

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23113

研究課題名(和文) 歯髄幹細胞由来サイトカインを用いたシェーグレン症候群に対する自己免疫反応の制御

研究課題名(英文) Regulation of autoimmune response to Sjogren's syndrome using dental pulp stem cell-derived cytokines

研究代表者

川島 万由 (Kawashima, Mayu)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：90876541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト歯髄幹細胞培養上清(DPSC-CM)には、抗炎症作用や免疫調節作用などを促すサイトカインが含まれており、活性化T細胞の抑制に効果的であった。シェーグレン症候群モデルマウスを用いた実験において、唾液量は、他群と比較して、DPSC-CM群にて増加し、マウスの顎下腺の炎症部位の数は、他群よりも少なかった。インターロイキン(IL)-10とトランスフォーミング成長因子-1の発現レベルはDPSC-CM群で上昇したが、IL-4とIL-17aの発現レベルは抑制された。DPSC-CM投与群は、他の群と比較して、制御性T細胞の割合が大幅に増加し、Th17細胞の割合が大幅に減少した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト歯髄幹細胞培養上清(DPSC-CM)は、顎下腺の唾液分泌機能を促進させる。これは、DPSC-CMが炎症性サイトカインの発現を減少させ、TGF- $\beta$ /Smad経路を介して脾臓に制御性T細胞を誘導後、局所的な炎症性微小環境を調節し、顎下腺のアポトーシスを減少させることによって、シェーグレン症候群による唾液分泌低下を抑制する。DPSC-CMによる活性化T細胞の分化の調節は、この免疫調節機構が関わっている可能性が高い。したがって、この研究は、DPSC-CMの新しい効果を明らかにし、シェーグレン症候群の新規治療となり得ることを示唆している。

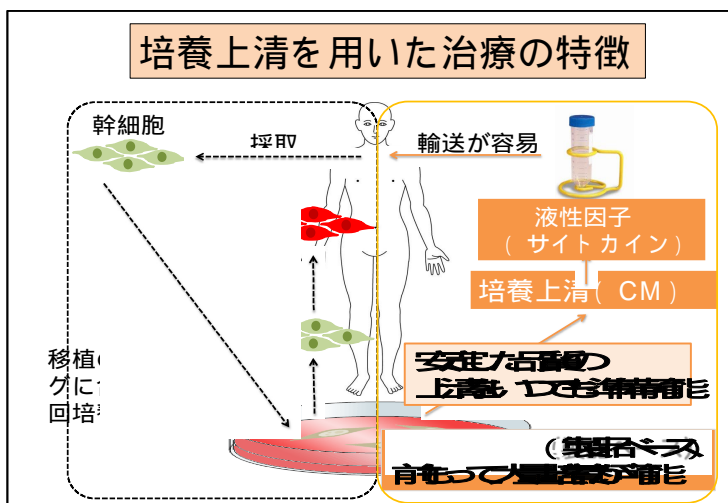
研究成果の概要(英文)：DPSC-CM contained more secreted factors with tissue-regenerating mechanisms, such as cell proliferation, anti-inflammatory effects, and immunomodulatory effects. DPSC-CM was more effective in suppressing the activated T cells than other groups in the flow cytometric analysis. The stimulated salivary flow rate increased in SS mice with DPSC-CM compared with that in the other groups. In addition, the number of inflammation sites in SMGs of the mice administered with DPSC-CM was lower than that in the other groups. The expression levels of interleukin (IL)-10 and transforming growth factor- $\beta$  1 were upregulated in the DPSC-CM group, whereas those of IL-4 and IL-17a were downregulated. The DPSC-CM-administered group presented with a significantly increased percentage of regulatory T (Treg) cells and a significantly decreased percentage of type 17 Th (Th17) cells compared with the other groups.

研究分野：シェーグレン症候群(自己免疫疾患)

キーワード：シェーグレン症候群 サイトカイン 活性化Tリンパ球抑制 IL-10 制御性T細胞 TGF- $\beta$ /Smad経路

### 1. 研究開始当初の背景

近年、幹細胞を使用した組織再生は、細胞自体が分化増殖し組織を再生させるのではなく、幹細胞の分泌因子によるパラクライン効果が主であるといわれている。分泌因子は、培養上清 (CM) 中に多量に含まれていることが分かっている。また、幹細胞の種類により分泌因子にも違いがあることが過去の報告でわかっている。その中でも、ヒト歯髄幹細胞 (DPSC) は、侵襲を伴わず簡便に採取できることと分離培養が可能 (右図) であり、かつ他の幹細胞では分泌されない因子、特に免疫抑制因子を多く含んでいることも分かっている。



### 2. 研究の目的

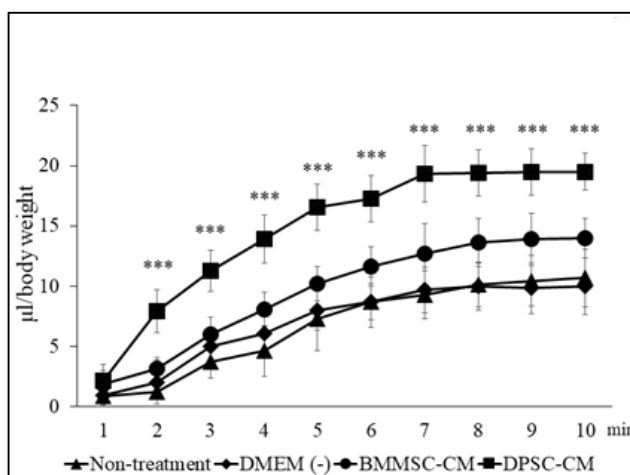
難病指定されており、根本的治療法がまだ確立されていない自己免疫疾患であるシェーグレン症候群 (SS) に対して、DPSC の CM (DPSC-CM) を投与することで、治療効果が期待できないかと考えた。SS は臓器特異的自己免疫疾患であり、免疫担当細胞、特にヘルパー T (Th) 細胞とそのサブセットが放出するサイトカインがその病態に関与しているといわれている。CM は組織再生能だけでなく、免疫抑制作用があるため、SS 動物モデルに投与することで病態改善効果があるかどうか、またそのメカニズムについて検索することを本研究の目的とした。

