

令和 4 年 4 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18671

研究課題名(和文) マイクロRNAを介したシェーグレン症候群の新規治療開発に向けた基盤研究

研究課題名(英文) Basic research for the development of new treatments for Sjogren's syndrome via micro RNA

研究代表者

緒方 謙一 (Ogata, Kenichi)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30778858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年、培養上清中に含まれるエクソソーム(Exo)が、細胞間コミュニケーションに重要な役割を担うことが報告されている。Exoを投与することで抗炎症作用などの治療効果をもたらすことが期待されている。そこで、ヒト骨髄間葉系幹細胞エクソソーム(BMESC-Exo)およびヒト歯髄幹細胞エクソソーム(DPSC-Exo)をシェーグレン症候群(SS)モデルマウスに投与し、治療効果の比較検討した。結果は、DPSC-Exoを実験動物に投与した群の方がより刺激時唾液分泌量が増加しており、リンパ球浸潤も減少していた。よって、DPSC-Exoの投与が新たなSSの治療法となりうる可能性が示唆された。

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は、中年女性に好発する涙腺・唾液腺を標的とする自己免疫疾患であり、涙液・唾液の減少を引き起こす。現在までシェーグレン症候群に対する根治的治療法がないのが現状である。ヒト歯髄幹細胞は他の幹細胞より豊富に免疫抑制効果のあるエクソソームを含んでいることがわかっている。そのエクソソーム中に抗炎症効果のあるマイクロ(mi)RNAが含まれており、現在までいくつか候補を絞っている。候補のmiRNAが病態抑制効果に関与しているかをさらに検証し、制御している遺伝子やタンパク質を同定することで、創薬研究につなげることができると考えている。

研究成果の概要(英文)：In recent years, it has been reported that exosomes (Exo) contained in conditioned media play an important role in cell-cell communication. It is expected that administration of Exo will bring about therapeutic effects such as anti-inflammatory action. Therefore, human bone marrow mesenchymal stem cell exosomes (BMESC-Exo) and human dental pulp stem cell exosomes (DPSC-Exo) were administered to Sjogren's syndrome (SS) model mice, and the therapeutic effects were compared and examined. The results showed that the group in which DPSC-Exo was administered to the experimental animals had higher salivary flow rate and decreased lymphocyte infiltration around the ductal cells. Therefore, it was suggested that administration of DPSC-Exo may be a new treatment for SS.

研究分野：歯科口腔外科、歯科領域における再生医療

キーワード：エクソソーム 抗炎症作用 マイクロRNA シェーグレン症候群 歯髄幹細胞

1. 研究開始当初の背景

シェーグレン症候群(SS)は自己免疫疾患の一つであるが、ドライマウスやドライアイを主症状とするため、歯科を初診で来院することも多く、さらに2015年より厚労省の「指定難病」に認定され、受診する患者も年々増加している。しかし、自己免疫疾患の根本的治療ははまだ確立されておらず、対症療法としてのステロイドや免疫抑制剤の長期投与による骨粗鬆症や糖尿病などの副作用が問題となっている。SSは、病理組織学的には導管上皮へのリンパ球浸潤を特徴とし、病態進展とともに高 γ グロブリン血症や悪性リンパ腫などの腺外症状が出現することから、リンパ増殖性病変とも称される。申請者は、SSの唾液腺に浸潤するヘルパーT細胞(Th)サブセットに着目し、SSの発症と病態維持にはTh1とTh17が、病態進展にはTh2と濾胞性ヘルパーT(Tfh)細胞が重要であることを見出した(Takahashi H et al., *Clin Exp Immunol* 2017; Tanaka A et al., *Arthritis Rheum* 2012)。

近年、間葉系幹細胞(MSC)の自己免疫疾患に対する有効性が注目されつつある。既にステロイド抵抗性の移植片対宿主病(GVHD)、多発性硬化症(MS)と筋萎縮性側索硬化症(ALS)、Crohn病の瘻孔病変、臓器移植時の免疫反応に対しては早期臨床試験が行われ、幹細胞がこれらの疾患に対し有効であることが証明されている(Perico N et al., *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2011.)た、MSCのもつ生物学的機能と同等の効果を、MSCの培養上清中の構成成分でも示すことが報告されている。MSCの培養上清中にはMSCから分泌される細胞外小胞(エクソソーム)が含まれており、それに内包されているマイクロRNA(miRNA)が標的細胞に運搬されて、免疫機能の制御、炎症反応の抑制さらには組織修復といった様々な生物学的機能をもたらしている(図1参照)。申請者らの過去の研究でも幹細胞の種類により培養上清中に分泌される液性因子(サイトカインやエクソソームを含んでいる)に違いがあり、特にヒト歯髄幹細胞(DPSC)が分泌する液性因子および骨髄由来幹細胞(BMMSC)の液性因子には、免疫抑制能や組織再生能を有する液性因子を多く含んでいることが分かっている。

