

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463084

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞を用いたシェーグレン症候群の新規治療モデルの開拓と分子調節機構解明

研究課題名(英文) Development of novel treatment and functional analysis of molecular regulation of Sjogren's syndrome by using mesenchymal stem cells

研究代表者

伊藤 聡 (ITO, Satoshi)

岡山大学・歯学部・博士研究員

研究者番号：00319972

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、シェーグレン症候群の治療を目的に骨髄細胞を用いて実験を行った。GFP陽性骨髄細胞移植マウスを用いて解析を行った結果、唾液腺組織内にGFP陽性細胞が認められた。またGFP陽性細胞は腺房細胞、筋上皮細胞、導管等、唾液腺組織特異的な蛋白質に陽性を示した。シェーグレン症候群モデルマウスに骨髄細胞移植を行ったところ、唾液腺の明らかな縮小が認められた。以上のことから骨髄細胞により唾液腺を修復、また骨髄細胞の抗炎症作用によりシェーグレン症候群の治療に繋がる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to development the treatment of Sjogren's syndrome by using mesenchymal stem cells. When we used the mouse that was implanted GFP positive bone marrow cells, GFP positive cells was observed in salivary gland. And GFP positive cells were shown in mucous cells, myoepithelial cells, salivary duct and the specific protein in the salivary gland. In addition, when we implanted the GFP positive bone marrow cells to Sjogren's syndrome model mice, the salivary gland body reduced obviously. Therefore these findings indicate that bone marrow cells affect the restoration of salivary gland, and that anti-inflammatory effect of bone marrow cells treat Sjogren's syndrome.

研究分野：口腔外科

キーワード：シェーグレン症候群 骨髄細胞 唾液腺

1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群は涙液分泌障害、口腔乾燥症を主な症状とした全身性の自己免疫疾患であり、口腔領域では唾液分泌量の低下から齲蝕、カンジダ感染、歯周病等、様々な口腔疾患の原因になることが知られている。しかしながらシェーグレン症候群に対する治療は人工唾液の口腔内への噴霧、抗炎症剤投与等の対症療法しかなく、有効な治療法が無いのが現状である。また近年罹患者は増加傾向にあり、新規治療法の開発が求められている。

近年、間葉系幹細胞が T 細胞を制御し強力な免疫抑制効果を示すことが報告され、間葉系幹細胞の自己免疫疾患に対する治療効果が期待されている。実際に治療が非常に困難であった GVHD (graft versus host disease) においては、培養した間葉系幹細胞の臨床応用研究が始まっており良好な治療実績をあげている。

我々は現在までに骨髄間葉系幹細胞の多分化能に関する研究を行ってきており、骨髄由来細胞が頭頸部領域の神経細胞や嗅上皮細胞等の細胞へ分化することを確認している。また、培養条件・細胞の回収法等を改善することにより効率的な骨髄間葉系幹細胞の採取、培養法の確立に成功している。

2. 研究の目的

本研究では未だ根治治療法のない難治性疾患シェーグレン症候群に対して、損傷した唾液腺組織を骨髄細胞を用いて再生するとともに、シェーグレン症候群の自己免疫疾患の治療に骨髄間葉系幹細胞を適応し新規治療法の開発を行うことを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 骨髄細胞の唾液腺組織への移行ならびに唾液腺構成細胞への分化について

骨髄細胞が唾液腺組織構成細胞に分化することを確認するため C57BL/6-Tg(CAG-EGFP) マウス (以下 GFP マウス) 由来骨髄細胞を同系野生型マウスに移植を行い、解析を行った。実験は GFP マウスを麻酔下にて安楽死させ大腿骨脛骨を摘出後、骨周囲軟組織を可及的に切除した。骨組織は α MEM 培地にて骨髄細胞を洗浄、GFP マウス由来骨髄細胞を HBSS で約 1×10^7 個 / 200 μ l 細胞数の浮遊液を調整した。その後、同系野生型マウスに X 線照射 (10 Gray) を行った後、尾静脈から細胞を移植した。骨髄細胞移植後 4 週間は感染予防のために酸性水 (pH 3.0) を与えて飼育した。骨髄細胞移植を行ったマウスは経時的に唾液腺組織を摘出し 4% パラフォルムアルデヒドで固定、定法にてパラフィン切片を作製、HE 染色、抗 GFP 抗体を用いて免疫組織化学的染色を行い組

織学的観察した。

尚、本研究において使用した全ての動物は、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科の実験動物ガイドラインに従い飼育、使用した。本研究は岡山大学動物実験委員会の審査、承認を受けて行った。

