

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06281・19K21370

研究課題名(和文) 羊水由来細胞を応用した組織マクロファージ再構築による萎縮唾液腺の再生

研究課題名(英文) Regeneration of atrophic salivary glands by reconstructing tissue macrophages using amniotic fluid-derived cells

研究代表者

榎原 峻 (NARAHARA, Shun)

長崎大学・病院(歯学系)・助教

研究者番号：50827615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、周産期付属物由来細胞を応用した治療法の開発研究が盛んに行われているが、我々は羊水組織中の細胞群を効率的に培養し、唾液腺再生を可能にする高機能細胞群としての有用性を検討してきた。羊水細胞中には免疫寛容性の高い細胞群があるとの報告があったが、実際の採取となると胎脂が多く、効率的に細胞群を採取することが困難であった。そこで羊水ではなく臍帯や臍帯血から細胞を採取し、免疫寛容性の高い幹細胞を採取することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで処分されてきた周産期産物には(1)細胞の分化・増殖能が高い、(2)免疫寛容性が極めて高いため同種移植の可能性があり、などの特徴がある。これまでも周産期付属物の再生医療の応用は数多く試みられており、特に臍帯血由来造血幹細胞移植は既に広く臨床応用されている。しかしながら日本国内における採取システムやそれらの応用に関してはまだ進んでいないのが現状である。長崎大学では羊膜バンクや細胞バンクを設立し、それらの細胞群の応用から実用化を目指しており、今回の我々の研究は多に社会的意義があると言える。

研究成果の概要(英文)：In recent years, research and development of therapeutic methods using cells derived from perinatal appendages have been actively conducted, but we have been able to efficiently cultivate cell groups in amniotic fluid tissue and achieve high performance of salivary glands. We have examined its usefulness as a cell group. Although amniotic fluid cells were reported to have a cell group with high immunological tolerance, it was difficult to collect cell groups efficiently because of the large amount of vernix in the actual collection. Therefore, we succeeded in collecting stem cells with high immunological tolerance by collecting cells from umbilical cord or cord blood instead of amniotic fluid.

研究分野：再生医療

キーワード：周産期産物 唾液腺再生

1. 研究開始当初の背景

加齢や放射線照射による唾液腺萎縮症やシェーグレン症候群による唾液腺障害は、口腔内の唾液量を減少させ、口腔乾燥だけではなく、口腔内の自浄作用が失われることで、多発重度齲蝕や重症歯周炎を惹起させる。また、口腔内細菌数の増加により誤嚥性肺炎の要因ともなる。このような唾液腺障害に対して、障害組織再生による唾液分泌量回復の治療法確立が強く望まれている。

【骨髄由来幹細胞を応用した細胞治療】

骨髄由来細胞 (BMDC) 治療の有効性がさまざまな臓器の再生や、自己免疫疾患の治療などで示唆されている。その中で研究代表者らは、唾液腺萎縮モデルマウスへの BMDC の静脈内投与が腺房細胞の再生と唾液分泌量を回復することや (Sumita Y et al. 2011)、放射線性口腔粘膜炎モデルマウスに対する BMDC 投与が潰瘍形成の予防に有効であることを報告してきた (I T et al. 2014)。これらの細胞群は血管新生と抗炎症作用を発揮することで機能することを明らかにしたが、自己骨髄採取の侵襲が比較的大きいにも関わらず、その効果は十分と言えず、細胞の機能に個人差も大きいことが推測される。

【自己末梢血単核球成分から得た濃縮細胞群を応用した治療】

そこで研究代表者らは自己末梢血から採取できる血管形成・抗炎症細胞群を 5 つの成長因子 (VEGF, SCF, TPN, IL6, Flt3) からなる血管内皮誘導培地を使用した培養 (5G 培養) で、血管形成に特化した血管内皮前駆細胞 (EPCs) や抗炎症細胞である M2 マクロファージ (M2) を主体とした治療用細胞群 (E-MNC) に着目した。E-MNC を放射線性唾液腺萎縮モデルマウスに移植することによって腺組織の再生および唾液分泌量の回復が認められることを明らかにした (I T et al. in revision) これらの細胞は、患者から 50~100cc の自己末梢血を採取するのみで侵襲が少なく、培養期間も 5~7 日程度と短期間で治療に足りうる細胞数を用意できるといった利点がある。しかしながら、自己末梢血は、多くの治療対象者は高齢者であることから、加齢や基礎疾患に伴い E-MNC 採取量が減少したり、機能が低下する可能性が示唆される。

