

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20590

研究課題名(和文)新規培養法による末梢血濃縮細胞群由来エクソソームを用いた萎縮唾液腺再生療法の開発

研究課題名(英文)Development of atrophic salivary gland regeneration therapy using exosome derived from vasculogenic conditioned-peripheral blood mononuclear cells induced by new culture system

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、頭頸部癌の放射線療法に併発する唾液腺萎縮症を対象に、新規の血管内皮前駆細胞(EPC)濃縮法により誘導された細胞群のエクソソームを用いた治療を展開することで、萎縮唾液腺組織の再生を図る治療技術を開発することである。血管新生能力をColony Forming Assayで評価したところ、培養期間が5日の場合が最もColony数の増加を認めた。続いて5日間培養後の細胞よりエクソソームを抽出し、萎縮唾液腺に局所投与したところ治療効果が見込める現象を一部確認できたため、詳細なメカニズム解析を目的に現在細胞投与実験を継続して実施している。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop a therapy for salivary gland hypofunction caused by radiation therapy for head and neck cancer by using exosomes of vasculogenic conditioned-peripheral blood mononuclear cells induced by new culture system. The ability of angiogenesis was evaluated by the colony forming assay, and it was found that the number of colony increased most when the culture period was five days. Subsequently, exosomes were extracted, localized administration to the atrophic salivary glands revealed some phenomena that could be expected to be therapeutic effects. We currently conduct experiments for the further analysis.

研究分野：再生医療学

キーワード：唾液腺 血管内皮前駆細胞 エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌の放射線療法に併発する不可逆性の疾患である唾液腺萎縮症は、口腔乾燥のみでなく、唾液量の減少に伴う口腔粘膜の憎悪や多発重度齶蝕を惹起し、疼痛による摂食障害や構音障害など著しい口腔機能低下をもたらし、術後患者の QOL を著しく低下させる。対処療法として含嗽剤やムスカリン受容体刺激薬などの薬物療法が挙げられるが現状ではその効果は十分とは言えない。そのため、頭頸部癌の放射線療法には、併発する唾液腺萎縮症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る。

現在、動物実験の段階で、放射線性唾液腺萎縮症に対する骨髄由来細胞等による細胞治療の効果が報告されている(Sumita Y et al. 2011)。その治療効果のメカニズムの一端として障害組織における血管新生が挙げられる。われわれはこの血管新生を起点とした組織再生の治療効果に着目し、血管内皮前駆細胞(EPC)による細胞治療を企図した。EPCは骨髄由来の細胞で末梢血液中にも存在することが報告されている(Asahara T et al. 1997)が、その細胞数は末梢血中では少数であると考えられ、その血管新生能力においても患者の既往歴・年齢などの全身状態により差異がある。これより骨髄もしくは末梢血中の EPC を用いた細胞治療では治療効果においても差異が生じ、臨床的応用を目指すうえでは大きなハードルとなる。そこでわれわれは、新規の EPC 濃縮法<Quality and Quantity culture (QQ culture)>により末梢血から効率的に抽出・濃縮した EPCs と炎症性細胞の集団の誘導を可能(Masuda H et al. 2012)とした培養を利用した細胞治療に着目した。これにより採取した末梢血単核球成分を、血管新生能を持つ細胞群に生体外で誘導することで患者の全身状態に左右されにくいより均一な血管新生能を持った細胞群を誘導できる(Tanaka R et al. 2013)。また、新規培養法を用いることにより CD34 陽性細胞のように煩雑な単離技術を必要とせず、骨髄採取と比較して低侵襲である少量の末梢血(10ml 程度)から短期で効率的に EPC を増幅させることが可能である。これらの知見に基づき、動物実験において濃縮末梢血 EPC 細胞群による細胞治療を試行した結果、われわれは高い細胞治療効果を放射線性唾液腺萎縮症に対して確認した(I T et al. in revision)。

しかしながら、細胞治療には以下に述べる問題点が考えられるため、臨床応用に向けての弊害を有している。①投与細胞の免疫原性・腫瘍化の危険性を否定できないこと、②静脈投与の際に肺で移植細胞の多くがトラップされてしまい、目的の障害部位まで細胞が到達しないばかりか肺塞栓を引き起こす可能性があること、③細胞治療のための細胞の培養期間が必要であり、細胞治療開始までにタイムラグが生じることなどである。これ

