

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10142

研究課題名(和文) 組織常在CD34陽性細胞の分化機序を標的とした放射線性唾液腺萎縮症の治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic agent for radiation salivary gland atrophy targeting the mechanism of differentiation of tissue-resident CD34-positive 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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、抗炎症/組織線維化抑制をはじめとした組織再生環境構築に寄与する Effective Mononuclear Cell (E-MNC) を利用して、放射線性唾液腺萎縮症マウスモデルにおける線維化過程のメカニズム解析と組織常在CD34陽性細胞の相互作用について解析を行った。今回、E-MNCが、貪食機能を発現する際に上昇する Msr1 や Galectin-3 を発現し、移植組織において炎症起因物質を貪食処理していることが明らかとなった。E-MNC移植組織では線維化抑制が認められており、これを利用して組織線維化抑制の過程における組織常在CD34陽性細胞の動態・機能に着目して解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究成果により、E-MNCによる炎症起因物質に対する貪食機能を介して、抗炎症作用がもたらされる機序の一端が示された。E-MNCの投与が、唾液腺組織における放射線障害後の組織再生環境の構築に寄与し、線維化の抑制につながったと考えられる。炎症起因物質の貪食による排除により、組織常在CD34陽性細胞が筋線維芽細胞へ分化する過程を抑制するメカニズムを詳細に解析中である。線維化の主体となる細胞、筋線維芽細胞へ分化する因子を解明することにより、唾液腺のみならず、他の臓器における過剰線維化の病態解明・治療法開発に発展する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Effective Mononuclear Cells (E-MNC) contribute to the establishment of tissue regeneration environment including suppression of tissue fibrosis, and we analyzed the mechanism of the fibrosis process in salivary glands after irradiation. E-MNC expressed Msr1 and Galectin-3, reflecting their high phagocytic function, and phagocytosed DAMPs in the transplanted tissue. Currently, we analyze the interaction between E-MNC and tissue-resident CD34-positive cells in the process of suppressing tissue fibrosis.

研究分野：再生医療

キーワード：唾液腺 再生 細胞治療

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 放射線性唾液腺萎縮症に対する治療体系の確立の必要性；

頭頸部癌患者の放射線療法に併発する不可逆性の疾患である放射線性唾液腺萎縮症は、口腔乾燥のみでなく唾液の減少に伴う口腔粘膜炎の憎悪や多発性重度齲蝕を惹起し、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す。治療は対症療法が中心であるが治療効果は極めて限定的であり、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。

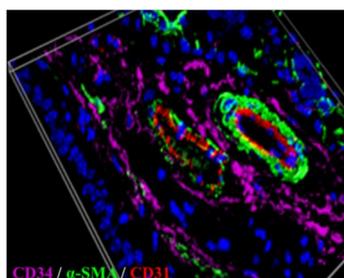
### (2) 組織再生環境構築の障害となる線維化メカニズムの解明の必要性；

放射線性唾液腺萎縮症の病態の主体は、放射線障害による腺房細胞のアポトーシス、血管障害、顕著な組織線維化である。最終段階である過剰な組織線維化は、残存組織による血管新生や腺房細胞再生などの組織再生環境の構築を否定する組織の終末像である。肺線維症、肝硬変や腎硬化症に代表される臓器線維化は、臓器の機能を担う上皮組織が I 型コラーゲンなどの細胞外マトリックス (ECM) に置き換わる病的変化である。これらは主に線維芽細胞の活性化・増殖により結合組織に過剰な ECM が沈着し線維化が進行することで、臓器不全に至る。線維芽細胞の由来として、障害組織の上皮細胞の EMT、障害組織へ遊走した骨髄・末梢血細胞による分化の可能性が報告されている。一方で、線維性疾患の病態成立の機序は、臓器・障害誘因 (放射線性・薬剤性・加齢等) に特異的であり、多彩な病態メカニズムが指摘されている。疾患の線維化改善に基づいた治療開発のため、その解明は必須であるが、特に放射線性唾液腺萎縮症においてはこれまで詳細な報告はなく、その実態は未だ解明されていない。

