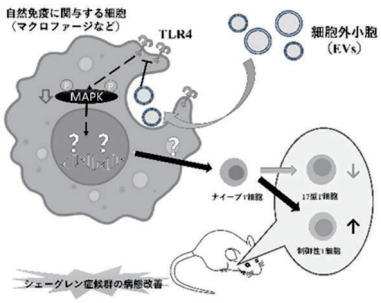
161　iPS 細胞のエクソソームを用いた自己免疫疾患への応用	緒方　謙一

【目的】シェーグレン症候群（SS）は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い。SS の病因・病態についてはいまだ不明な点が多く、治療も対症療法に終始せざるを得ないのが現状である。我々の過去の研究から肝細胞増殖因子（HGF）やトランスフォーミング因子-β1（TGF-β1）が多く含まれている歯髄幹細胞からのエクソソーム（EVs）が SS の病態改善に寄与していることを突き止めた。しかし、歯髄幹細胞（DPSCs）の状態によってはその効果がでないこともしばしばある。そこで、本研究では、HGF や TGF-β1 を多く産生している DPSCs を iPS 細胞化し、それから安定した EVs が取り出せないかと考えて本研究に至った。iPS 細胞化させた後、それらを SS モデルマウスに投与し、治療効果があることの確認とそのメカニズムの解明を行うことを本研究の目的とする。

【方法】まず、*in vitro* において別ロットのヒト歯髄幹細胞から山中らの方法を使って iPS 細胞の作製を行った。樹立した iPS 細胞の特性を調べるために、未分化マーカーである Oct3/4 および SSEA-4 で蛍光免疫組織学的染色を行った。その後、それら細胞の培養上清を採取し、そこに含まれている HGF や TGF-β1 の濃度を ELISA を用いて調べた。HGF や TGF-β1 の濃度が高い iPS 細胞と HGF や TGF-β1 の濃度が低い iPS 細胞からそれぞれ超遠心法を使って EVs を回収した。回収した EVs の表面抗原をウエスタンブロット法を使って確認し、形態をクライオ透過型電子顕微鏡（Cryo-TEM）を使って確認した。また、それぞれの EVs に含まれているマイクロ RNA を網羅的に調べるためにマイクロ RNA アレイを行った。次に *in vivo* において、SS モデルマウスの尾静脈から EVs を 300 μg/ml で 1 回（100 μl の PBS に懸濁）投与した。4 週後に唾液腺・脾臓における H-E 染色、qPCR、ウエスタンブロットを使って評価した。

【結果】樹立した 3 種類の iPS 細胞は、それぞれ未分化性を保持していた。それらの培養上清の HGF や TGF-β1 の濃度を ELISA で調べたところ、濃度に違いがあった。そこで、HGF や TGF-β1 の濃度が高い iPS 細胞およびそれらが低い iPS 細胞からそれぞれ、EVs を採取しその特性や形状を調べた。表面抗原は、ウエスタンブロットから CD9、CD81 を有しており、Cryo-TEM から大きさは約 200 nm 前後で、二重膜に包まれた構造をしていることが分かった。それらを SS モデルマウスに投与したところ、HGF や TGF-β1 の濃度が高い iPS 細胞からの EVs 投与群において、唾液腺組織における炎症性細胞浸潤が有意に減少し、唾液量の増加、抗 SS-A 抗体・抗 SS-B 抗体の低下を認めた。それらの EVs の差異をマイクロ RNA アレイで網羅的に検索したところ、HGF や TGF-β1 の濃度が高い iPS 細胞からの EVs には let-7 family がより多く含まれていることが分かった。そこで、相互連関すると言われている Toll-like receptor（TLR）の発現を qPCR で調べると、TLR4 の発現低下を認めた。その下流のシグナル経路である MAPK に着目し、マウスマクロファージの培養上清のサイトカイン濃度やマウス脾臓組織のウエスタンブロットを行うと、EVs 投与群において、抗炎症サイトカイン濃度が高くなっており、ウエスタンブロットでは TLR4 および p-MAPK の発現低下を認めた。よって、EVs 中の let-7 family が TLR4 の発現を抑制し、その結果として MAPK を介した炎症性サイトカイン産生抑制に関与している可能性が示唆された。

本実験のアブストラクト



161. iPS 細胞のエクソソームを用いた自己免疫疾患への応用

緒方　謙一

九州大学病院 顎口腔外科

Key words：iPS 細胞，エクソソーム，シェーグレン症候群

緒　言

シェーグレン症候群（SS）は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い。SS の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、リンパ増殖性病変とも称されるが、病因・病態についてはいまだ不明な点が多く、治療も対症療法しかないのが現状である。