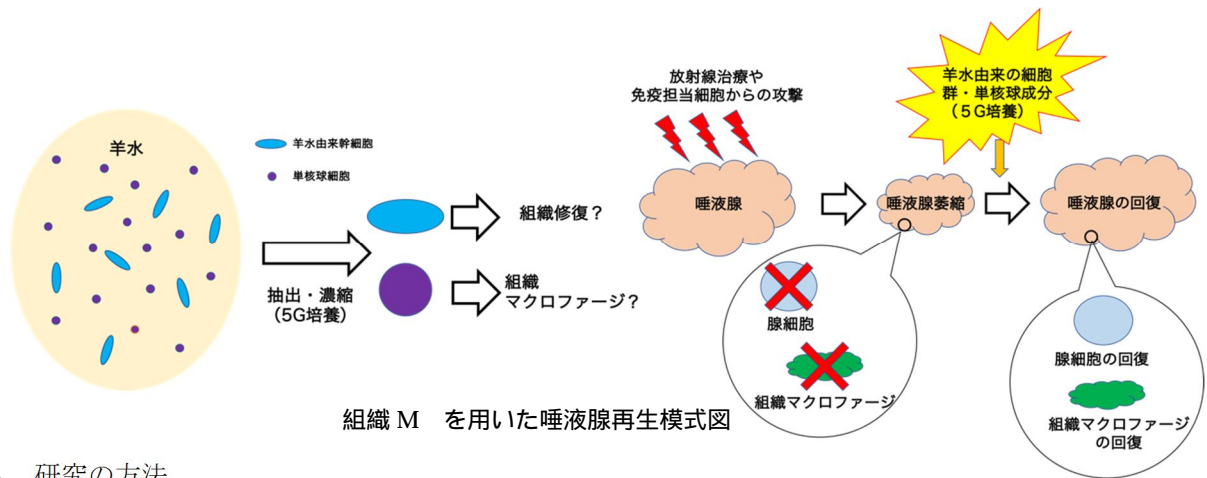
【羊水由来細胞群を応用した治療】

ここで研究代表者らのグループは周産期付属物由来細胞に着目した。現在、周産期付属物由来細胞を応用した治療法の開発研究が盛んに行われているが、これらの治療の特徴として (1) 医療廃棄物であるため余計な侵襲がない、(2) 細胞の分化・増殖能が高い、(3) 免疫寛容能が極めて高いため同種移植の可能性がある、などの特徴 (Paolo De Coppi et al. 2007) が報告されており、研究代表者らのグループではこれまで良好な成績を収めてきた 5G 培養をさらに進化させ、同種細胞でも応用可能な羊水由来細胞群を応用できないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、周産期付属物である羊水から採取した細胞群を培養・応用することで障害あるいは機能低下唾液腺の効果的な再生方法を開発することである。研究代表者らのグループはこれまで自己末梢血から採取した細胞群を 5G 培養 (前述) し、血管内皮前駆細胞や抗炎症細胞を主体とした治療用細胞群 (E-MNC) を唾液腺障害モデルマウスに直接投与し、唾液腺組織再生における有効性を明らかにしてきた。その培養技術を免疫寛容能が非常に高いと考えられる羊水由来の細胞群に応用し、同モデルマウスに投与することで、障害を受けた唾液腺組織再生への有効性を明らかにする。本研究は、近年、障害組織の再生に中心的な役割を持つと注目を集めつつある組織マクロファージの、発生由来を一にする羊水由来の細胞から分化させる方法の検討と位置づけることが可能で、抗炎症性マクロファージとは異なる組織マクロファージの機能解析に繋がるものと期待できる。

近年、臍帯血をはじめとした周産期付属物由来細胞の再生医療への応用の期待が高まっており、確かに羊水由来幹細胞を軟骨細胞へ分化させたり (Zuliani CC et al. 2018)、同細胞の投与によってモデルマウスによる後肢虚血の改善が認められる (Liu YW et al. 2013) など羊水由来幹細胞による実質組織の再生が報告されているが、研究代表者らは羊水中に含まれる単核球成分に着目し、血管新生や免疫寛容、さらに幹細胞分化をコントロールしていると考えられる細胞による再生医療の方法の確立を図ろうと考えた。



3. 研究の方法

【唾液腺組織 M の特性解析】

組織 M は臓器によって特性が違い、発現している表面抗原も様々である。様々な臓器で組織 M の表面マーカー解析はされているが、唾液腺組織 M の解析はこれまでなされていない。よってまずは唾液腺組織より組織 M を代表的な表面抗原のマーカーである F4/80⁺、CD45⁺、CXCR1、CD169、CD11b、CD206 などのマーカーについてフローサイトメトリーを用いて検出し、唾液腺組織 M の特性解析を行う。

【羊水由来単核球の特性解析と効果的培養方法の検討】

羊水中の細胞群には幹細胞や多量の単核球を含むことが報告されているが (K.Polgar et al 1989)、ヒトおよびマウス羊水から密度勾配遠心で単核球画分を回収し、細胞増殖能、コロニー形成能を解析し、さらに細胞特性をフローサイトメトリーを用いて分析する。すなわち M1 および M2 の表面抗原マーカーである CD4、CD11b、CD206、さらに前述した組織 M の代表的なマーカーである F4/80⁺、CD45⁺、CXCR1、CD169、CD11b、CD206 の含有比率を解析する。次いで、これらの細胞を 5G 培養することにより、得られる細胞の組成を同様に表面抗原マーカーで精査する。さらに唾液腺組織 M と比較し、その組成を比較検討し、羊水由来単核球を唾液腺常在組織 M の分化・増殖を可能にさせる成長因子の組成比を検討する。

4. 研究成果

近年、周産期付属物由来細胞を応用した治療法の開発研究が盛んに行われているが、我々は羊水組織中の細胞群を効率的に培養し、唾液腺再生を可能にする高機能細胞群としての有用性を検討してきた。羊水細胞中には免疫寛容能の高い細胞群があるとの報告があったが、実際の採取となると胎脂が多く、効率的に細胞群を採取することが困難であった。そこで羊水ではなく臍帯や臍帯血から細胞を採取し、免疫寛容能の高い幹細胞を採取することに成功した。

特に臍帯から取得した細胞は幹細胞が多く発現しており、今後は特殊な培養方法を用いて移植可能な高機能細胞群として有用性をさらに確認していく予定である。



実際のヒト羊膜採取写真

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----