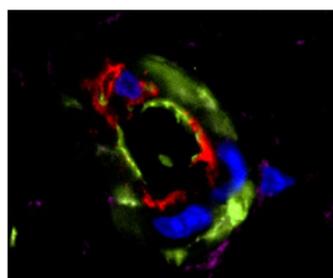
### (3) 線維化メカニズムの端緒；

放射線性唾液腺萎縮症の線維化機序において、過剰な線維化を引き起こす線維芽細胞の由来や、線維芽細胞が病変部位へ集積するメカニズム、活性化し過剰な ECM 産生に至る機序が解明されていない。前述のように、組織線維化の過程は臓器・要因に特異的であることが示唆されていることから、放射線性唾液腺萎縮症の線維化メカニズムを解明するためには、他の線維性疾患の発症メカニズムを参考に準拠しながらも、唾液腺を構成する細胞の形態・機能変化、さらに放射線照射による組織微小環境の変遷を正確にとらえ解析する必要がある。

我々は、これまでの研究により唾液腺に常在する CD34 陽性細胞 (Tissue Resident CD34 positive cells; TR34) (下図左) が放射線障害を受けた唾液腺組織において、血管障害部に遊走・集積し、一部が周皮細胞 (血管平滑筋/ペリサイト) に分化することで、障害早期には血管修復に寄与することを明らかにした (下図右)。一方で、その後 (照射後 4 週後) には、周皮細胞に分化せずに安定に存在していた TR34 が、筋線維芽細胞への分化を開始し、過剰な ECM 産生を行い組織の線維化を促す現象の一端を見出した。



血管周囲に常在する TR34 細胞(紫)



障害後 TR34 細胞(紫)は周皮細胞(緑)へ分化した

### (4) 細胞治療【Effective-mononuclear cell (E-MNC)】開発の試み；

我々は放射線治療後や一次性シェーグレン症候群(pSS)の障害唾液腺に対して、機能が低下し組織恒常性の維持が困難となった組織 M の機能の代替を可能とする細胞治療の開発を行ってきた。そして自己末梢血から誘導した M2 マクロファージ群を特徴とする抗炎症性細胞を含む E-MNC の治療開発に至った (I et al. Stem Cell Res Ther 2019)。これまでの研究により、放射線照射したマウス唾液腺に対して E-MNC を投与することにより、唾液腺組織における線維化が抑制され、唾液腺機能の低下も軽減化されており、一定の治療効果を得ている。

## 2. 研究の目的

本研究は、組織線維化抑制をはじめとした組織再生環境構築に寄与する E-MNC を利用して、放射線照射後の唾液腺における線維化過程のメカニズム解析を行った。それとともに、組織環境により分化誘導されると考えられる TR34 の可塑性に着目し、唾液腺線維化の原因となる線維芽細胞の由来・活性化の機序を解明した。そしてそのメカニズムのキーとなる分子を標的とした