ら問題点は、臨床応用における細胞治療の確立に向けて克服すべき課題と言える。

2. 研究の目的

一方、エクソソームと呼ばれる細胞外分泌小胞が、細胞間相互作用において重要な役割をもつことが明らかになり、急速に注目を浴びている。エクソソームの小胞中にはタンパク質、mRNA や miRNA などの物質が内包されており、その情報伝達物質の種類は 1,000 種類を超えるとの報告もあり(Waldenström A et al. 2012)、世界の研究者がエクソソームを用いた新規治療法の開発に取り組んでいる。

その中でも興味深いことは、MSC 由来のエクソソームを尾静脈投与することで、MSC を投与することと同様の効果が得られたことである(Katsuda T et al. 2013)。われわれはこの現象に着目し、濃縮末梢血 EPC 細胞群による細胞治療ではなく、治療効果を持つ分子を含有するエクソソームを運搬体として利用し、濃縮末梢血 EPC 細胞群由来エクソソームを用いた新規治療法への応用を考えた。

エクソソームは膜上に MHC class I, II を発現し、抗原提示能をもつものの、①レシピエントにおける免疫応答は細胞と比較して小さく(Paul D. Robbins et al. 2014)、他人のエクソソームを利用できる可能性がある。また腫瘍化するリスクは、未分化の細胞と比較して極めて低いものと考えられる。②またその大きさ(50~1000nm)から移植の際に肺でトラップされにくい。加えて、③凍結保存ができるため、必要時に用事調整が可能であり、治療が必要な際に、培養期間によるタイムラグが省略できる。

これらより、エクソソームは臨床応用の際に、細胞治療の問題点を解決に導くパラダイムシフトになりえる。以上の知見から、組織再生の起点となる血管再生と抗炎症作用を発揮すると考えられる濃縮末梢血 EPC 細胞群由来のエクソソームによる治療は、放射線性唾液腺萎縮症において、実現性の高い治療法に成り得ると考えた。

本研究の目的は、頭頸部癌の放射線療法に併発する放射線性唾液腺萎縮症を対象に、新規の濃縮末梢血 EPC 細胞群により誘導された細胞群のエクソソームを用いた治療を展開することで、萎縮唾液腺組織の再生を図る治療技術を開発することである。本研究の新規性は、萎縮唾液腺に対する細胞治療において、既に細胞治療の効果が確認されている新規 EPC 濃縮法で培養された細胞群のエクソソームを治療に応用することにある。治療効果をもたらす物質の運搬体としてエクソソームを利用することで、臨床応用の際に問題とされてきた細胞治療の弊害を網羅的に解決しうることが独創的な点と言える。また、これまでに治療効果の報告されている BMDCs や MSCs よりも、極めて強力な治療効果をもつ濃縮末梢血 EPC 細胞群を由来

とするエクソソームを治療に応用出来れば、優れた効果と高い汎用性が期待できる。また、その効果と他家移植の際の免疫寛容が確認されれば、早期に臨床応用される可能性が高く、濃縮末梢血 EPC 細胞群由来エクソソームの創薬化も実現可能であり、安全性や実現性の観点から、唾液腺萎縮症だけでなく口腔領域の他の疾患についても新しい治療のツールとして広く応用される可能性がある。

3. 研究の方法

(1) 放射線性唾液腺萎縮モデルの作出；

放射線性唾液腺萎縮モデルの作出については、C57BL/6 マウスの顎下腺領域まで含んだ頭頸部のみ放射線照射を与えることのできる機器を用いて、放射線照射を行い照射後の唾液流出量を測定し、その障害程度を把握した。

(2) 濃縮末梢血 EPC 細胞群の抽出；

濃縮末梢血 EPC 細胞群の抽出において、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た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 EPCs に誘導するサイトカイン【VEGF (50 ng/ml)、IL-6 (20 ng/ml)、Flt3-ligand(100 ng/ml)、thrombopoietin (20 ng/ml)、SCF (100 ng/ml)】添加培地による QQ 培養を行った。

(3) 濃縮末梢血 EPC 細胞群の血管新生能力についての評価；

EPCs は主に自己増殖の働きを持つ small EPCs と自ら血管を形成する large EPCs の 2 種類に分けられる。この細胞の colony 数の比較を行うことで、増幅した EPCs 細胞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できる。まずは QQ 培養期間の検討を行い、血管新生能力を colony assay や遺伝子発現を評価することにより最適な培養期間を決定した。QQ 処理後の EPCs 群は有意に large EPCs の割合が多く、colony 数自体も多いことをこれまでの研究で確認している。