そこで本研究はDPSCおよびBMMSCからエクソソームを抽出し、リンパ球増殖抑制・活性抑制・分化(Thサブセット分化など)に関わるmiRNAの発現を比較検討する。また、DPSCおよびBMMSC由来のエクソソームおよびそれらから同定したmiRNAをSSモデルマウスに投与することで病態改善が認められるかどうかを評価する。病態改善が認められたならば、エクソソームおよびmiRNAを介したSSの新規治療法開発の足掛かりにする。

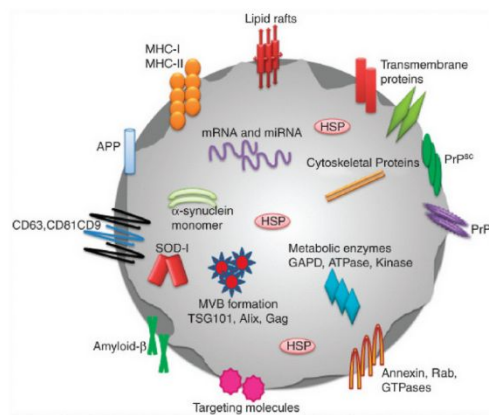


図1. エクソソームの模式図
Yaojiang Tang and Buddhadeb Dawni(2015). *Mesenchymal stem cell derived exosomes*. Academic Press

2. 研究の目的

本研究はエクソソームまたはmiRNAを使用してSSの根治的治療を目指すものである。SSは、自己の免疫細胞が標的臓器を異物とみなして攻撃する(免疫寛容の破綻)ために引き起こされる疾患である。幹細胞由来のエクソソームまたはmiRNAにはその過剰な免疫反応を抑制することに加え、組織再生能もあると考えられ、自己免疫疾患の根治のみならず、障害された臓器の再生にも効果を期待できる。

本研究は申請者が行ってきた従来の研究成果および臨床経験をもとに着想したものであり、現在、SLEやSSなどの自己免疫疾患の治療に歯髄幹細胞の由来のエクソソームおよびそこから同定したmiRNAを応用する研究は報告されていない。そのため、SSへの病態改善効果が認められれば、世界初の研究報告となり、今後本研究分野に対して、わが国がイニシアチブをとることができ、そのインパクトは大きいと予想される。また、幹細胞由来のエクソソームまたはmiRNAは、幹細胞を移植することとは異なり、造腫瘍性の問題や他家細胞を使うことによる倫理的問題がない。よって、早期に臨床応用可能であり、現在対症療法しかない自己免疫疾患であるSSの根治的治療薬として有望である。

3. 研究の方法

(1) ヒト BMMSC およびヒト DPSC からのエクソソームの回収方法について

ヒト BMMSC およびヒト DPSC はロンザ社より購入したものを使用した。細胞培養の方法については、通法通り行った。エクソソームの回収法に関しては、まず細胞が 8 割コンフルエントになった状態で、無血清の細胞培地に交換し、48 時間後に培養上清を回収した。その培養上清を $2,000 \times g$ で 10 分間遠心分離し、細胞片や死細胞を除去した。その後、 $100,000 \times g$ で 70 分間超遠心を行いエクソソームを回収した。

(2) エクソソームの評価について

ウエスタンブロットを用いて各種エクソソームマーカー遺伝子 (CD9、CD81) の発現の確認およびクライオ電子顕微鏡 (Tecnai Polara 300kV 使用) を使用してエクソソームの存在を確認した。また、粒子径は NanoSight システム (NanoSight NS300/英国 Malvern 社) を用いて計測した。

(3) SS モデルマウスへのエクソソームの投与方法と病態改善の評価について

SS モデルマウスは、14 週齢雌の NOD マウス (日本クレア) を使用した。以下の 3 群を設定し、マウスの尾静脈より 1 回投与後、4 週後に評価を行った。

PBS 投与群 (200 μ l)

ヒト BMMSC のエクソソーム (BMMSC-Exo) 投与群 (30 μ g)

ヒト DPSC のエクソソーム (DPSC-Exo) 投与群 (30 μ g)

評価方法として、刺激時唾液分泌量測定 (ピロカルピン塩酸塩を 0.5 mg/kg で腹腔内投与して測定)、抗 SS-A 抗体および抗 SS-B 抗体測定 (Signosis 社製)、顎下腺のヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色、Focus score 測定を行った。

