

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893199

研究課題名(和文)血管内皮前駆細胞を主体とした末梢血濃縮細胞群による萎縮唾液腺再生療法の開発

研究課題名(英文) Vasculogenic conditioned peripheral blood mononuclear cells rescue the radiation-induced salivary gland hypofunction

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) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：新規培養法によって末梢血単核球成分から得た濃縮細胞群(QQ-EPCs)の放射線性萎縮唾液腺に対する投与効果について検討した。マウスの動物実験において、QQ-EPCsを放射線性萎縮唾液腺に局所投与した。培養によりM2マクロファージとEPCの含まれる割合が著明に増加した。移植後は、組織内血管周囲へ移植細胞の集積を認め、4週後には炎症性マーカーの低下や幹細胞マーカー陽性の唾液腺上皮細胞の増加を認めた。さらに、障害組織の血管新生を認め、唾液量は照射4週後に著明に回復した。これらより、放射線性唾液腺萎縮症において、QQ-EPCsの投与は血管新生と抗炎症作用による有効な治療手段となり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have tried to develop the cell therapy with the peripheral blood-derived mononuclear cells (PBMNCs), purified by recently improved quality and quantity (QQ) culture system of EPCs. In vivo, QQ-PBMNCs were transplanted to SG of the mice directly after irradiation. In vitro, we revealed that QQ-PBMNCs contained angiogenesis and anti-inflammatory cell population abundantly. In vivo, SGs of treated mice were observed decreased area of damaged acinar cells and fibrosis. Donor cells were detected mainly around the blood vessels in SGs, and QQ-PBMNCs-treated SGs showed more expression of proliferating cell nuclear antigen and stem cell markers. Otherwise, inflammatory gene expression were downregulated. Remarkably, SGs of treated mice showed the increased level of blood vessel formation gradually. Our data suggests that cell therapy with QQ-PBMNCs can prevent the radiation-induced SG hypofunction by their abilities of vascular regeneration and anti-inflammation.

研究分野：再生医学

キーワード：唾液腺

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 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齶蝕を惹起し、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、われわれのグループでは、放射線性唾液腺萎縮症に対する細胞治療法の開発に取り組んできた。近年、骨髄に由来する血管内皮前駆細胞(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)や、放射線性口腔粘膜炎モデルマウスにおいて、BMDCs 投与による潰瘍形成の予防効果を見出している(I T et al. 2014)。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、①細胞の採取に侵襲が大きいこと、②移植に必要十分な 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、③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こと等の問題点が存在し、これらは将来の細胞治療の確立に向けて克服すべき問題点と言える。

### (2) 新規 EPC 濃縮法の開発；

EPCs は血液中に存在する骨髄由来の幹細胞で、創傷治癒や虚血性疾患の血管形成に寄与することが知られており、近年 EPCs を応用した細胞治療の有効性が示唆されている。実際に冠動脈疾患や下肢虚血疾患(パーヴァー病や閉塞性動脈硬化など)を含む重症虚血性疾患患者に対して、磁気細胞分離法により自己末梢血 CD34 陽性細胞を分離し、虚血部位に移植するという血管再生療法の臨床試験

が既に開始され、良好な成績が報告されている。しかしながら、末梢血 CD34 陽性細胞の臨床応用には、この細胞群の増殖能や分化能に個人差が大きいこと、細胞投与に必要な EPCs を確保するために多量の末梢血が必要となること等の解決すべき課題が存在する。そこで、本研究の共同研究者である東海大学の浅原孝之教授らは、末梢血から抽出した単核球成分を、VEGF や SCF など数種類の因子から成る血管内皮誘導培地を使用した培養にて、5 日間という短期間で血管形成に特化した EPCs を抽出・増幅させる新規 EPC 濃縮技術(Quality and Quantify culture)を開発した。この濃縮技術は、比重遠心法にて抽出される単核球成分のみを使用するため、CD34 陽性細胞のように磁気細胞分離法(MACS)による煩雑な単離技術を必要とせず、少量の末梢血(10~20ml 程度)から短期培養のみで効率的に EPCs を増幅させることが可能である。さらに、末梢血単核球成分というヘテロな細胞群を培養することで、EPCs 以外に抗炎症作用を発揮する CD206 陽性マクロファージ(M2M $\phi$ )や、制御性 T 細胞(T-reg)などの細胞群も濃縮されることが明らかになっている。つまり、この濃縮末梢血 EPC 細胞群の投与は、血管新生促進に加えて、障害組織における抗炎症作用の効果をも期待できる。この細胞群の治療効果については、それを局所投与した下肢虚血モデルマウスにおいて、血流が回復されることを実際に確認している。以上の知見から、組織再生の起点となる血管新生と抗炎症作用を発揮すると考えられる濃縮末梢血 EPC 細胞群を応用した細胞治療は、CRT による唾液腺萎縮症において、簡便、且つ効果的で実現性の高い治療法に成り得ると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、頭頸部癌の化学放射線療法(CRT)に併発する唾液腺萎縮症を対象に、末梢血から効率的に抽出・濃縮した血管内皮前駆細胞(EPCs)と抗炎症性細胞による細胞治療を展開することで、萎縮腺組織の再生を図る治療技術を開発することである。本研究の新規性は、萎縮唾液腺に対する細胞治療の開発において、その細胞源をこれまでに報告されている骨髄や脂肪といった組織でなく、採取が容易で侵襲の少ない末梢血に求めること、そして、その末梢血から EPCs を主体とした細胞群を効率的に採取するために開発された新規 EPC 濃縮法を応用することの 2 点にある。この新規 EPC 濃縮法は、末梢血から抽出された単核球成分から効率的に EPCs を抽出・増幅できるばかりか、制御性 T 細胞など抗炎症作用を発揮する細胞群をも同時に濃縮することが可能である。そのため、この方法により濃縮された細胞群は、CRT による萎縮腺組織の慢性炎症と血管新生障害に対して効果的に治癒を促進させる

