

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08690

研究課題名(和文) 乳歯歯髄幹細胞培養上清由来因子を用いた新規皮膚炎治療法の検討

研究課題名(英文) Novel treatment of dermatitis using secreted factors derived from stem cells of human exfoliated deciduous teeth

研究代表者

橋本 登 (HASHIMOTO, Noboru)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教

研究者番号：90712365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者たちのグループはヒト乳歯歯髄幹細胞培養上清(SHED-CM)とそこに含まれる分泌型Siglec-9等が種々の炎症性疾患の病態を改善することを報告してきた。本研究ではOvalbumin反復貼付アトピー性皮膚炎(AD)モデルマウスに対しSHED-CMを投与したところ皮膚病態の改善が見られた。SHED-CM投与により皮膚組織におけるT細胞を有意に減少させた。一方で、制御性T細胞(Treg)が増加し、かつIL-4発現が抑制されておりTregがAD病態関与Th2細胞を抑制していることが考えられた。効果因子についてSHED-CM中のLC/MS解析を行い効果因子の同定をおこなっている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アトピー性皮膚炎の発症・進展のメカニズムは未解明な点が多く重篤な症状に対する有効な治療法は少ない。免疫抑制分子、細胞を効率よく誘導することができる手法は炎症性疾患の治療において重要な課題である。SHED-CMに含まれるsSiglec-9等のT細胞を標的としたAD病態改善効果とその詳細な分子機構が明らかになることは新たなT細胞制御機構の解明につながると考えている。さらにその知見を元にした抗炎症と再生の多面的な効果メカニズムは次世代のAD治療薬開発の情報基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We has reported that human deciduous dental pulp stem cell culture supernatant (SHED-CM) and its secreted Siglec-9 and other components improve the pathogenesis of various inflammatory diseases. In this research, administration of SHED-CM to a mouse model of atopic dermatitis (AD) with repeated Ovalbumin application improved skin pathology; SHED-CM administration significantly reduced T cells in the skin tissue. On the other hand, regulatory T cells (Treg) increased and IL-4 expression was suppressed, suggesting that Tregs suppress Th2 cells involved in AD pathology. LC/MS analysis of SHED-CM is being conducted to identify effectors.

研究分野：免疫学、糖鎖生物学

キーワード：アトピー性皮膚炎 乳歯歯髄幹細胞 Siglec-9 T細胞

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎(AD)は若年期から発症する炎症性皮膚疾患である。その発症メカニズムとしてT細胞の関与が近年明らかになっており、特にヘルパーT細胞がアトピー性皮膚炎の主たる原因と言われている。研究代表者達のグループはヒト乳歯髄幹細胞培養上清(SHED-CM)とそこに含まれる分泌型 Siglec-9 (sSiglec-9)とケモカイン MCP-1 がマクロファージを炎症誘導 M1 型から抗炎症 M2 型へ誘導し、種々の炎症性疾患の病態を改善することを報告してきた。

2. 研究の目的

アトピー性皮膚炎の発症・進展のメカニズムは未解明な点が多く重篤な症状に対する有効な治療法は少ない。sSiglec-9 は抗炎症作用だけでなく、組織修復・再生効果因子を産出する細胞を誘導することで、組織再生の起因として機能することが明らかになりつつある。また SHED-CM に含まれる治療効果液性因子は種々あると考えられ多面的効果のより炎症性疾患の病態を制御していると考えられる。そのため液性因子の効果の詳細を明らかにする本研究により新しい AD 治療法開発につながる可能性が高い。本研究では SHED-CM とそこに含まれる液性効果因子の AD 病態改善効果を検討した。

3. 研究の方法

卵白アルブミン(OVA)反復塗布アトピー性皮膚炎マウス(AD マウス)を作成した。Alum アジュバントを使用し OVA を Balb/c マウスに免疫したのちに背中 of 皮膚に OVA の 1 週間連続塗布を行った。その後 1 週間の間に sSiglec-9、SHED-CM、対照用 CM を投与し、その後再度 OVA の 1 週間連続塗布を行った。その病態変化を評価した。評価方法は (1) 皮膚組織の組織学的評価(ヘマトキシリンエオジン染色、トルイジンブルー染色)。(2) 皮膚組織から抽出した RNA とタンパク解析。(3) 免疫組織学的評価による細胞集団プロファイルの変化。以上の手法により sSiglec-9 および SHED-CM の AD 病態改善効果のその効果メカニズムを解析した。