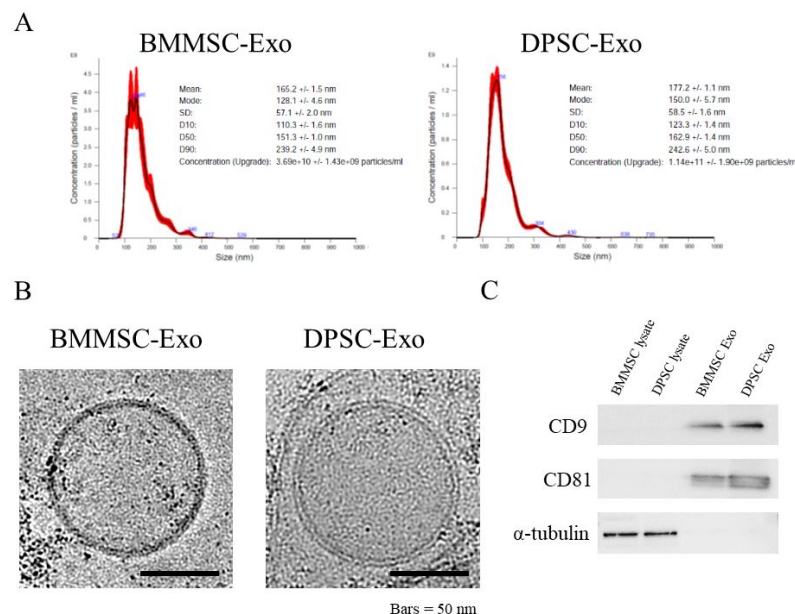
(4) エクソソームのマイクロアレイ解析について

BMMSC-Exo および DPSC-Exo をそれぞれ別 lot を $n = 3$ 使用して、RNAscreenTape システム (Agilent 社) を用いてマイクロ RNA マイクロアレイを行った。そのマイクロアレイデータをもとに、ヒートマップを作成した。

4. 研究成果

(1) BMMSC-Exo および DPSC-Exo について

結果 1 に示すように、BMMSC-Exo および DPSC-Exo は NanoSight システムにおいて、粒子径 50 ~ 150 nm であった。クライオ電子顕微鏡において、二重膜に覆われた円形の構造物を認めており、その表面抗原には、エクソソームマーカーである CD9 および CD81 の発現を認めた。よって、超遠心法において、適切にエクソソームが分離できていることが分かった。

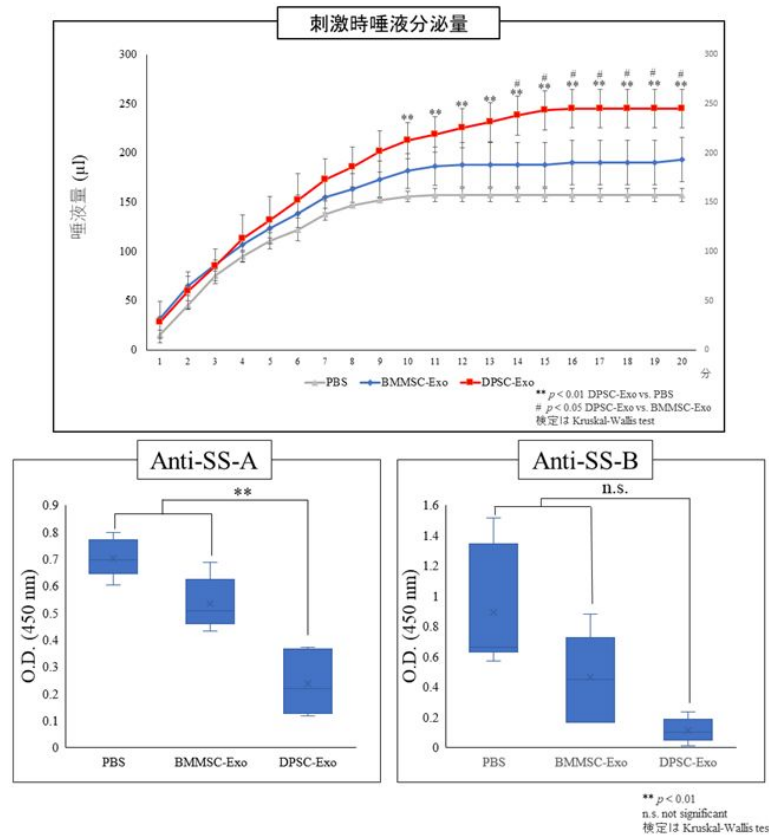


結果 1

A: NanoSight の結果。BMMSC-Exo および DPSC-Exo ともに粒子径 50 ~ 150 nm であった。 **B:** クライオ電顕の結果。両者とも二重膜で覆われた構造物を認めた。 **C:** ウエスタンブロットの結果。両者ともエクソソームマーカーである CD9 および CD81 を発現していた。

