

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18464

研究課題名(和文)免疫チェックポイント分子PD-L1を介したシェーグレン症候群治療モデルの開発

研究課題名(英文)Elucidating the involvement of the immune checkpoint molecule PD-1/PD-L1 pathway in Sjogren's syndrome using salivary gland organoids

研究代表者

鯨岡 聡子(Kujiraoka, Satoko)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：90824673

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)：本研究の目的は、申請者の所属研究室で開発した唾液腺オルガノイド(唾液腺同様の形態・機能を有するミニ臓器。以下、SGO)作製技術を応用し、シェーグレン症候群(以下、SS)様の病態を示すモデルマウス(NODマウス)由来のiPS細胞にPD-1/PD-L1遺伝子を導入して作製したSGOを用いて、SSの病態を解明することにある。

2020年度はマウス由来iPS細胞の樹立を行った。2021-2022年度はfeeder細胞を除去した状態での効率良いSGO誘導条件検討を試みた。現在はNODマウス由来iPS細胞樹立とfeeder free化に取り組み、NODマウス由来iPS細胞からのSGO誘導方法を開発中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

シェーグレン症候群(以下、SS)は唾液腺や涙腺などの外分泌腺に慢性炎症を伴う自己免疫疾患であり、本邦では約7万人の患者がいると考えられている。SSではドライマウスやドライアイを生じることで、患者のQOL低下は避けられない。現在のSSの治療法は人工唾液や唾液分泌促進薬などの対処療法が主体であり、根治療法の開発が急務である。本研究では唾液腺オルガノイド(唾液腺同様の形態・機能を有するミニ臓器。以下、SGO)作製技術を応用し、SSの病態解明を行うことを目的とした。現時点ではSGO作製のより良い条件を検討している段階だが、本研究の結果は、SS病態解明の一助となると考えられ、今後も研究を継続する。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the pathogenesis of Sjogren's syndrome using salivary gland organoids (mini-organs with morphology and function similar to salivary glands) generated by introducing PD-1/PD-L1 gene into iPS cells derived from model mice (NOD mice; show Sjogren's syndrome like pathological condition).

In the first year of this research, I established iPS cells derived from wildtype mice. In the second to third year, I attempted to induce salivary gland organoids under conditions without feeder cells. At this time, I have not been able to determine the probability of efficient salivary gland organoid induction conditions with feeder cells removed, however I am still investigating the method of inducing differentiation of the organoids with feeder cells removed.

研究分野：口腔病理

キーワード：オルガノイド 唾液腺オルガノイド 自己免疫疾患 シェーグレン症候群 PD-1/PD-L1 iPS細胞 唾液腺組織障害

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群 (以下、SS) は唾液腺や涙腺などの外分泌腺に慢性炎症を伴う自己免疫疾患であり、本邦では約7万人の患者がいると考えられている。SSは遺伝的背景に環境要因が関与している多因子疾患であり、発症メカニズムの詳細は未だ不明な点が多い。

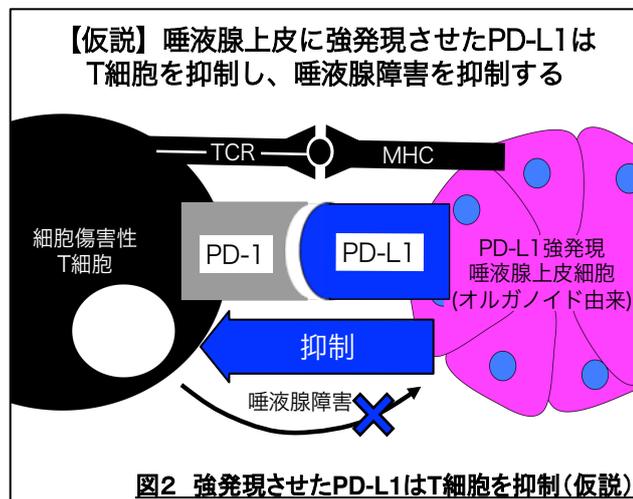
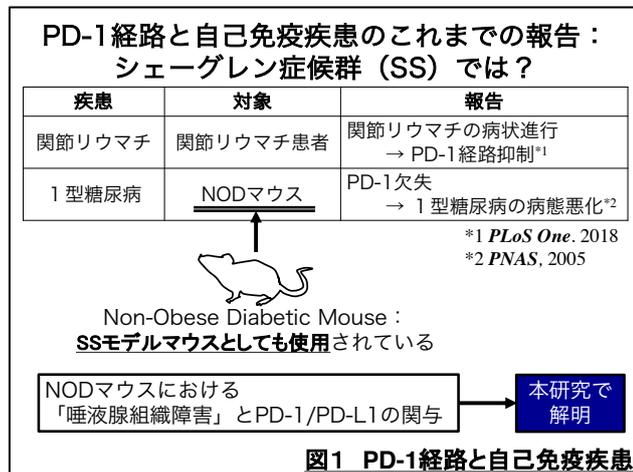
SSでは現在までに複数のモデル動物を用いた解析が行われ、報告されている。SSのモデルマウスの一つである NFS/sld マウスにおいて、自己抗原により活性化された CD4 陽性 T 細胞が FAS/FasL 経路を介して唾液腺組織障害を引き起こす可能性があることを、研究助言者の美島らが報告している (Saegusa K, et al., *J Immunol.*, 2002)。これにより、CD4 陽性 T 細胞の活性制御が腺組織障害の抑制につながる可能性

