

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17229

研究課題名（和文）疾患炎症細胞を共培養利用した免疫調整性抗炎症細胞群による慢性唾液腺炎の新規治療

研究課題名（英文）Novel treatment of salivary gland hypofunction by immunomodulatory anti-inflammatory cell population using co-culture of diseased inflammatory cells

研究代表者

井 隆司（I, Takashi）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・助教

研究者番号：30733448

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）：放射線性萎縮唾液腺では著しい腺房萎縮、線維化の亢進がみられた。これに伴い、唾液流出量の減少が認められ、唾液腺機能の低下を確認された。また早期に血管障害が誘発され、CD血管内皮マーカー発現低下が認められた。その一方、放射線照射後の重度障害組織においても幹細胞マーカーで標識される細胞群はある一定の細胞数の生存が確認され、放射線障害後の唾液腺障害・再生の主体となる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線障害後の唾液腺組織における変わらず存在する細胞群についての報告はこれまでになく、病態・再生機構の主体となりうる細胞群であることが明らかになった。これら知見は、病態・再生機構のキーとなる分子メカニズムを解明することにより、それを基盤とした創薬化につながる可能性があり発展性のある学術的意義をもつ。また唾液腺組織だけに限らず、放射線性の他の疾患においても応用できる可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：After irradiation, acinar atrophy and fibrosis were observed in salivary glands.

Along with this, the level of saliva outflow was decreased. In addition, vascular injury was induced early stage and the expression of vascular endothelial marker was decreased. On the other hand, even in the severely damaged tissues after irradiation, a certain number of stem cells were confirmed to survive, and it was considered as main key player that induced salivary gland damage / regeneration after irradiation.

研究分野：再生医療学

キーワード：唾液腺

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群(SS)は主として中年女性に好発する涙腺と唾液腺を標的とする臓器特異的自己免疫疾患であり、乾燥性角結膜炎と慢性唾液腺炎を引き起こし患者のQOLを著しく低下させる。基礎研究レベルで自己抗原の特定をはじめ様々な治療への取り組みがされているが根治的治療の確立には至っておらず、その抜本的治療が強く望まれる難病である。これまで申請者は、慢性唾液腺炎を発症するSSモデルマウスや放射線性唾液腺萎縮症モデルマウスに対する細胞治療法の開発に取り組んできた。その中で、唾液腺導管周囲の炎症細胞に対する抗炎症作用に着目し、末梢血から効率的な抗炎症細胞群の培養に成功した。この培養法は、末梢血から抽出した単核球成分(Mononuclear Cells; MNCs)を、IL-6やSCFなど5種類の因子から成る単核球維持培地を使用した培養にて、5日間という短期間で抗炎症効果に特化した細胞群を抽出・増幅させる新規濃縮技術である。この濃縮技術は、比重遠心法にて抽出される単核球成分のみを使用するため、少量の末梢血(10~20ml程度)から短期培養のみで効率的に抗炎症作用を発揮するM2型マクロファージ様細胞を主体とした抗炎症細胞群を増幅させることが可能である。

そこで申請者は、慢性唾液腺炎を自然発症するSSモデルであるNODマウス、放射線性唾液腺萎縮症モデルマウスの両モデルマウスに対する細胞移植を実施した。8週齢時で、抗炎症細胞群を顎下腺に直接投与したモデルを移植群と設定したが、1度の細胞投与のみで唾液流出量の増加、組織障害の軽減化を認めた。その治療効果のメカニズムとしては、唾液腺組織における炎症性サイトカインの抑制を確認している。しかしながら、M2型マクロファージ様細胞が主をなす細胞群の治療で、ある一定の効果が得られているものの、(1)組織レベルでは唾液腺導管周囲の炎症細胞の浸潤が一部残存していること、(2)経時的にその治療効果が減弱していくことが課題である。より強固に炎症細胞への働きかけができ、長期間にわたって作用し続ける細胞群の開発が、本疾患に対する細胞治療確立には必須である。