(2) SS モデルマウスへのエクソソーム投与における病態改善効果について

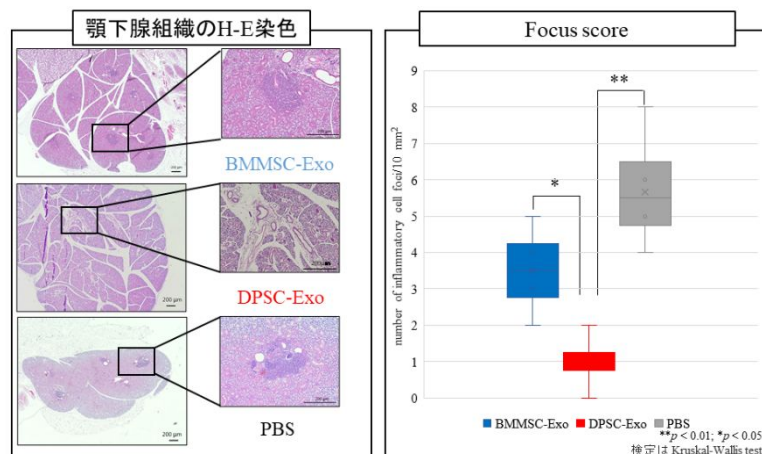
PBS、BMMSC-Exo および DPSC-Exo を NOD マウスの尾静脈に 1 回投与し、4 週間後に評価を行った。結果 2 に示すように、刺激時唾液分泌量は、DPSC-Exo 投与群で有意に増加していることが分かった。また、抗 SS-A 抗体・抗 SS-B 抗体では、DPSC-Exo 投与群において他群と比較して低下していることが分かった。(抗 SS-A 抗体では有意差あり。)



結果 2

刺激時唾液分泌量および抗 SS-A 抗体・抗 SS-B 抗体の結果。DPSC-Exo 投与群では、唾液分泌量が有意に増加しているのと抗 SS-A 抗体・抗 SS-B 抗体が低下していることが分かった。

次に、それぞれの群の顎下腺を摘出し、H-E 染色を行った。DPSC-Exo 投与群では PBS 投与群および BMMSC-Exo 投与群と比較して、導管周囲のリンパ球浸潤が少なかった (結果 3)。それを定量化するために、Focus score を作成した。その結果でも、DPSC-Exo 投与群において、有意に値が小さいことが分かった。以上から、DPSC-Exo の投与によって、SS の病態改善に効果があることが示された。

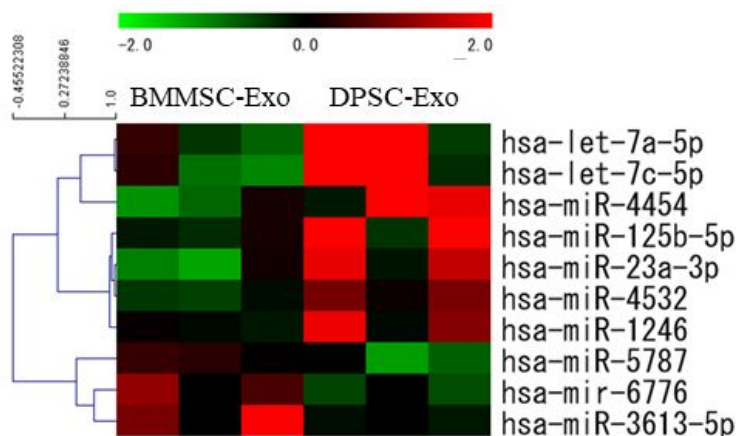


結果 3

顎下腺の H-E 染色において、DPSC-Exo 投与群では他群と比較して導管周囲のリンパ球浸潤が少ないことが分かった(左図)。また、定量化するため Focus score を作成した(右図)、10 mm²あたりのリンパ球浸潤数を数値化している。