近年、間葉系幹細胞からエクソソーム（EVs）が放出され、それが標的細胞に運搬されることで、炎症反応の抑制、免疫機能の制御といった様々な生物学的機能を持ち、それが治療効果をもたらすことが期待されている。特に、EVs 中にはマイクロ RNA（miRNA）と呼ばれるノンコーディング RNA が含まれており、その機能にも注目が集まっている［1］。

我々の過去の研究からヒト歯髄幹細胞の培養上清（CM）には骨髄由来幹細胞の CM より組織再生や免疫抑制に関わる液性因子、特に肝細胞増殖因子（HGF）やトランスフォーミング因子-β1（TGF-β1）が多く含まれていること、それが直接・間接的に T 細胞に作用し制御性 T 細胞の分化誘導につながること、一方で 17 型ヘルパーT 細胞の分化が抑制されることで、病態が改善することをつきとめた［2］。しかし、細胞の状態によってそれら因子が少ないものもあるため、一定の品質を担保することが難しいことが問題点として挙げられる。

そこで、安定した品質を担保するため歯髄幹細胞を iPS 細胞化し、それから安定した EVs が取り出せないかと考えて本研究に至った。iPS 細胞化させた後、それらを SS モデルマウスに投与し、治療効果があることの確認とそのメカニズムの解明を行うことを本研究の目的とする。

方　法

1. iPS 細胞作製

iPS 細胞作製については、山中らの報告に準じて行った［3］。簡単に記載すると、ロンザ社より購入したヒト歯髄幹細胞（DPSCs）をメーカー指定の専用培地（DPSC SingleQuots®含有 DPSCs basal medium）で 80%コンフルエントになるまで培養した。細胞を回収した後、プラスミド DNA（Oct3／4、Sox2、Klf4、c-Myc および DsRed）（OPTI-MEM™I、Invitrogen 社）を作用させたのち、PLAT-E 細胞に滴下し培養した。培養 11 目から puromycin 選択を開始し、歯髄幹細胞由来の iPS 細胞を 3 種類樹立した（iPS 1、iPS 2、iPS 3 と定義）。また、未分化性の確認については、Oct3／4 および SSEA-4 による蛍光免疫組織学的染色を行った。

2. iPS 細胞からの EVs 回収

樹立した 3 種類の iPS 細胞から EVs 回収にあたっては、Cellartis® DEF-CS™ 500 Culture System（タカラバイオ株式会社）を使用した。培養方法については、過去の報告［4］に準じて行った。80%コンフルエント時に Cellartis® MSC Xeno-Free Culture Medium（タカラバイオ株式会社）に培地交換し、48 時間後に CM を回収した。回収した CM を、超遠心機（himac CP80NX、日立工機）を用いて 4℃、100,000×g で 70 分間超遠心した。これを 4 回繰り返したのち、PBS に再懸濁し、実験使用まで−80℃で保存した。

3. EVs の確認

EVs の確認については、ウエスタンブロット法で EVs の表面マーカー（CD9、CD81）の確認とクライオ透過型電子顕微鏡（Cryo-TEM）下で EVs の存在の確認を行った。

4. SS マウスモデルと EVs の静脈内投与

一次性 SS モデルマウスとしては、13 週齢雌の non-obese diabetic（NOD）マウスを用いた［5］。マウスの尾静脈から EVs を 300μg/ml で 1 回（100μl の PBS に懸濁）投与した。またネガティブコントロールとして PBS を 100μl 投与し、4 週後に評価を行った。

5. 刺激時唾液分泌測定

塩酸ピロカルピン（0.05 mg/100g マウス体重あたり）を腹腔内投与し、3 分後から唾液量を 1 分毎に 15 分間測定した。マイクロピペットで唾液を採取し、計測した後にグラフ化して評価した。

6. 組織学的評価

マウスから回収した唾液腺を 4%PFA で一晩固定し、段階的にアルコールで脱水し、キシレンで透明化後にパラフィン包埋を行った。5μm 厚で切片を作製し、ヘマトキシリン—エオジン染色（H-E 染色）を行い評価した。

7. Enzyme-linked immunosorbent （ELISA）アッセイ

iPS 細胞の CM 中の HGF および TGF-β1 の濃度測定に関しては、それぞれ Quantikine ELISA Kit（R&D Systems 社）を使用した。

また、マウス血中の抗 SS-A 抗体および抗 SS-B 抗体の測定については、Mouse Anti-SSA（Ro-52）ELISA Kit および Mouse Anti-SSB（La）ELISA Kit を用いて行った（Signosis 社）。EVs 投与から 4 週後にマウスの全血を採取し、血清として回収した。血清は、50 倍希釈して使用した。