治療法を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

- (1) 放射線障害唾液腺組織における筋線維芽細胞への分化誘導要因の検討；  
放射線照射後、唾液腺組織（顎下腺）において TR34 が筋線維芽細胞へ分化誘導する要因を検討した。C57BL/6 マウスの頭頸部のみ放射線照射（ $\gamma$ 線；12Gy）した顎下腺を回収し（照射後 1, 2, 4, 6, 12 週後）炎症性関連遺伝子等の発現の比較を行い、放射線照射後の顎下腺組織内の組織環境の変化と TR34 の筋線維芽細胞への分化時期との相関関係を評価した。
- (2) E-MNC の培養  
末梢血から抽出した単核球成分(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日間培養を行った。
- (3) E-MNC の特性解析；  
E-MNC の投与により、障害唾液腺における線維化が抑制されたことから、その特性解析を詳細に行うことで、線維化抑制に機能した細胞群の主体を検討した。特に組織 M<sub>2</sub> の機能と考えられる機能の代替を E-MNC が行うことを示唆していたことから、フローサイトメトリー解析で CD11b, CD206 を用いたマクロファージ分画や、Msr1 や Galectin3 などの貪食機能を詳細に評価した。また培養 E-MNC に対して異物である蛍光ビーズを添加し、*in vitro*での貪食能 (Phagocytosis Assay) も評価した。
- (4) E-MNC 中の分画投与による細胞治療効果の主体の確認；  
E-MNC の特性解析により細胞治療の主体として CD11b 陽性細胞群に着目し、それらを除いた細胞群による治療効果の評価を行った。E-MNC からの CD11b 陽性細胞の分離には Auto MACS を使用した。これによりヘテロな細胞群である E-MNC 中で、治療効果をもたらす主体となる分画を検討した。
- (5) 線維化に寄与する組織内環境要因の検討；  
E-MNC 中の治療効果の主体となる細胞群(CD11b 陽性細胞)の顎下腺投与後の動態に着目した。障害組織と細胞投与が行われた唾液腺組織を解析し、組織線維化の過程と線維化抑制をもたらす要因を E-MNC 投与唾液腺組織を用いて解析・検討した。

### 4. 研究成果

これまでに、マウス顎下腺において、放射線照射後早期における炎症性関連マーカーの遺伝子 (IL-1 $\beta$ , IL-6, TGF- $\beta$  等)の発現上昇かつその炎症の遷延化を確認した。線維化過程において TR34 が筋線維芽細胞へ分化する際に、組織線維化の過程の主要なエフェクターとして作用する因子を解析している。また、炎症が遷延化することから放射線照射による直接的な細胞死以外の機序による要因も示唆された。

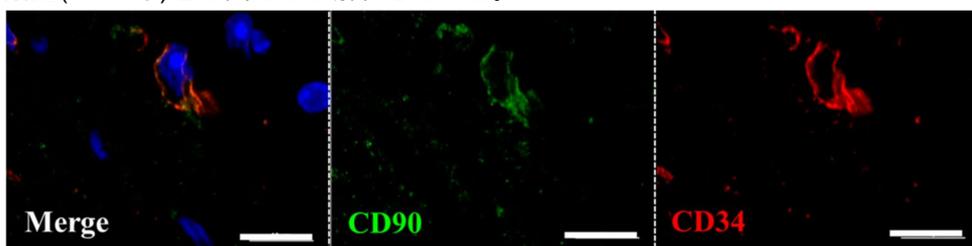
E-MNC は細胞源である末梢血単核球と比較し、CD11b/CD206 陽性の細胞群が有意に増加していた。また同時にそれら M2 マクロファージは Msr1 や Galectin-3 を発現し、高い貪食機能を有していることが示唆された。これは E-MNC に異物である蛍光ビーズを加えると添加直後より貪食することを顕微鏡下で視認し、早期に蛍光ビーズを貪食した E-MNC 分画の増加をフローサイトメトリーでも確認できた。

また、放射線照射後の顎下腺組織においては唾液流出量の低下が認められる一方、E-MNC を投与した場合においては唾液流出量の低下が軽減化され、その細胞治療の効果が認められた。また、E-MNC から CD11 陽性細胞群を単離・除去した細胞群を投与した場合においては、その細胞治療効果は減弱した。照射後 9 週、13 週の時点においても組織再生の過程で認められる組織内 EGF や HGF の濃度も減少しており、組織の線維化の抑制効果も E-MNC 投与の場合と比較してその効果は低下した。このことから E-MNC の細胞治療効果の主体は CD11 陽性細胞であり、その特性である貪食機能が寄与している可能性が示唆された。