一方、炎症に関わる細胞同士のクロストークについての様々な研究が行われている。その中でも炎症細胞との共培養により疾患特異的な抗炎症細胞の誘導(Maeda Y et al., 2014)が可能である点に着目した。このことから障害組織に存在する炎症細胞を抽出し、我々が用いている抗炎症細胞群との共培養により、組織障害に加担している炎症細胞群に即した、より強力な抗炎症効果を発揮する細胞群が抽出できるとの考えに至った。障害をもたらす炎症細胞群との共培養により抽出される細胞群は、障害部位に投与することで、障害性炎症細胞に対してより反応性の高い抗炎症効果が期待できる。

### 2. 研究の目的

新規培養法による抗炎症効果をもつM2型マクロファージ様細胞を主体とした細胞群を末梢血から誘導し、SSモデル、放射線性唾液腺萎縮症モデルの唾液腺組織中の炎症細胞を抽出し共培養することで、ナイーブ細胞やM1型マクロファージからの抗炎症細胞群誘導により抗炎症作用の増幅が見込める。また炎症細胞との感作により活性化した状態に誘導することで疾患特異的かつ機能的にもより強力な抗炎症作用が期待できる。これらを唾液腺疾患マウスモデルの顎下腺に投与することでその治療効果を評価し、細胞治療体系を確立させる。

SSに対する研究の取り組みは、これまでSS発症の原因、特に自己抗原の解明にフォーカスしたものであった。しかしこれまでの研究で明らかのように、SSは免疫異常、遺伝要因、ウイルス感染、女性ホルモンの影響などの複数の要因により発症すると考えられている。SSと診断された患者個人個人においても発症原因は異なることが考えられ、その原因の多様性に応じた治療の提示が大きな課題である。そこで本研究では治療のターゲットを多岐にわたる原因でなく、様々な原因の結果引き起こされている組織における炎症細胞そのものに設定した。

また一方、慢性疾患である放射線性唾液腺萎縮症においては、放射線照射後、腺房細胞のアポトーシス、導管の狭窄による排出障害、過剰な線維化などのため、その唾液腺機能は著しく失われるが、放射線照射後、慢性炎症の状態を持続させる主となる炎症性細胞についての明らかな報告はなく、その実態はよくわかっていない。そのため、組織の慢性炎症状態に対してキーとなる細胞群を探索し、それらと感作させた細胞群の抽出による細胞治療による新規治療法の開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

放射線性萎縮唾液腺マウスモデルやSSマウスモデルより唾液腺組織を摘出し、組織内で障害過程・再生過程で大きく変動する細胞群をそれぞれ免疫染色等で解析を行い、疾患を誘導する主体となる細胞群を選定した。それら細胞群の特性解析を行い、末梢血由来の抗炎症細胞群と感作させるのに適切な細胞群を選定した。

(1)SSモデルマウス・放射線性唾液腺萎縮症モデルマウス組織からの炎症細胞の検出; SSモデルマウスの設定については、1型糖尿病モデルであるNODマウスを使用した。NODマウスは1型糖尿病及びシェーグレン症候群の自然発症モデル動物として利用されており、経時的に唾液腺障害が確立される。本研究では、NODマウスの顎下腺組織を経時的に摘出し、炎症性細胞群(CD4陽性細胞等)を免疫組織化学染色等で検出した。一方、放射線性萎縮唾液腺はマウス頭頸部のみ線照射を行い、腺房細胞の減少・線維化を組織学的観察で確認し、経時的な唾液流出量の減少するモデルを設定した。その後マウスの顎下腺組織を経時的に摘出し、炎症性細胞群(CD4陽性細胞等)を免疫組織化学染色等で検出した。