(3) BMMSC-Exo および DPSC-Exo のマイクロアレイ解析

上記結果より、SS モデルマウスにおいて BMMSC-Exo および DPSC-Exo では治療効果に差が認められた。そのため、Exo に含まれている miRNA に差がある可能性が考えられたため、マイクロアレイ解析を行った。結果を結果 4 に示す。ヒートマップにおいて、has-let-7a-5p、hsa-let-7c-5p、has-miR-125b-5p や hsa-miR-23a-3p に変化があることが分かった。今後は、同定した miRNA が制御する遺伝子やタンパク質を同定し、SS に対する新規薬剤の開発を目指したい。



結果 4

マイクロアレイの結果をもとに作成したヒートマップ。BMMSC-Exo と DPSC-Exo 間に miRNA の差異を認めた。

<参考文献>

Norberto Perico, Federica Casiraghi, Martino Introna, Eliana Gotti, Marta Todeschini, Regiane Aparecida Cavinato, Chiara Capelli, Alessandro Rambaldi, Paola Cassis, Paola Rizzo, Monica Cortinovia, Maddalena Marasà, Josee Golay, Marina Noris, Giuseppe Remuzzi Autologous mesenchymal stromal cells and kidney transplantation: a pilot study of safety and clinical feasibility. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011 Feb;6(2):412-22.

Akihiko Tanaka, Masafumi Moriyama, Hitoshi Nakashima, Katsuhisa Miyake, Jun-Nosuke Hayashida, Takashi Maehara, Shouichi Shinozaki, Yoshiaki Kubo, Seiji Nakamura Th2 and regulatory immune reactions contribute to IgG4 production and the initiation of Mikulicz disease. *Arthritis Rheum*. 2012 Jan;64(1):254-63.

H Takahashi, H Tsuboi, H Asashima, T Hirota, Y Kondo, M Moriyama, I Matsumoto, S Nakamura, T Sumida cDNA microarray analysis identifies NR4A2 as a novel molecule involved in the pathogenesis of Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol*. 2017 Oct;190(1):96-109.

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 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Suzuki Akiko, Ogata Kenichi, Iwata Junichi	4. 巻 78
2. 論文標題 Cell signaling regulation in salivary gland development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences	6. 最初と最後の頁 3299 ~ 3315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00018-020-03741-2	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 該当する

1. 著者名 Ogata Kenichi, Matsumura-Kawashima Mayu, Moriyama Masafumi, Kawado Tatsuya, Nakamura Seiji	4. 巻 16
2. 論文標題 Dental pulp-derived stem cell-conditioned media attenuates secondary Sjögren's syndrome via suppression of inflammatory cytokines in the submandibular glands	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 73 ~ 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2021.01.006	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 -

1. 著者名 Matsumura-Kawashima Mayu, Ogata Kenichi, Moriyama Masafumi, Murakami Yuka, Kawado Tatsuya, Nakamura Seiji	4. 巻 12
2. 論文標題 Secreted factors from dental pulp stem cells improve Sjögren's syndrome via regulatory T cell-mediated immunosuppression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13287-021-02236-6	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 緒方 謙一、川島 万由、森山 雅文、川戸 達也、中村 誠司
2. 発表標題 ヒト歯髄幹細胞培養上清は制御性T細胞による免疫抑制効果を通してシェーグレン症候群を改善する
3. 学会等名 第42回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenichi Ogata, Mayu Matsumura-kawashima, Masafumi Moriyama, Tatsuya Kawado, Seiji Nakamura
2. 発表標題 SECRETED FACTORS FROM DENTAL PULP STEM CELLS IMPROVE SJOGRENS SYNDROME VIA REGULATORY T CELL-MEDIATED IMMUNOSUPPRESSION
3. 学会等名 2021 ISSCR, JSRM International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川戸 達也、緒方 謙一、森山 雅文、川島 万由、矢野 亜衣子、中村 誠司
2. 発表標題 シェーグレン症候群モデルマウスにおけるヒト歯髄幹細胞エクソソームの効果
3. 学会等名 第76回日本口腔科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川島 万由、緒方 謙一、森山 雅文、川戸 達也、中村 誠司
2. 発表標題 ヒト歯髄幹細胞培養上清を用いたシェーグレン症候群に対する免疫抑制能の検討
3. 学会等名 第30回日本口腔内科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川島 万由、緒方 謙一、森山 雅文、川戸 達也、中村 誠司
2. 発表標題 ヒト歯髄幹細胞培養上清を用いたシェーグレン症候群に対する免疫抑制能の検討
3. 学会等名 第65回日本口腔外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 緒方 謙一、川島 万由、森山 雅文、川戸 達也、中村 誠司
2. 発表標題 ヒト歯髄幹細胞培養上清は制御性T細胞による免疫抑制効果を通してシェーグレン症候群を改善する
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会
4. 発表年 2021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