が想定された。また、Non-Obese Diabetic Mouse (以下、NOD マウス) は1型糖尿病モデルマウスとして作出されたが、唾液腺炎を自然発症することから、SSのモデルマウスとしても使用されている。このNODマウスにおいて、免疫チェックポイント分子 Programmed Death-1 (以下、PD-1) を欠失させると、ランゲルハンス島の炎症の増悪により病態が進行すると報告されている (Wang J, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005)。更に、SS以外の

自己免疫疾患においては、関節リウマチ患者の病態進行に伴い、PD-1 経路が抑制されると報告されている (Guo Y, et al., *PLoS One*, 2018) (図1)。しかし、PD-L1 の発現制御と SS の唾液腺組織障害を直接的に解析した報告は、現在まだない。

本研究は NOD マウスを用い、PD-1/PD-L1 の発現制御により自己反応性 T 細胞を介した腺組織障害の抑制が可能かどうかを、申請者の所属する教室において開発した唾液腺オルガノイド培養システムを応用し検証することである (図2)。申請者の所属する教室では、マウス ES 細胞から唾液腺オルガノイドの作出に成功し、多能性幹細胞から作製された唾液腺オルガノイドとして初めての報告となった (Tanaka J, et al. *Nat Commun.*, 2018)。本法により作出した唾液腺オルガノイドの遺伝子発現プロファイルを階層クラスタリングや主成分解析 (PCA) により解析した結果、本オルガノイドが胎生期のマウス唾液腺の 18 日齢の発達段階に相当することが明らかとなった。加えて、マウス口腔内に同所性に移植することにより、唾液を分泌することを確認した。このように、この唾液腺オルガノイドは生体内の唾液腺の動態をよく反映したものと考えられる。この手法を用いれば、ES 細胞同様に多能性幹細胞である iPS 細胞から唾液腺オルガノイドの作出は可能であると考えられた。

細胞ソースとして ES 細胞や iPS 細胞を用いたオルガノイドは、CRISPR-Cas9 システムなどのゲノム編集技術の応用が可能であることから、臓器発生に関与する転写因子ネットワークや細胞内シグナル伝達経路の解析、更には疾患関連遺伝子の機能解析に適したモデルとして期待されている。また、疾患特異的 iPS 細胞から誘導されたオルガノイドは疾患解析の強力なツールとして期待され、大腸癌などを始め多数の疾患解析に応用されている。一方、本研究の対象となる SS の病態解析には疾患モデルマウスの利用が主流であり、これまで linkage analysis により疾患関連遺伝子の同定がなされてきた。同定された疾患関連遺伝子の関与を証明するためには、疾患モデルマウスの当該遺伝子の改変が必要となり、極めて多くの時間や労力を要す



る。一方、疾患モデルマウス由来の iPS 細胞は、強制発現系や CRISPR-Cas9 システムなどのゲノム編集技術を応用することにより、治療効果の予測される遺伝子の導入や疾患関連遺伝子の改変が可能である。したがって、申請者の所属する教室にて確立された唾液腺オルガノイド技術とその同所移植モデルを応用することで、疾患モデルマウスの体内に遺伝子を改変した唾液腺を作製することが可能となり、その病態を解析することで、直接的な病因の解明が可能となる点が、本研究の学術的独自性であり創造性であると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は、申請者の所属する教室において開発した唾液腺オルガノイド培養システムを応用し、SS 様の病態を示すモデルマウス由来の iPS 細胞に PD-1 遺伝子を導入して作製した唾液腺オルガノイドを病態発症前のマウスに同所性移植することで、SS における腺障害の抑制には免疫チェックポイント分子 PD-1/PD-L1 の発現制御は有効であるかを解明することを目的に実施された。