続いて、投与細胞の動態解析を行った。E-MNC をマウス顎下腺の直接投与すると、投与後 10 日にはホスト由来の CD206 陽性の M2 型マクロファージが多数誘導されていた。投与された E-MNC 自身は Msr1 を発現し、組織障害を受けて組織中に放出された HMGB1 を貪食していた。また同時に組織修復因子である IGF-1 を放出していた。つまり、E-MNC 中の CD11b 陽性マクロファージが主体となり、高い貪食能により炎症性起因物質 HMGB1 を貪食・除去し、同時に組織修復因子 IGF-1 を放出していることが治療効果メカニズムの一端であることがわかった。

一方、唾液腺組織常在 TR34 細胞は Sca-1, CD90 なども共発現しており、可塑性のある細胞であることが示唆された。現在、抗炎症・線維化抑制に寄与する E-MNC に含有されるマクロファージを利用し、組織における過剰な線維化形成の過程の解析や、その抑制機序について、組織常在

細胞 (TR34 等) との関わりを解析している。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takashi I, Yuichiro Ueda, Philipp Woersdoerfer, Yoshinori Sumita, Izumi Asahina, Sueleyman Erguen	4. 巻 127
2. 論文標題 Resident CD34-positive cells contribute to peri-endothelial cells and vascular morphogenesis in salivary gland after irradiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neural Transmission	6. 最初と最後の頁 1467 ~ 1479
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00702-020-02256-1	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 Honma Ryo, I Takashi, Seki Makoto, Iwatake Mayumi, Ogaeri Takunori, Hasegawa Kayo, Ohba Seigo, Tran Simon D., Asahina Izumi, Sumita Yoshinori	4. 巻 12
2. 論文標題 Immunomodulatory Macrophages Enable E-MNC Therapy for Radiation-Induced Salivary Gland Hypofunction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1417 ~ 1417
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells12101417	査読の有無 無
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7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 井 隆司, 本間 遼, 魚返 拓利, 関 誠, 朝比奈 泉, 住田 吉慶
2. 発表標題 DAMPs排除機能を備えたEffectively Mononuclear Cell (E-MNC) は放射線性萎縮唾液腺の再生を促進する
3. 学会等名 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takashi I
2. 発表標題 Next-generation regenerative therapy for radiation-injured salivary gland hypofunction
3. 学会等名 IAOMS/Asian AOMS, NextGen Online Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井隆司
2. 発表標題 放射線性萎縮唾液腺における組織常在性CD34陽性細胞の挙動解析
3. 学会等名 第65回日本口腔外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井隆司, 本間 遼, 魚返 拓利, 関 誠, 朝比奈 泉, 住田 吉慶
2. 発表標題 DAMPs排除機能を備えたEffectively Mononuclear Cell (E-MNC) は放射線性萎縮唾液腺の再生を促進する
3. 学会等名 第76回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井隆司, 叶井 里歩, 本間 遼, 魚返 拓利, 関 誠, 住田 吉慶
2. 発表標題 放射線性障害唾液腺に対する Effective-Mononuclear Cell (E-MNC) 治療の作用機序解析
3. 学会等名 第77回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 叶井 里歩, 井隆司, 本間 遼, 魚返 拓利, 関 誠, 住田 吉慶
2. 発表標題 HMGB1排除機能を備えたEffectively Mononuclear Cell (E-MNC) による 放射線性萎縮唾液腺の治療開発戦略
3. 学会等名 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Riho Kanai, Takashi I, Takunori Ogaeri, Makoto Seki, Hiroshi Murata, Yoshinori Sumita
2. 発表標題 HMGB1/RAGE/TLR4 signaling is a potential target for the treatment of radiation damaged salivary glands with effectively conditioned mononuclear cells (E-MNC)
3. 学会等名 国際幹細胞学会 (ISSCR) (国際学会)
4. 発表年 2023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	住田 吉慶  (SUMITA Yoshinori)  (50456654)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授    (17301)	

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
---------	---------