免疫組織化学的染色

脱パラフィン後、室温で 30 分間 0.3% 過酸化水素メタノール溶液にて内因性ペルオキシダーゼをブロックした。抗体は抗 GFP 抗体を使用し 37 で 5 分間 0.1% トリプシン溶液により前処理、抗 GFP 抗体を 1000 倍に希釈して 4 で overnight にて反応させた。次に抗 GFP 抗体に対する二次抗体を用いて免疫反応を行い ABC kit で反応、DAB 発色を行い組織学的に観察した。

(2) 骨髄細胞移植マウス唾液腺組織における GFP 陽性細胞の同定について

摘出した唾液腺に認められた GFP 陽性細胞の同定を行うため、粘液細胞、漿液細胞、導管、筋上皮細胞、血管内皮細胞にそれぞれ特異的な抗体として、抗 AQP5 抗体、抗 amylase 抗体、抗 CK19 抗体、抗 α SMA 抗体、抗 CD31 抗体を用いて抗 GFP 抗体との免疫蛍光二重染色を行った。

蛍光免疫二重染色

蛍光二重染色は前述唾液腺構成細胞に特異的な抗体を用いて、GFP- AQP5、GFP- amylase、GFP- CK19、GFP- α SMA、GFP- CD31 の組み合わせについて行った。それぞれの抗体の組み合わせにおいて 4 で overnight にて反応させた後、TBST で洗浄、各一次抗体に特異的な二次抗体を室温で 60 分間反応させた。標本は TBST で洗浄後、対比染色として DAPI で核染色を行った後に蛍光顕微鏡で観察した。

(3) シェーグレン症候群モデルマウスの作成と骨髄細胞による抗炎症効果の解析について

骨髄細胞によるシェーグレン症候群の治療効果の確認のためシェーグレン症候群モデルマウスの作製および骨髄細胞移植による治療効果の判定を行った。

シェーグレン症候群モデルマウスの作製

モデルマウスの作製には MRL/MpjjmsSlc-lpr/lpr マウスを用いた。同マウスはシェーグレン症候群の徴候が現れ始めるとされている 9 週齢から 4 週間経過した 13 週齢、および 8 週間経過した 17 週齢に顎下腺、および耳下腺組織を一塊に摘出、定法にてパラフィン切片を作成、HE 染色を施し組織学的に観察した。

骨髄細胞の抗炎症効果の解析

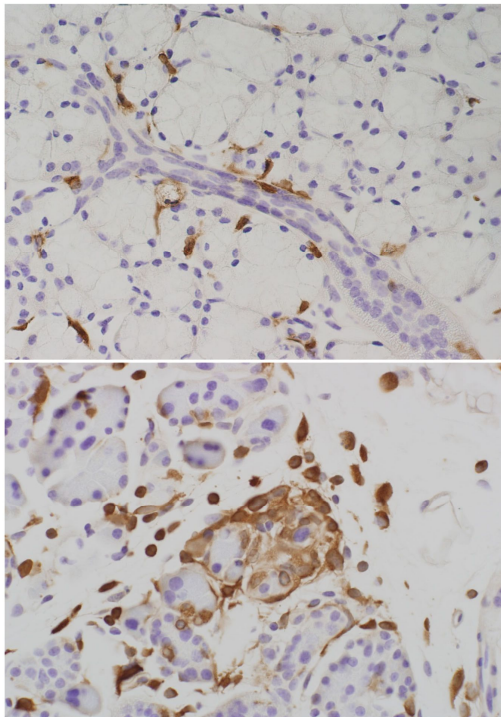
モデルマウスに MRL/MpjjmsSlc-+/+ 野生型マウス骨髄から得られた細胞の移植 (約 3×10^7 個) を尾静脈から行った。モデルマウスは骨髄細胞移植を 9 週齢に 1 回施行し 4 週間経過した 13 週齢と、骨髄細胞移植を 9 週

齢と 13 週齢の 2 回施行し 17 週齢に顎下腺および耳下腺組織を摘出、定法にてパラフィン薄切切片を作製、HE 染色を行い組織学的に観察した。

4. 研究成果

(1) 骨髄細胞の唾液腺組織への移行ならびに唾液腺構成細胞への分化について

シェーグレン症候群により損傷した唾液腺組織を、骨髄細胞を用いて再生可能であるかについて検討するため、GFP マウス由来骨髄細胞移植マウスを用いて、骨髄細胞の唾液腺組織構成細胞への分化能について組織学的に解析を行った。骨髄由来 GFP 陽性細胞は、耳下腺および顎下腺の唾液腺組織に多数認められた。GFP 陽性細胞は粘液腺、漿液腺にかかわらず認められ、双方の陽性細胞率には大きな差を認めなかった。また GFP 陽性細胞の大多数は、豊かな胞体を有する細胞形態からマクロファージ等の炎症性細胞である可能性が考えられた(図1)。しかしながら一部の粘液細胞、筋上皮細胞を構成する細胞に GFP 陽性細胞が認められ(図1)、骨髄由来細胞がこれら唾液腺組織を構成する細胞へ分化する能力を有している可能性が示唆された。