## 3. 研究の方法

### (1) 野生型マウス iPS 細胞の樹立

野生型マウスの尾部より採取した線維芽細胞に 4 遺伝子を導入し、20 日培養することで iPS 細胞を樹立した。樹立された iPS 細胞に対して、未分化マーカー遺伝子の発現を確認することで、未分化性の確認を行った。

### (2) マウス iPS 細胞の維持培養法の習得

フィーダー細胞としてマイトマイシン C 処理をした SNL 細胞（マウス線維芽細胞）を使用し、マウス iPS 細胞の維持培養を行った。ゼラチンコート処理した 6 well プレートに SNL 細胞を  $1.7 \times 10^5$  個播種した。SNL 細胞の培養には D-MEM に L-glutamine、FBS、Penicillin-Streptomycin を添加した培地を使用した。SNL 細胞播種の翌日から 7 日以内に、マウス iPS 細胞を  $1 \times 10^6$  個播種し、48 時間静置した後、毎日培地を交換し、80-90%コンフルエントまで培養した。マウス iPS 細胞培養にはマウス ES 細胞培地（D-MEM に L-glutamine、Non-essential amino acids solution、2-mercaptoethanol、FBS、Penicillin-Streptomycin を添加）を用いた。数回継代した後、未分化能の有無を確認した。

### (3) マウス iPS 細胞のフィーダーフリー化の検討

予備実験において、マウス iPS 細胞から唾液腺分化誘導プロトコルを行うと、初期の細胞凝集塊の形成効率が、フィーダー細胞無しで維持培養したマウス ES 細胞と比較して低いことが明らかとなっていた。このため、マウス iPS 細胞のフィーダーフリー化およびフィーダー除去の条件の検討を行った。

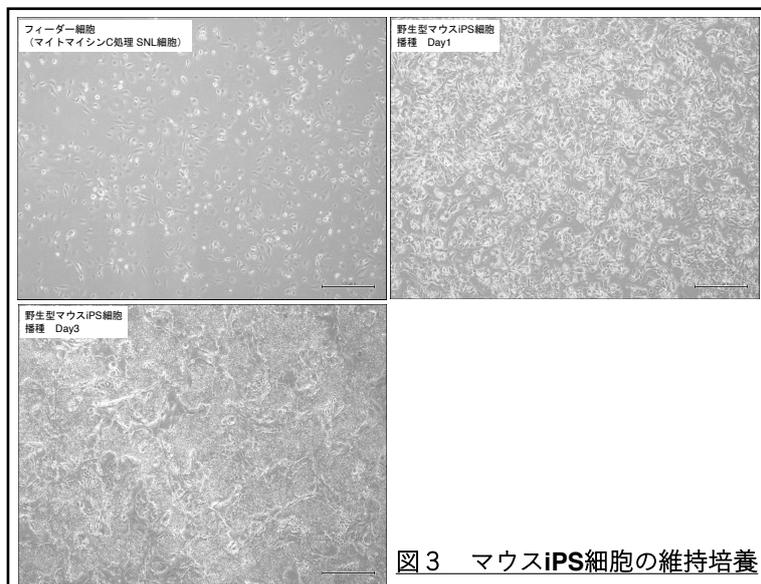
## 4. 研究成果

### (1) 野生型マウス iPS 細胞の樹立

野生型マウスの尾部より採取した線維芽細胞に、レトロウイルスベクターを用いて 4 遺伝子（Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc）を導入した。その後、ES 細胞用培地と交換し、20 日培養することで iPS 細胞を樹立した。樹立された iPS 細胞に対して、未分化マーカー遺伝子（Nanog, Oct3/4）の発現を確認することで、未分化性の確認を行った。

### (2) マウス iPS 細胞の維持培養法の習得

フィーダー細胞播種の翌日から 7 日以内にマウス iPS 細



胞を  $1 \times 10^6$  個播種したところ、数回継代後には3日後に80-90%コンフルエントに達するようになった(図3)。未分化能の有無を確認する目的でRNAを採取し、未分化マーカー遺伝子 Nanog, Oct3/4, c-Myc, Klf4, Sox2 の発現を確認した(図4)。

