の回復を誘導しうることや、放射線性口腔粘膜炎モデルにおいて、BMDC 投与による潰瘍形成の予防効果を見出している。さらに、BMDC 投与による効果発現のメカニズムの一端として、投与された細胞群の障害組織における血管新生への寄与を明らかにしている。そして、最近では BMDC に含まれる間葉系幹細胞群（MSC）による唾液腺萎縮症の治療効果も報告しており、BMDC を構成する細胞群に一定の投与効果が期待できることを明らかにしている。しかしながら、BMDC や MSC による細胞治療については、細胞の採取に侵襲が大きいことや、移植に必要な MSC の確保に長期培養が必要であり、時間や費用を含めて多大な労力が必要となること、これらの細胞の投与により一定の治療効果は期待できるものの、その効果は十分とは言えないこと等、将来の細胞治療の確立に向けて克服すべき問題点は多い。特に、細胞投与のタイミングについても、臨床上、原疾患寛解後の唾液腺萎縮が既に固定化した時期が最も妥当と考えられるため、その時期での臨床応用に向けた有効なスキームを開発していく必要がある。そこで、本研究では、そのようなタイミングでの細胞治療には、組織再生の起点となる血管再生に大きく貢献し得る細胞を確保すると共に、萎縮腺組織に残存している唾液腺幹細胞に強い分化刺激を与える工夫が必要であると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、濃縮末梢血血管内皮前駆細胞群（CP-EPC）と機能性 micro（mi）RNA を生体内にデリバリーすることで、化学放射線性萎縮唾液腺に対する効果的な新規細胞治療法を開発することにある。具体的には、萎縮腺組織に残存する導管部幹細胞の増殖や腺房細胞分化に関わる miRNA の全身、あるいは局所へのデリバリーを、CP-EPC 群の投与に併用することで腺組織の再生効果を増幅させることを企図する。CP-EPC は、新規 EPC 濃縮法によって末梢血から効率的に抽出・濃縮した EPC と抗炎症性細胞が濃縮された細胞群である。この基盤技術に核酸医薬デリバリー技術を応用することで、より効果の高い化学放射線性萎縮唾液腺に対する細胞治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

（1）CP-EPC の移植

① 唾液腺萎縮モデルの作出： C57BL/6 マウスの顎下腺領域を含んだ頭頸部のみに放射線照射を与えることのできる器具を用い、12Gy (gamma-ray) の線量を照射することで、照射後約 8 週で通常量の約 40% 以下の唾液分泌量低下を導く障害を唾液腺に与えることができる。その後、照射後 8、13、24 週にてマウスの体重計測と唾液分泌量の計測を行ない、唾液腺の機能低下を確認した。

② CP-EPC 群の抽出・増幅： 本実験では、移植細胞の生体内挙動解析のため、雄 8 週齢 C57BL/6 マウスから単離した細胞を、雌の同齢 C57BL/6 マウスへ移植した。これは、FISH 法によりドナー由来 Y 染色体の検出を行うためである。細胞の単離は、血液凝固処理をした注射筒を用いてマウス心臓より採血を行った。次いで数回の遠心操作を行い、単核球成分を多く含む buffy coat を採取した。Buffy coat には少量の赤血球も含まれるため塩化アンモニウムを加え溶血させた。その後、単核球成分を EPC に誘導する培養条件下にて培養を 5 日間行った。EPC は、主に自己増殖の働きを持つ未分化型の small EPC と自ら血管を形成する分化型の large EPC の 2 種類に分けられる。そのため、この細胞の colony 数の比較を行うことで、増幅した EPC 群が増殖もしくは血管形成に主に働く細胞群であるかを評価した。

③ 細胞投与：細胞の投与は、約 5×10^5 個 CP-EPC 群を 200 μ l IMDM 培地に濃縮し、1 匹のマウスへの 1 回投与に用いた。投与は尾静脈に行い、投与時期は障害予防群として照射翌日と、組織再生群として腺房細胞の消失が顕著になる照射後 13 週の 2 つのタイミングで行った。さらに、投与はそれぞれのタイミングから 3 週間（週 1 回）連続して行った（各々計 3 回の投与）。比較検討群として、骨髄から抽出した MSC の投与も同様に実施した。MSC は、採取した骨髄

から CD45 陰性の細胞群をマグネットビーズにて抽出した後、培養を行ない増幅させた。抽出は Mouse Mesenchymal Stem/ Progenitor Cell Enrichment Kit (STRMCELL 社)にて簡便にできる。