4. 研究成果

Ovalbumin (OVA)反復貼付 AD モデルマウス (OVA-AD マウス) に対し sSiglec-9、SHED-CM を投与したところ AD 皮膚病態の外的評価が改善された。組織学的評価を行ったところ皮膚肥厚の抑制が見られ表皮細胞の異常増殖やリンパ球浸潤の抑制が見られた。(図 1 上中段) 角質細胞の主要タンパク filaggrin 発現の

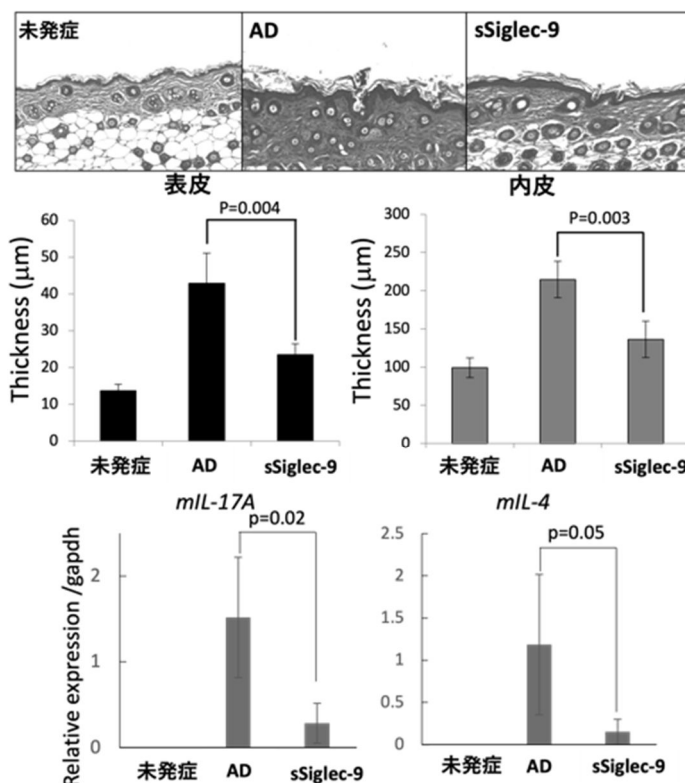


図1.OVA-patch接触部のHE染色.AD発症で表皮内皮の肥厚が見られる。一方、sSiglec-9投与群では肥厚が抑制されている。また、IL17AやIL-4などの炎症性サイトカインの抑制が見られる。

回復が見られ皮膚バリアの改善効果を示唆された。また AD 素因である IgE 抗体血中濃度の抑制が見られた。痒みを引き起こすヒスタミン産出する肥満細胞数の減少が見られた。そこでリンパ球プロファイルの変化を観察するために免疫組織学的評価を行った。SHED-CM 投与により CD3、CD4 陽性の細胞 (T 細胞) は未治療の AD マウスに比べ有意に減少していた。

