

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670864

研究課題名(和文)濃縮幹細胞と機能性microRNAのデリバリーによる唾液腺再生促進システムの開発

研究課題名(英文)Delivery of bone-marrow stem cells and functional microRNA for atrophic salivary gland regeneration

研究代表者

住田 吉慶 (SUMITA, Yoshinori)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授

研究者番号：50456654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨髄由来の血管内皮前駆細胞群(CD34陽性細胞群)と導管部幹細胞の増殖や腺房細胞分化に関わるmiRNAを生体内にデリバリーすることで、放射線性萎縮唾液腺に対する効果的な細胞治療法を開発することを企図した。実験は、まずCD34陽性細胞群のマウス唾液腺萎縮モデルへの投与効果の検討から開始したが、投与群において移植後4, 8, 12週のいずれの時期においても唾液分泌量の回復を認め、組織学的に血管新生の亢進と導管部幹細胞の活性化が認められた。現在、唾液腺上皮細胞の増殖分化に関わるmiRNAの併用投与の効果について、検討を行っているところである。

研究成果の概要(英文)：The specific hypothesis of this study is that bone marrow-derived endothelial progenitor cells (CD34-positive cells) can rescue the radiogenic salivary-gland atrophy. Furthermore, we assumed that the delivery of functional miRNA that contributes the proliferation or differentiation of salivary-gland epithelial cells may be able to enhance the effect of CD34-positive cell therapy. As a result, local administration of CD34-positive cells to submandibular glands could increase the salivary output of mice after 12Gy of head and neck irradiation. Currently, we are analyzing in vivo behavior of exogenous CD34-positive cells in detail, and administrating miRNAs with CD34-positive cells to irradiated mice.

研究分野：口腔外科学・再生医学

キーワード：萎縮唾液腺 細胞治療 microRNA

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌の化学放射線療法(CRT)による唾液腺萎縮症に対する細胞治療の開発; 頭頸部癌の CRT に併発する骨髄抑制や重度口内炎、唾液腺萎縮、晩期顎骨壊死の障害は、治療遂行の障害となると同時に、術後 QOL を著しく低下させる。特に不可逆性の疾患である唾液腺萎縮症は、口腔乾燥のみでなく、唾液量の減少に伴う口腔粘膜炎の憎悪や多発重度齲蝕を惹起し、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。そのため、頭頸部癌の CRT には、それに併発する疾患の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。

このような CRT に併発する疾患に対して、われわれは、放射線性唾液腺萎縮症に対する細胞治療法の実現に取り組んできた。一方近年、骨髄に由来する EPCs が末梢血中の単核球成分の一部として存在することが示されて以降(Asahara T et al.1997)、骨髄由来細胞(BMDCs)を用いた細胞治療の有効性が、血管、心筋、肝臓、骨組織等の再生や脳梗塞治療などで示唆されている。

その中で、われわれは、唾液腺萎縮モデルマウスへの BMDCs の静脈内投与が、腺房細胞の再生と唾液分泌量の回復を誘導していること(Sumita Y et al. 2011)を見出している。

さらに、BMDCs 投与による効果発現のメカニズムの一端として、投与された細胞群の障害組織における血管新生への寄与を明らかにしている。そして、最近では BMDCs に含まれる間葉系幹細胞群(MSCs)による唾液腺萎縮症の治療効果も報告されており、BMDCs を構成する細胞群に一定の投与効果が期待されるようになってきている。しかしながら、BMDCs や MSCs による細胞治療については、移植に必要な十分な MSCs の確保に長期培養が必要であり、時間や費用を含めて多大な労力が必要となること、これらの細胞の投与により一定の治療効果は期待できるものの、現在のところ、その効果は未だ十分とは言えない等の解決すべき問題点が存在する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、濃縮骨髄幹細胞と micro(mi)RNA を生体内にデリバリーすることで、放射線性萎縮唾液腺に対する効果的な細胞治療法を開発することにある。具体的には、萎縮腺組織に残存する導管部幹細胞の増殖や、その腺房細胞分化に関わる miRNA を全身、あるいは局所へ補助的にデリバリーすることで、濃縮骨髄幹細胞のパラクリン効果による腺組織の再生効果を増幅させることを企図する。われわれは、静脈内投与した骨髄細胞(BMDC)の局所への遊走・着生能や分化能に注目し、それを用いた萎縮唾液腺に対する細胞治療法の実現に取り組んでおり、現在までに動物実験レベルで、その有効性を確認している。本研究は新たに、この基盤技