④ 細胞投与後の評価： 組織学的観察として、照射後 8、13、24 週で顎下腺を摘出した。それぞれの細胞投与群と非投与群において、障害の程度や血管の分布について比較した。又、ki67 や TUNEL assay を用いて細胞増殖活性やアポトーシスの評価を行った。免疫組織学的評価と Y 染色体の検出について、障害組織中に存在するドナー由来の細胞を検出した。さらに、ドナー由来 Y 染色体を検出する FISH と組織特異的抗体による蛍光免疫染色による 2 重染色を施した。これにより、移植細胞の障害組織での生着や血管新生、分化転換などの挙動解析を行なった。

⑤ Salivary Flow Rate： 細胞投与による唾液腺機能の回復の指標として、屠殺前のマウスから唾液を採取して、その分泌量を計測した。又、組織修復に関わる EGF の唾液中蛋白の検出なども実施した。

(2) 導管細胞の増殖や腺房細胞分化へ機能する miRNA の探索

われわれは、唾液腺上皮細胞の浮遊培養において、浮遊細胞塊を形成する導管幹細胞のうち、低接着性培養皿に接着し、増殖できる細胞群の存在を見出している。そこで、継代したこれらの細胞群がコンフルエントに到達した時点を Day 0 として、48 時間毎の細胞から miRNA を抽出・精製し、分化が成熟するまでのサンプルについて、その miRNA の発現プロファイルを qPCR Array にて網羅的な解析を試みた。Day 0 における miRNA の発現プロファイルを用いて、その後の 48 時間毎の発現データを比較し、いずれかの時点で発現レベルに 3 倍以上の変動があった miRNA を確認した。そして、miRNA について、変動が大きいものから 5 種類ほどに着目して、それらを培養細胞群に導入した。導管細胞や腺房細胞の分化マーカーの発現状態について、導入の有無により比較し、評価した。又、唾液腺の形態形成、あるいは上皮幹細胞の遊走に関連のある既知の miRNA である miR200c や miR21、miR126、miR205 など候補因子として扱い、評価を行なうこととした。

(3) 濃縮骨髄幹細胞投与と機能性 miRNA の応用

① 細胞の投与： 照射直後と照射後 13 週の両方の時期に細胞の尾静脈投与を行なった。

② 合成 miRNA の投与： 細胞投与群においても、放射線照射による腺房細胞の消失期（照射後 13 週）に一致して、唾液分泌量の低下が惹起される。投与は、合成 miRNA 50~100 μ g を溶解したアテロコラーゲンによって、尾静脈経由（全身投与）と顎下腺への直接投与（局所投与）の両方を試みた。初回投与は照射後 13 週から開始し、3 週の間、1 週間に 1 回のペースで行なった。細胞投与と時期が重なる場合は、日にちをずらして miRNA の投与を行なった。

③ 移植後の評価： 前年度の動物実験と同様に評価を実施した。特に、唾液分泌量の回復レベル、および腺房部組織の再生の程度を詳細に評価した。

4. 研究成果

CP-EPC の培養条件を細胞の特性解析と合わせて最適化することから本研究を開始した。フローサイトメーターによる表面抗原解析とコロニーフォーミングアッセイの結果から、培養 7 日にて採取できる CP-EPC には有意に large EPCs の割合が多く、colony 数自体も多く、分化型の large EPC が豊富に含まれていることが確認できた。そのため、血管誘導に有利であると考え、細胞投与を試みることにした。一方で、比較群として設定する骨髄 MSC の培養も実施した。移植は、障害が確立する照射後 4 週の時点で細胞の投与を開始し、その後経時的に唾液の分泌量や性状解析、採取した唾液腺試料の組織解析を実施した。その結果、骨髄 MSC と比較して、CP-EPC による血管形成に対する効果は明確であった。これについては、CP-EPC に含有されている分化型 large EPC によってもたらされたと考えられたため、現在この作用機序について解析を実施しているところである。しかしながら、機能回復の指標である唾液分泌量の回復については、投与の効果を認めるものの、障害確立後の時期では効果が十分とは言えず、miRNA のデリバリーのようなさらなる工夫が必要であることが示唆された。一方で、選定した導管細胞増殖に機能する miRNA などの導入による細胞治療の機能増幅を試みたが、miRNA を導入していない対照群と比較して、明らかな効果の優位性を認めることができなかった。そのため、現在、放射線照射を与えたマウス唾液腺組織における miRNA の発現解析から抽出したものを、培養唾液腺細胞への導入にてその機能解析を実施しているところである。それにより、有効性を認める miRNA を細胞治療に併用した時の効果を順に検討していくつもりである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

1. Noda S, Sumita Y*, Ohaba S, Yamamoto T, Asahina I. Soft tissue engineering with micronized-gingival connective tissues. J Cell Physiol. 233(1):249-258, 2018. (査読有) DOI:

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。