(4) 濃縮末梢血 EPC 細胞群由来エクソソームの抽出；

濃縮末梢血 EPC 細胞群から超遠心法 (100,000g 以上で 70 分間、4°C) でエクソソームを回収した。回収されたエクソソームは洗浄の行程を経た後、タンパク質低吸着チューブに入れ、使用タイミングに応じた保存を行った (1 か月保存の場合は 4°C、長期保存の場合は -80°C)。

(5) エクソソーム投与後の組織回復の評価；

① 唾液分泌量の計測 (salivary flow rate) : 放射線照射後 3 日目にエクソソームを局所投与したのち、投与による唾液腺機能の回復の指標として、屠殺前、照射後 4、8、12 週のマウスから唾液を採取して、その分泌量を計測した。

② 組織学的観察：顎下腺を放射線照射後 4、8、12 週で採取し、顎下腺を組織学的に観察した。それぞれのエクソソーム投与群と非投与群において、障害の程度や血管の分布状態について免疫組織化学的染色法を用いて比較・解析した。加えて腺房細胞の障害程度・再生程度を評価するため PAS 染色により評価した。

4. 研究成果

(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放射線照射を与え 12Gy (gamma-ray) の線量を照射することで、照射後 4 週で、通常量の約 30% まで唾液分泌量の低下を導く障害を唾液腺に与えることができた。それ以上の強度の γ 線照射はマウスに致死的な強度になりうることを確認できたため、障害モデル作成のための γ 線の強度は 12Gy と設定した。

(2) 濃縮末梢血 EPC 細胞群の抽出；

C57BL/6 マウスの心臓部より鎮静下においてマウス 1 匹あたり 0.7~1.0ml 程度の末梢血の採血が可能であった。したがって一度の QQ 培養の際にはマウス 10 匹から末梢血 (7~10ml 程度) を採取し、数回の遠心操作後に単核球成分を抽出し、1well あたり 2×10^6 個の単核球を播種し、5well 分 (1×10^7 個相当) の QQ 培養を行った。培養期間については QQ culture の培養期間の検討のため、3、5、7、9 日とそれぞれ設定した。条件としては無血清条件下の培養液で培地交換はその期間には行わなかった。

(3) 濃縮末梢血 EPC 細胞群の血管新生能力についての評価；

濃縮末梢血 EPC 細胞群の血管新生能力を Colony Forming Assay で評価したところ、培養期間が 5 日間の場合が最も Colony 数の増加を認め、large EPCs の割合も多かった。7 日以降の培養は細胞の減少が著しくエクソソームの抽出に必要な細胞数の確保が困難であった。これより濃縮末梢血 EPC 細胞群の血管新生能力がより高く、エクソソーム抽出のための細胞数確保が可能な培養期間は 5 日間と判断した。

(4) 濃縮末梢血 EPC 細胞群由来エクソソームの抽出；

続いて 5 日間培養後の細胞よりエクソソームを抽出し、血管新生関連の遺伝子の mRNA の発現を評価したが、どの培養期間の細胞か

ら抽出したエクソソームよりも有意に上昇を認めることが示唆された。

(5) エクソソーム投与後の組織回復の評価；

唾液腺萎縮モデルマウスに対してまずは局所投与を行い、障害予防と組織再生効果を評価した。唾液流出量においては濃縮末梢血 EPC 細胞群による細胞治療と同程度の回復が見込める現象を一部確認できたため、組織における血管新生が機能回復のメカニズムの一つと考え、詳細なメカニズム解析を目的に現在細胞投与実験を継続して実施している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

① 井隆司, 住田吉慶, 岩竹真弓, 朝比奈泉;

放射線性唾液腺萎縮症に対する末梢血由来再生アソシエイト細胞による細胞治療の試み、

第 34 回長崎障害者支援再生医療研究会、2017

② Takashi I, Yoshinori Sumita, Haruchika

Masuda, Shinichiro Kuroshima, Simon D Tran, Takayuki Asahara, Izumi Asahina, Mechanism analysis of cell therapy with vasculogenic conditioned peripheral blood mononuclear cells for the radiation-induced salivary gland hypofunction、

国際幹細胞学会(ISSCR)、2016

③ 井隆司;

血管内皮前駆細胞を主体とした末梢血濃縮細胞群による放射線性萎縮唾液腺再生療法のメカニズムの解析、

第 61 回日本唾液腺学会総会、2016

6. 研究組織

(1)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