### (3) マウス iPS 細胞のフィーダーフリー化の検討

マウス iPS 細胞から唾液腺分化誘導プロトコルを行うと、初期の細胞凝集塊の形成効率が、フィーダー細胞無しで維持培養したマウス ES 細胞と比較して低いことが明らかとなっていた。このため、マウス iPS 細胞のフィーダーフリー化およびフィーダー除去の条件の検討を行ったが、効率良い唾液腺への分化誘導方法の確立には至っていない。現在もフィーダーフリー化に取り組むと同時に、SS 様病態の発症前後の NOD マウスより iPS 細胞の樹立を試みしており、樹立した iPS 細胞から効率よく唾液腺オルガノイドを誘導する方法を開発中である。

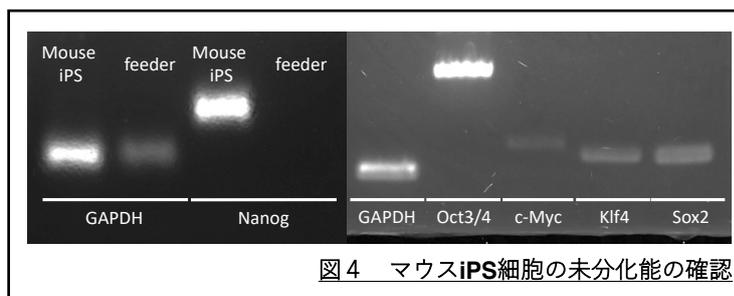


図4 マウスiPS細胞の未分化能の確認

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Takakura Ikuko, Kujiraoka Satoko, Yasuhara Rika, Tanaka Junichi, Ide Fumio, Mishima Kenji	4. 巻 34
2. 論文標題 Assessment of MEF2C as a novel myoepithelial marker using normal salivary gland and pleomorphic adenoma: An immunohistochemical study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 523-530
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2022.01.001	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 Yasuhara Rika, Kang Seya, Iri? Tarou, Mabuchi Yo, Kujiraoka Satoko, Yukimori Akane, Ishida Shoko, Tanaka Junichi, Mishima Kenji	4. 巻 102
2. 論文標題 Role of Snai2 and Notch signaling in salivary gland myoepithelial cell fate	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 1245 ~ 1256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-022-00814-7	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 Tanaka Junichi, Takamatsu Koki, Yukimori Akane, Kujiraoka Satoko, Ishida Shoko, Takakura Ikuko, Yasuhara Rika, Mishima Kenji	4. 巻 63
2. 論文標題 Sox9 function in salivary gland development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 8 ~ 13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2021.01.005	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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鯨岡聡子、田中準一、安原理佳、行森茜、高松弘貴、矢持淑子、勝田秀行、嶋根俊和、瀧本雅文、美島健二
2. 発表標題 診断に苦慮した下顎骨内に発生した紡錘形腫瘍の一例
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鯨岡聡子、田中準一、安原理佳、行森茜、高松弘貴、石田尚子、勝田秀行、嶋根俊和、矢持淑子、美島健二
2. 発表標題 診断に苦慮した下顎骨内に発生した軟骨肉腫の一例
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 行森茜、田中準一、安原理佳、鯨岡聡子、石田尚子、高松弘貴、倉澤侑也、嶋根俊和、美島健二
2. 発表標題 舌小帯部に発生した乳頭状唾液腺腺腫の一例
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中準一、高松弘貴、行森茜、鯨岡聡子、石田尚子、安原理佳、上野博夫、美島健二
2. 発表標題 多細胞系譜追跡法を用いたマウス唾液腺発生における細胞系譜解析
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高松弘貴、田中準一、東浩太郎、堅田凌悟、石田尚子、行森茜、鯨岡聡子、安原理佳、井上聡、美島健二
2. 発表標題 マウス唾液腺老化における成体幹・前駆細胞の解析
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安原理佳、姜世野、鯨岡聡子、行森茜、石田尚子、田中準一、美島健二
2. 発表標題 Snai2は唾液腺筋上皮細胞の上皮間葉性を制御する
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 行森茜、田中準一、北條宏徳、安原理佳、鯨岡聡子、石田尚子、美島健二
2. 発表標題 胎生期マウス顎下腺組織におけるFoxc1による発現制御遺伝子の網羅的解析
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石田尚子、大沼慎太郎、行森茜、鯨岡聡子、安原理佳、勝田秀行、瀧本雅文、矢持淑子、元井亨、美島健二
2. 発表標題 診断に苦慮した下顎骨原発の骨芽細胞腫の一例
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鯨岡聡子、石田尚子、行森茜、大沼慎太郎、安原理佳、倉澤侑也、嶋根俊和、河合繁夫、元井亨、美島健二
2. 発表標題 診断に苦慮した線維骨性病変の一例
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

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