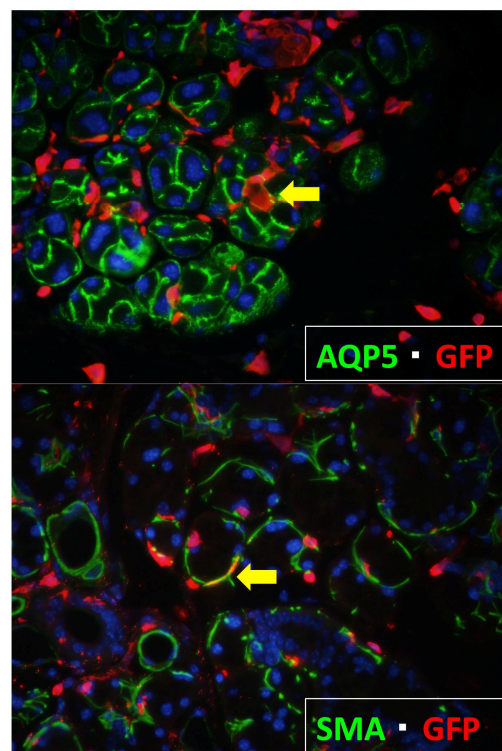


(図1)

(2) 骨髄細胞移植マウス唾液腺組織における GFP 陽性細胞の同定について

GFP 骨髄細胞移植マウスの耳下腺、顎下腺の唾液腺組織に認められた GFP 陽性細胞の性状について蛍光免疫二重染色法を用いて組織学的解析を行った。その結果マウス耳下腺、顎下腺の唾液腺組織に多数認められた GFP 陽性細胞の多数はマクロファージ等血

球系の細胞が殆どと考えられた。しかし少数の細胞で GFP と腺房細胞に特異的な抗原 AQP5 に陽性を示した(図2)。また GFP と漿液細胞、導管、筋上皮細胞、にそれぞれ特異的な amylase、CK19、 α SMA (図2) 抗原に陽性を示していたことから、唾液腺組織を構成する腺房細胞、筋上皮細胞、導管の一部は骨髄由来の細胞であることが確認された。GFP および CD31 抗原に共に陽性を示す明確な細胞は認められず、骨髄由来細胞の血管内皮細胞への分化は確認できなかった。以上のことから骨髄由来細胞は唾液腺組織を構成する全ての細胞に分化可能であり、シェーグレン症候群によって損傷した唾液腺組織は骨髄細胞を用いることにより、再生治療できる可能性が示唆された。



(図2)

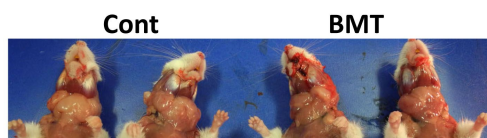
(3) シェーグレン症候群モデルマウスの作成と骨髄細胞による抗炎症効果の確認について

シェーグレン症候群モデルマウスの解析
作製したシェーグレン症候群モデルマウスの唾液腺組織について組織学的解析を行った。モデルマウス 13 週齢の唾液腺組織では導管中心性にリンパ球を主体とする炎症性細胞の浸潤と集簇が認められ、隣接するリンパ球の増大も確認された。17 週齢のモデルマウスでは炎症性細胞の浸潤集簇が増加しており、経時的にシェーグレン症候群の症状が進行する傾向が認められた。以上のことからシェーグレンモデルマウスの作成に成功したと判断した。

シェーグレン症候群モデルマウスにおける骨髄細胞移植の効果について

モデルマウスに同系野生型マウス由来の

骨髄細胞移植を行ったところ、肉眼的に唾液腺組織と付随するリンパ節の明らかな縮小が認められた(図3)。骨髄細胞移植を2回施し17週齢に摘出した唾液腺組織では骨髄細胞移植処理を行っていない唾液腺と比較して、付属のリンパ節を含む唾液腺重量が約2割減少していた。組織学的解析では炎症性細胞浸潤の若干の抑制傾向が認められた。以上のことから野生型マウス骨髄細胞の移植により、炎症性細胞浸潤の抑制効果が期待でき、シェーグレン症候群における自己免疫疾患の治療に骨髄細胞が効果的である可能性が示唆された。



(図3)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7件)

Sakai K, Nakano K, Matsuda S, Tsujigiwa H, Ochiai T, Shoumura M, Osuga N, Hasegawa H, Kawakami T. Pathological Analysis of Cell Differentiation in Cholesterol Granulomas Experimentally Induced in Mice. *Int J Med Sci.* 13(3):220-224. 2016
DOI: 10.7150/ijms.13853. eCollection 2016.