術に核酸医薬デリバリー技術を応用することで、より効果の高い放射線性唾液腺萎縮症の細胞治療法の実現を目指す。具体的には、BMDCs の細胞治療において、われわれは移植細胞のパラクリン効果、そして血管新生の効果を報告している。そのため、今回われわれは組織再生の起点となる血管形成の効果を持つ骨髄由来の血管内皮前駆細胞群(CD34 陽性細胞群)に着目し、それと miRNA を用いた生体内デリバリー技術による萎縮唾液腺の治療法の実現を試みた。

3. 研究の方法

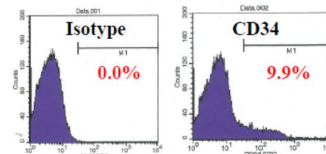
唾液腺萎縮モデルとして、C57BL/6 マウスを使用した。放射線照射(12Gy γ -ray)により唾液腺萎縮症を惹起させ、照射直後に顎下腺に細胞移植(CD34 陽性細胞)の局所投与を行った。その後、照射 4、8、12 週目に唾液量の測定、顎下腺の採取を行い、組織学的・免疫組織化学的に解析を行った。実験モデル群として、放射線照射されておらず、細胞移植もされていない control 群、放射線照射のみの IR 群、放射線照射直後に CD34 陽性細胞群を唾液腺に局所投与された CD34 群を設定した。

4. 研究成果

1) 放射線性唾液腺萎縮モデルマウスの作製
C57BL/6 マウスに対して、ケタミンを用いて鎮静させた上で、マウスの顎下腺を含んだ頭頸部のみに照射域が設定されるような鉛製の遮蔽装置と γ 線照射装置を用いて唾液腺萎縮を惹起させた。照射量は 12Gy で設定した。

2) CD34 陽性細胞の分離

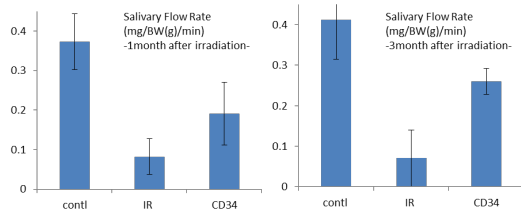
C57BL/6 マウスの大腿骨、腓骨よりフラッシュアウトにより骨髄細胞を抽出し、遠心操作と塩化カルシウムにより溶血させた単核球成分を抽出した。抽出したマウス単核球成分には約 10% 程度の CD34 陽性細胞が含まれていることを確認した。



移植には、マウスの大腿骨、腓骨より抽出し、遠心操作、溶血させて抽出した単核球成分より、CD34 陽性細胞群を磁気細胞分離法(MACS)で分離したものを使用した。

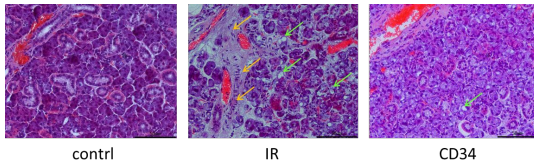
3) 唾液流出率の測定

放射線照射より 4、8、12 週で唾液流出量を測定し、その流出率を比較した。いずれの時期においても CD34 陽性細胞(5×10^5 個)を投与した群では、control 群と比較して唾液流出率の低下が認められるものの、障害モデル群と比較して有意な唾液流出量の増加が認められた。



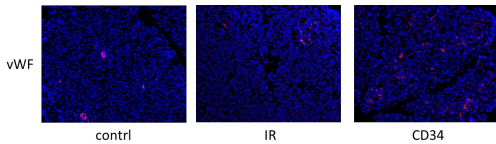
4) ヘマトキシリン・エオジン(HE染色)による組織の比較評価

IR群では唾液腺組織内に細胞の空胞変性(緑矢印)や溶解・線維化(黄色矢印)が顕著であった。CD34群ではIR群と比較して、それらの障害は軽度であった。



5) 免疫組織学的評価

唾液腺組織における幹細胞マーカーであるc-Kit, Sca-1や、血管新生の指標となるvWFの陽性細胞数は、IR群と比較してCD34群の方が多く認められた。特にvWF陽性細胞の比較においては、control群よりCD34群の方が多く、傾向が顕著であった。