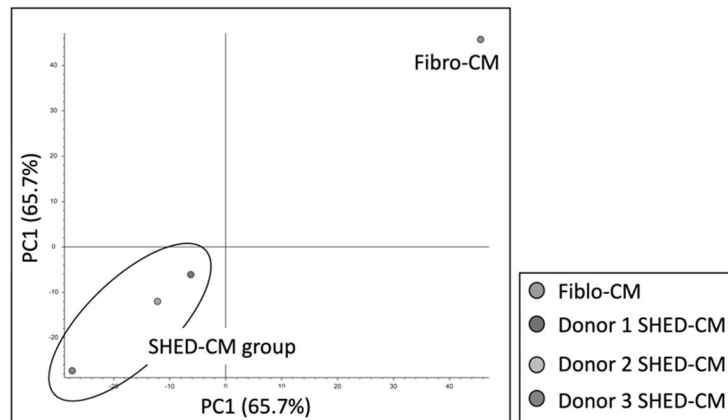


図2.培養上清に含まれるタンパク質の主成分分析 . LC/MSにより3種のSHED-CMとFibro-CMに含まれるタンパクの網羅的解析を行った

一方で、FOXP3 陽性である制御性 T 細胞 (Treg) が増加しており SHED-CM 投与による Treg リクルートまたは誘導効果が示唆された。皮膚組織の RNA 解析においても CD3、CD4、FOXP3 発現に同様な結果が見られた。また皮膚組織における IL-4 発現が sSiglec-9 または SHED-CM 投与により未治療群に比べ抑制されていた (図 1 下段)。このことから sSiglec-9 または SHED-CM 投与は AD 病態関与ヘルパー T 細胞とされている Th2 細胞の抑制作用があることが考えられる。SHED-CM 中の効果因子について LC/MS を用いたセクレトーム解析を行い現在その分子プロファイルから効果因子の同定をおこなっている。種々の培養上清に含まれるタンパク質分子のプロファイルを比較した。SHED-CM は線維芽細胞培養上清 Fibro-CM との比較により異なる Donor から得られたものでも特徴的なクラスターを形成することが主成分分析の結果からわかった。(図 2) SHED-CM とに含まれているタンパク質本研究で明らかになった AD 病態改善メカニズムについて現在論文投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanaka Eiji, Liu Yao, Xia Linze, Ogasawara Naoko, Sakamaki Takuma, Kano Fumiya, Hashimoto Noboru, Feng Xingmei, Yamamoto Akihito	4. 巻 48
2. 論文標題 Effectiveness of low-intensity pulsed ultrasound on osteoarthritis of the temporomandibular joint: A review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Biomedical Engineering	6. 最初と最後の頁 2158 ~ 2170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10439-020-02540-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Furukawa Koichi, Ohmi Yuhsuke, Yesmin Farhana, Tajima Orié, Kondo Yuji, Zhang Pu, Hashimoto Noboru, Ohkawa Yuki, Bhuiyan Robiul H., Furukawa Keiko	4. 巻 21
2. 論文標題 Novel Molecular Mechanisms of Gangliosides in the Nervous System Elucidated by Genetic Engineering	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1906 ~ 1906
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21061906	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Furukawa Koichi, Ohmi Yuhsuke, Hamamura Kazunori, Kondo Yuji, Ohkawa Yuki, Kaneko Kei, Hashimoto Noboru, Yesmin Farhana, Bhuiyan Robiul H., Tajima Orié, Furukawa Keiko	4. 巻 39
2. 論文標題 Signaling domains of cancer-associated glycolipids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Glycoconjugate Journal	6. 最初と最後の頁 145 ~ 155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10719-022-10051-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Liu Yao, Kano Fumiya, Hashimoto Noboru, Xia Linze, Zhou Qiao, Feng Xingmei, Hibi Hideharu, Miyazaki Aya, Iwamoto Tsutomu, Matsuka Yoshizo, Zhang Zhijun, Tanaka Eiji, Yamamoto Akihito	4. 巻 13
2. 論文標題 Conditioned Medium From the Stem Cells of Human Exfoliated Deciduous Teeth Ameliorates Neuropathic Pain in a Partial Sciatic Nerve Ligation Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2022.745020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kano Fumiya, Hashimoto Noboru, Liu Yao, Xia Linze, Nishihara Takaaki, Oki Wakana, Kawarabayashi Keita, Mizusawa Noriko, Aota Keiko, Sakai Takayoshi, Azuma Masayuki, Hibi Hideharu, Iwasaki Tomonori, Iwamoto Tsutomu, Horimai Nobuyasu, Yamamoto Akihito	4. 巻 13
2. 論文標題 Therapeutic benefits of factors derived from stem cells from human exfoliated deciduous teeth for radiation-induced mouse xerostomia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1~14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-29176-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Xia Linze, Kano Fumiya, Hashimoto Noboru, Liu Yao, Khurel-Ochir Tsendsuren, Ogasawara Naoko, Ding Cheng, Xu Yang, Hibi Hideharu, Iwasaki Tomonori, Tanaka Eiji, Yamamoto Akihito	4. 巻 13
2. 論文標題 Conditioned Medium From Stem Cells of Human Exfoliated Deciduous Teeth Alleviates Mouse Osteoarthritis by Inducing sFRP1-Expressing M2 Macrophages	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Stem Cells Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 399~413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/stcltm/szae006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 0件)

1. 発表者名 Yang Xu, Noboru Hashimoto, Fumiya Kano, Linze Xia, Cheng Ding, Akihito Yamamoto
2. 発表標題 Conditioned medium from stem cells of human exfoliated deciduous teeth ameliorates atopic dermatitis
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024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
研究分担者	加納 史也 (KANO Fumiya) (40801626)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部 (歯学域)・助教 (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	杉浦 一充 (SUGIURA Kazumitsu) (70335032)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関