と考えられた。

### 3. 研究の方法

(1) CRT に併発する唾液腺萎縮モデルの作出； C57BL/6 マウスの顎下腺領域まで含んだ頭頸部のみ放射線照射を与えることのできる器具を用いて、16Gy (gamma-ray) の線量を照射することで、照射後約 4 週で通常量の約 50%以下の唾液分泌量低下を導く障害を唾液腺に与えることができる。本実験では、その後、照射後 4、8、12 週にてマウスの体重計測と唾液分泌量の計測、顎下腺の摘出を行い、組織の評価を行なった。

(2) 濃縮末梢血 EPC 細胞群の抽出・増幅と尾静脈内投与； 本実験では、移植細胞の生体内挙動解析のため、雄 8 週齢 C57BL/6 マウスから単離した細胞を、雌の同齢 C57BL/6 マウスへ移植する。細胞の単離は、血液凝固処理をした注射筒を用いてマウス心臓より採血を行う。次いで数回の遠心操作を行い、単核球成分を多く含む Buffy coat を採取する。Buffy coat には少量の赤血球も含まれるため塩化アンモニウムを加え溶血させる。その後、単核球成分を EPCs に誘導するサイトカイン添加培地による Quality and Quantity (QQ) 処理という培養を 5 日間行う。細胞の投与は、約  $10^5$  個の濃縮末梢血 EPC 細胞群を  $200 \mu\text{l}$  の IMDM 培地に濃縮し、1 匹のマウスへの 1 回投与に用いる。投与は放射線照射後に顎下腺に直接投与した。

(3) 細胞群投与後の組織回復の評価；

a. 唾液分泌量の計測 (salivary flow rate)：細胞群投与による唾液腺機能の回復の指標として、屠殺前、照射後 4、8、12 週のマウスから唾液を採取して、その分泌量を計測した。

b. 組織学的観察：顎下腺を照射後 4、8、12 週で採取し、顎下腺を組織学的に観察した。それぞれの細胞投与群と非投与群において、障害の程度や血管の分布状態について比較した。また PAS 染色を用いて腺房細胞の組織回復の評価を行った。

(4) 移植試料における投与細胞群の動態解析；

a. 免疫組織学的評価とドナー由来細胞の検出：顎下腺について、障害組織中に存在するドナー由来細胞を検出し、動態を解析する。ドナー由来細胞を PKH26 でマーキングし、これにより、移植細胞の障害組織での生着、および血管新生や分化転換などの挙動解析を行った。

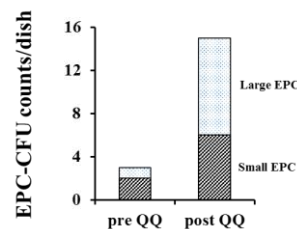
b. 各細胞群による抗炎症作用の評価：濃縮末梢血 EPC 細胞群の投与により、障害組織において抗炎症作用も認められることが予想されるため、組織中のサイトカイン量を測定し、その評価を行った。具体的には、各評価

時期に採取された唾液腺組織に含まれる炎症に関わるサイトカイン量 (IL-1、TGF- $\beta$  等) を網羅的に検量しうる MILLIPLEX (Merck Millipore 社) で測定し、評価した。同時に免疫細胞 (マクロファージ、T リンパ球等) の細胞数を FACS にて解析を行なう。