現在、CD34陽性細胞群とMSCやBMDCとの細胞治療効果を比較検討し、より効果が期待でき、現実的な臨床応用を想定した治療細胞群の評価を行っている。また、miRNAの投与については、唾液腺の形態形成、あるいは上皮幹細胞の遊走に関連のある既知のmiRNAであるmiR200cやmiR21, miR126, miR205などを候補因子として扱い、マウスモデルへのCD34陽性細胞群投与時における併用投与の効果について評価を行なっているところである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計7件)

1. Kawasaki T, Sumita Y, Egashira K, Ohaba S, Kagami H, Tran SD, Asahina I. 2015. Transient exposure to hypoxic and anoxic oxygen concentrations promotes either osteogenic or ligamentogenic characteristics of periodontal ligament-derived cells. *Biores Open Access. in press.* 査読有
2. Umebayashi M, Sumita Y, Kawai Y, Watanabe S, Asahina I. 2015. Gene activated-matrix with atelocollagen/tricalcium-phosphate and plasmid DNA encoding BMP4 or Runx2 promotes rat

calvarial bone augmentation. *Biores Open Access. in press.* 査読有

3. I T, Sumita Y, Minamizato T, Umebayashi M, Liu Y, Tran SD, Asahina I. 2014. Bone marrow-derived cell therapy for oral mucosal repair after irradiation. *J Dent Res.*, vol.93(8): 813-820. 査読有
4. Yoshida K, Sumita Y, Marukawa E, Harashima M, Asahina I. 2013. Effect of platelet-rich plasma on the bone engineering with the alloplastic substitute containing BMP2. *Biomed Mater Eng.*, vol.23(3): 163-72. 査読有
5. Xia D, Sumita Y, Liu Y, Tai Y, Wang J, Uehara M, Agata H, Kagami H, Fan Z, Asahina I, Wang S, Tran SD. 2013. GDFs promote tenogenic characteristics on human periodontal ligament-derived cells in culture at late passages. *Growth Factors.*, vol.31(5): 165-73. 査読有
6. Sumita Y, Asahina I, Tran SD, Kagami H. 2014. Potential cell-based therapy for irreversibly damaged salivary glands and atrophic bone. *New Trends in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. INTECH.* 81-94. 査読有
7. 住田吉慶, 朝比奈泉. 2013. 歯・歯槽骨(歯槽骨の再生医療/歯の再生医療) 第2節; 臓器・器官ごとの再生医療研究の動向、再生医療における臨床研究と製品開発~医工連携に向けた「自社技術」と「再生医療」の接点を探る~. 情報技術協会. 79-87. 査読無

〔学会発表〕(計5件)

1. 梅林真由美, 住田吉慶, 河井洋祐, 朝比奈泉: 遺伝子活性化基質(GAM)を用いた骨再生促進システムの開発, 第59回日本口腔外科学会総会・学術大会, 幕張メッセ(千葉), 2014年10月17日~19日.
2. 中谷佑哉, 住田吉慶, 南里篤太郎, 河井洋祐, 井隆司, 古賀喬充, 江頭寿洋, 朝比奈泉: Platelet Rich Plasma(PRP)のフリーズドライ保存における有用性の検討, 第59回日本口腔外科学会総会・学術大会, 幕張メッセ(千葉), 2014年10月17日~19日.
3. 井隆司, 住田吉慶, 南里篤太郎, 渡辺大智, 朝比奈泉: 放射線性の口腔内障害に対する骨髄由来幹細胞治療応用の検討, 第68回日本口腔科学会学術集会, 京王プラザホテル(東京), 2014年5月8日~9日.
4. 古賀喬充, 南里篤太郎, 井隆司, 住田吉慶, 朝比奈泉: 脱灰象牙質を用いた歯槽骨再生の臨床, 第58回日本口腔外科学会総会・学術大会, 福岡国際会議場(福岡), 2013年10月11日~13日.
5. 三浦桂一郎, 住田吉慶, 梅林真由美, 中谷佑哉, 長井一浩, Weijian Zhong, 朝比

奈泉：骨髄濃縮液によるBMP-2との相乗効果の検討, 第67回NPO法人日本口腔科学会学術集会, 栃木県総合文化センター(栃木), 2013年5月22日~24日.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

住田 吉慶 (SUMITA, Yoshinori)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
准教授
研究者番号：50456654

(2) 研究分担者

朝比奈 泉 (ASAHINA, Izumi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
教授
研究者番号：30221039

各務 秀明 (KAGAMI, Hideaki)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：80242866

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：