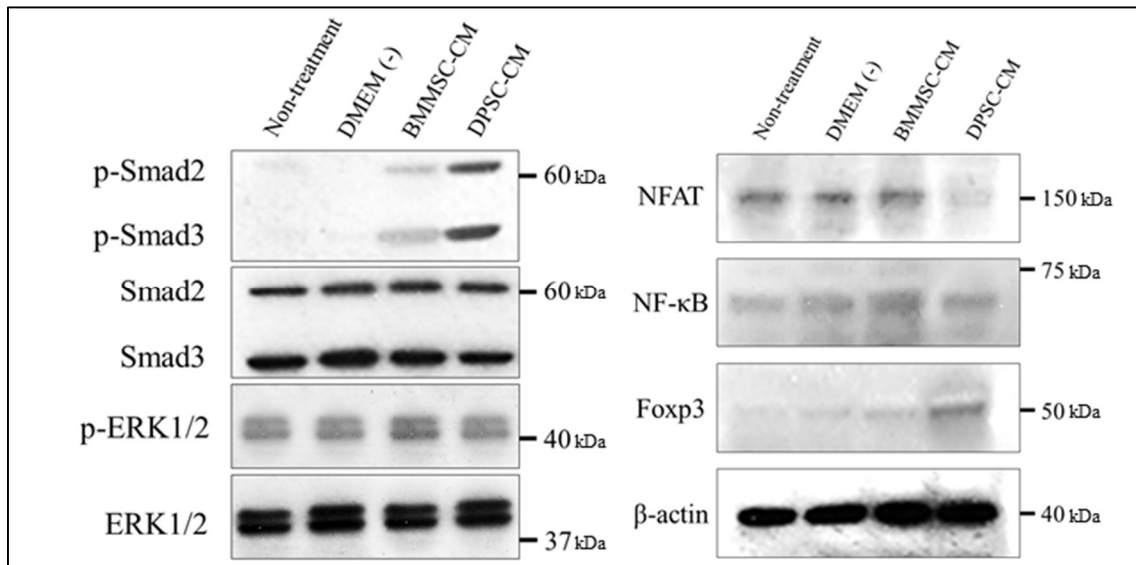
### 3. 研究の方法

DPSC-CM および対象としてヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (BMMSC) の CM (BMMSC-CM) をサイトカインアッセイにて網羅的解析を行った。次に、ヒト末梢血単球細胞に CM を添加し、フローサイトメトリー (FCM) にて FITC-ヘマグルチニンで活性化した CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Th 細胞 (活性化 Th 細胞) への免疫抑制能を解析した。さらに、1 次性 SS を引き起こすとされている Non-obese diabetic マウスを使用し、CM を 1 回 500 μl を静脈内投与 (2 回/週) し、2 週後にマウスの唾液量測定、唾液腺の H&E 染色や唾液腺組織を用いた炎症・抗炎症に関わる遺伝子のリアルタイム polymerase chain reaction (PCR) とタンパク質レベルでの解析を行った。また、脾臓を各 Th サブセットマーカー [Th1 細胞: T-bet、Th2 細胞: GATA3、制御性 T 細胞 (Treg): Foxp3、Th17 細胞: RORγ] で免疫組織化学染色および FCM で評価した。さらに、そのメカニズムを解析するため脾臓における各シグナル経路をウエスタンブロットで評価した。

### 4. 研究成果

DPSC-CM は、BMMSC-CM よりも細胞増殖、抗炎症作用、免疫抑制作用に関与する分泌因子が多く含まれていた。FCM では、DPSC-CM 投与群は、他群と比較して活性化 Th 細胞の割合が有意に低かった。動物実験では、DPSC-CM 投与群は、他群と比較して唾液量は有意に多く (右図)、唾液腺の H&E 染色ではリンパ球浸潤の減少も認められた。リアルタイム PCR においては、DPSC-CM 投与群は、他群と比較して炎症に関わる遺伝子発現の低下、抗炎症に関わる遺伝子の上昇を認めた。さらに、脾臓における Th の浸潤は Foxp3 陽性細胞が著明に多くあり、RORγ 陽性細胞数は他群と比較して少なくなっていることが分かった。また、脾臓におけるウエスタンブロットにおいては、TGF-β/Smad 経路が活性化 (下図) していることが分かった。





これらの結果から、DPSC-CMがTGF- $\beta$ /Smad経路を介して脾臓におけるTreg細胞の分化を促進すること、一方でTh17細胞の分化を阻害することによってSSが改善した。今後、DPSC-CMがSSの新規治療法になりうる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsumura-Kawashima et al.	4. 巻 2021
2. 論文標題 Secreted factors from dental pulp stem cells improve sjogre'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 12:182
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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川島万由
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 口腔内科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川島万由
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 口腔外科学会
4. 発表年 2020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
---------	---------