(2) SS モデルマウス・放射線性唾液腺萎縮症モデルマウスにおける疾患誘導の主体となる障害組織における細胞群の特性解析； 両モデルマウスにおいて経時的な病変の進行と併せて病態誘導の主体となる細胞群の特性解析を行った。具体的には、CD4、CD8 をはじめとした炎症性細胞マーカーを経時的に評価し、疾患の主体となる細胞群の特定、抽出を目的とした。それと同時に、炎症性細胞以外にも着目し、唾液腺組織に疾患障害を誘導する細胞群についても解析した。具体的には、幹細胞関連マーカーを網羅的に評価し、経時的な疾患の障害の重症化においても障害を誘導しうる細胞群を解析した。

#### 4. 研究成果

放射線性萎縮唾液腺では、マウス頭頸部のみの12Gyの線照射後、徐々にCD4陽性細胞の炎症性細胞浸潤が組織全体に認められはじめ、腺房萎縮、線維化の亢進がみられた。これに伴い、唾液流出量の減少が認められ、唾液腺機能の低下が確認された。また極めて早期に血管障害が誘発され、血管内皮マーカー発現低下、唾液腺機能関連マーカーの遺伝子発現の低下が認められた。炎症関連マーカーの遺伝子発現増加等もみられた一方、放射線照射後の重度障害組織においても、ある幹細胞マーカーで標識される細胞群(blood vessel resident cell:BVRC)は安定して存在していた。組織間質においてもBVRCの存在は照射後、一時的に増加し、放射線障害後の重度唾液腺障害組織においても生存し、それらによる疾患誘導の主体となる可能性が考えられたため、細胞数の変動の個体差が大きい炎症性マーカーでなく、これら細胞群の特性解析を行うこととした。放射線障害萎縮唾液腺の詳細な観察において、その再生過程・障害過程の両方にBVRCが寄与していることを示唆する所見を得たため、現在BVRCの組織中からの精度の高い単離を試みており、再生過程から障害過程への誘導にスイッチするメカニズムを明らかにして、抗炎症細胞群との共培養を経ることで、疾患特異的に強力に作用する治療用抗炎症細胞群の誘導を行っている。

一方、SSマウスモデルの組織中の炎症性細胞群の解析を、免疫組織化学染色を主として行った。モデルマウスにはNODマウスを使用したが、血糖値のばらつきが同週齢のマウスの比較において認められ、導管周囲にみられる炎症性細胞群の数が個体間で大きいことが問題として考えられた。現在はCD4、CD8、マクロファージといった炎症の主となる細胞群ごとの解析を経時的に行い、SSの誘導の主体となる炎症細胞群の選定を行っているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takashi I, Yoshinori Sumita, Takako Yoshida, Ryo Honma, Mayumi Iwatake, Jorge Luis Montenegro Raudales, Tomoko Shizuno, Shinichiro Kuroshima, Haruchika Masuda, Makoto Seki, Simon D Tran, Takayuki Asahara, Izumi Asahina	4. 巻 10
2. 論文標題 Anti-inflammatory and Vasculogenic Conditioning of Peripheral Blood Mononuclear Cells Reinforces Their Therapeutic Potential for Radiation-Injured Salivary Glands	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Res Ther.	6. 最初と最後の頁 1414-1417
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13287-019-1414-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Woersdoerfer P, Takashi I, Izumi Asahina, Yoshinori Sumita, Erguen S	4. 巻 -
2. 論文標題 Do not keep it simple: recent advances in the generation of complex organoids.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Neural Transm (Vienna).	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00702-020-02198-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Shinichiro Kuroshima, Kazunori Nakajima, Muneteru Sasaki, Takashi I, Yoshinori Sumita, Takayuki Asahara, Izumi Asahina, Takashi Sawase	4. 巻 10
2. 論文標題 Systemic Administration of Quality- And Quantity-Controlled PBMCs Reduces Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of Jaw-Like Lesions in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Res Ther.	6. 最初と最後の頁 209-221
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13287-019-1308-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sumita Yoshinori, OI Takashi, Iwatake Mayumi, Yoshida Takako, Tran SD, Asahara Takayuki, Asahina Izumi
2. 発表標題 Effective peripheral blood mononuclear cells promote the regeneration of radiation injured salivary glands.
3. 学会等名 5th TERMIS World Congress（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----