### 4. 研究成果

(1) 濃縮末梢血 EPC 細胞群の抽出・増幅； EPC には、主に細胞増殖に寄与する small EPC と血管形成に寄与する large EPC が存在するが、Colony forming assay より、QQ 培養された細胞群 (QQ-MNCs) は、colony 形成能が高く、血管形成に主に寄与する large EPC の割合が増大していることが示された【図 1】。

【図 1】



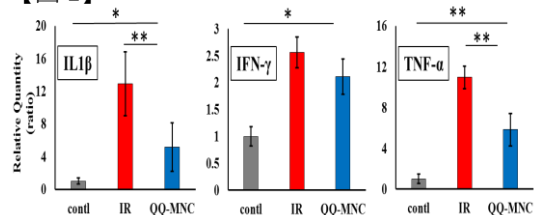
また、末梢血単核球成分 (MNCs) と比較して、QQ-MNCs では M2 マクロファージと血管内皮前駆細胞の含まれる割合が著明に増加することが FACS の解析で示された。

このことから培養された QQ-MNCs は血管新生能と抗炎症効果を併せ持つ細胞群であることが示された。

(2) 細胞群投与後の組織回復の評価と治療効果のメカニズムの解析；

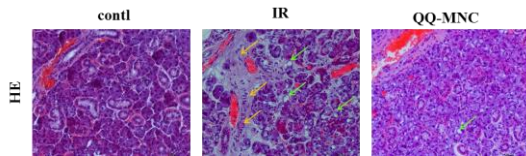
移植後は、照射 2 週後で組織内血管周囲へ移植細胞の集積を認め、照射 4 週後には炎症性マーカーの低下【図 2】や幹細胞マーカー (c-Kit, Sca-1) 陽性の唾液腺上皮細胞の増加や細胞増殖活性 (PCNA) の増加を認めた。

【図 2】



また、RT-PCR で唾液腺組織における mRNA の発現を比較したところ、移植群では VEGF-B、C の上昇、そのレセプターである VEGFR-1、3、neuropillin-1、2 の上昇を認めた。これは移植された唾液腺組織内で血管新生が促進されていることを示唆している。次に唾液腺組織の免疫染色により、照射後 12 週までに障害組織の著明な血管新生 (CD31) を認めた。さらに唾液腺組織における組織の線維化 (Masson trichrome stain) や腺房細胞 (PAS) の障害の軽減化が認められた【図 3】。

【図 3】



唾液量は照射 4 週後に分泌量の低下を認めたものの、その後 8 週後、12 週後と著明に回復した。

これらより、患者負担の少ない末梢血を細胞源とし、細胞確保の利便性に優れた QQ-EPCs の投与は、放射線性唾液腺萎縮症に対して、血管新生と抗炎症作用による有効な治療手段となり得ることが示唆された。

現在、上記内容をまとめ、論文投稿中である。

#### 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 1 件)

Bone Marrow-Derived Cell Therapy for Oral Mucosal Repair After Irradiation.

Takashi I, Yoshinori Sumita, Tokutaro Minamizato, Mayumi Umebayashi, Younan Liu, Simon D Tran, Izumi Asahina.

Journal of Dental Research,

査読有 93(8):813-820, 2014

〔学会発表〕 (計 4 件)

- ① 井隆司、住田吉慶、増田治史、浅原孝之、朝比奈泉

血管内皮前駆細胞を主体とした末梢血濃縮細胞群による萎縮唾液腺再生療法の開発

日本再生医療学会総会

横浜(パシフィコ横浜)

2015. 3. 19-21

- ② Takashi I, Yoshinori Sumita, Haruchika Masuda, Simon Tran, Takayuki Asahara, Izumi Asahina

Vasculogenic Conditioned Peripheral Blood Mononuclear Cells Rescue the Radiation-Induced Salivary Gland Hypofunction

ISSCR(国際幹細胞学会)

スウェーデン(ストックホルム)

2015. 6. 24-27

- ③ 井隆司、住田吉慶、朝比奈泉

血管内皮前駆細胞を主体とした末梢血濃縮細胞群による萎縮唾液腺再生療法の開発

日本口腔外科学会総会

名古屋(名古屋国際会議場)

2015. 10. 16-18

- ④ 井隆司、住田吉慶、増田治史、浅原孝之、朝比奈泉

血管内皮前駆細胞を主体とした末梢血濃縮細胞群による萎縮唾液腺再生療法の開発

日本再生医療学会総会

大阪(大阪国際会議場)

2016. 3. 17-19

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特記事項なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

井 隆司 (I, Takashi)

長崎大学・医歯薬総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号: 30733448