Kaneko K, Matsuda S, Muraoka R, Nakano K, Iwasaki T, Tomida M, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Kawakami T. Histological Evaluation of Periodontal Ligament in Response to Orthodontic Mechanical Stress in Mice. *Int J Med Sci.* 12(9):689-94. 2015
DOI: 10.7150/ijms.12883. eCollection 2015.

Takaya T, Mimura H, Matsuda S, Nakano K, Tsujigiwa H, Tomida M, Okafuji N, Fujii T, Kawakami T. Cytological Kinetics of Periodontal Ligament in an Experimental Occlusal Trauma Model. *Int J Med Sci.* 12(7):544-51. 2015
DOI: 10.7150/ijms.12217. eCollection 2015.

Yuan Y-W, Tamamura R, Lei L, Katase N, Ara S G, Ito S, Tsujigiwa H, Nagatsuka H. The Ability of Transplanted Bone Marrow-Derived Cells to Differentiate into Parenchymal Cells of Salivary Glands. *J Hard Tissue Biology.* 22(4):433-438. 2013
<http://doi.org/10.2485/jhtb.22.433>

Tomida M, Tsujigiwa H, Nakano K, Muraoka R, Nakamura T, Okafuji N, Nagatsuka H, Kawakami T. Promotion of Transplanted Bone Marrow-derived Cell Migration into the Periodontal Tissues due to

Orthodontic Mechanical Stress. *Int J Med Sci.* 10(10):1321-1326. 2013
DOI: 10.7150/ijms.6631. eCollection 2013.

Noda Y, Nishizaki K, Yoshinobu J, Orita Y, Tsujigiwa H, Yamada M. The engraftment and differentiation of transplanted bone marrow-derived cells in the olfactory bulb after methimazole administration. *Acta Otolaryngol.* 133(9):951-956. 2013
DOI: 10.3109/00016489.2013.803153. Epub 2013 Jul 4.

Tsujigiwa H, Hirata Y, Katase N, Buery RR, Tamamura R, Ito S, Takagi S, Iida S, Nagatsuka H. The Role of Bone Marrow-Derived Cells During the Bone Healing Process in the GFP Mouse Bone Marrow Transplantation Model. *Calcif Tissue Int.* 92(3):296-306. 2013
DOI: 10.1007/s00223-012-9685-3. Epub 2012 Dec 22.

〔学会発表〕(計 3件)

松田寛之、辻極秀次、高島清文、伊藤 聡、藤井昌江、中野敬介、長塚 仁：GFP 骨髄移植マウスを用いた、異所性骨形成過程における骨髄由来細胞の役割の検討。第36回岡山歯学会総会・学術集会、岡山、2015年9月27日

伊藤 聡、辻極秀次、武部祐一郎、高島清文、河合穂高、長塚 仁：移植骨髄由来細胞の唾液腺組織への移行、分化に関する研究。第59回公益社団法人口腔外科学会総会・学術大会、千葉、2014年10月18日

伊藤 聡、片瀬直樹、玉村 亮、武部祐一郎、山近英樹、高木 慎、長塚 仁：八二カムβ-TCP細胞外微小環境下での硬組織形成。第58回日本口腔外科学会総会・学術大会、福岡、2013年10月12日

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 聡 (ITO Satoshi)
岡山大学・歯学部・博士研究員
研究者番号：00319972

(2)研究分担者

長塚 仁 (NAGATSUKA Hitoshi)
岡山大学・大学院医歯(薬)学総合研究科・教授
研究者番号：70237535

辻極 秀次 (TSUJIGIWA Hidetsugu)
岡山理科大学・理学部・教授

研究者番号：70335628

玉村 亮 (TAMAMURA Ryo)
日本大学・歯学部・助教
研究者番号：00403494

片瀬 直樹 (KATASE Naoki)
川崎医科大学・医学部・助教
研究者番号：30566071

水川 展吉 (MIZUKAWA Nobuyoshi)
岡山大学・大学病院・講師
研究者番号：00263608