8. リアルタイム polymerase chain reaction（PCR）法

マウス唾液腺および脾臓の Total RNA の抽出は、QIAshredder と RNeasy mini extraction kit（QIAGEN 社）を用いて行った。抽出した Total RNA は、cDNA としてリアルタイム PCR 法に用いた。リアルタイム PCR は、SYBR® Green 法を用いて、以下の遺伝子について検索を行った（プライマーは省略）。*Il-2*、*Inf-γ*、*Il-10*、*T-bet*、*Il-4*、*GATA-3*、*Il-17a*、*RORγ*、*Tgf-b1*、*Foxp3*、*Bcl-6*、*Tlr2*、*Tlr4*、*Tlr7* および *Tlr9* である。

9. マイクロ RNA シーケンス解析

EVs 中の miRNA の差異を調べるために、High Sensitivity RNA ScreenTape®（アジデント・テクノロジー株式会社）を用いてマイクロ RNA シーケンスを行った。

10. 統計学的処理について

データは、平均値±SD で示した。群間差の統計的有意性の算出には、Student's t-test、Mann-Whitney U-test、Kruskal-Wallis test、Spearman's rank correlations を用いた。0.05 未満の p 値は、統計的に有意であるとみなした。すべての解析は、GraphPad Prism 9 を使用して行った。

結果および考察

1. 樹立した iPS 細胞は未分化性を有しており、それらが放出する EVs は表面に CD9、CD81 を有する。

われわれは、歯髄幹細胞から数種類の iPS 細胞を樹立し、それぞれの細胞形態や未分化性の確認および CM 中

の HGF、TGF-β1 の濃度を測定した。図 1a のように樹立した iPS 細胞の CM 中の HGF、TGF-β1 の濃度は異なり iPS-CM 3 が高濃度であった。逆に、iPS-CM 1 が最も低濃度であった。しかし、両者とも細胞形態は変わらず、両者とも未分化マーカーの発現は認めた（図 1c）。それらの EVs の形態と表面マーカーを調べたところ、EVs の大きさはともに 200 nm 前後であり、表面マーカーは CD9、CD81 をともに認めた（図 1b）。よって、樹立した iPS 細胞は未分化性を有し、かつ細胞能力に差があることが示された。また、それらからの EVs は大きさや表面マーカーに違いは認められなかった。

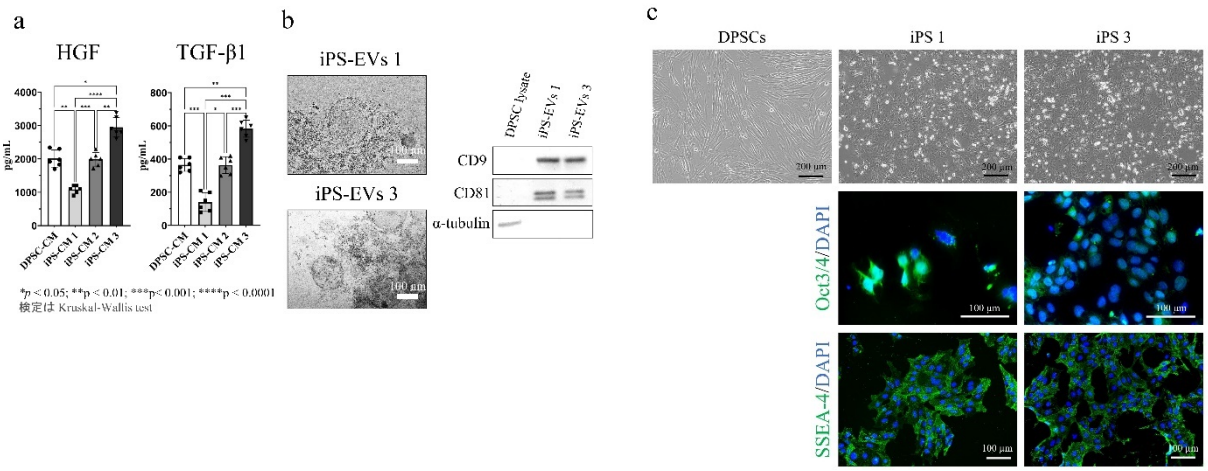


図 1. 樹立した iPS 細胞の未分化性の確認とその EVs の特性

a） CM 中の HGF, TGF-β1 の濃度について。*p < 0.05; **p < 0.01; ***p< 0.001; ****p < 0.0001。検定は Kruskal-Wallis test。

b） iPS-EVs の形態と表面マーカーについて。

c） iPS 細胞の形態と未分化性の確認について。

2. HGF および TGF-β1 産生能力の高い EVs は SS モデルマウスの病態を改善する。

図 1 より HGF および TGF-β1 産生能力の低い細胞から回収した iPS-EVs 1 とそれらの産生能力が高い細胞から回収した iPS-EVs 3 を使用して、一次性 SS モデルマウスである NOD マウスに 30μg を 1 回静脈内投与し 4 週後に評価を行った。ネガティブコントロールとして PBS を使用した（図 2a）。唾液量については、iPS-EVs3 を投与した群では他群と比較して有意に唾液量の増加を認め、血清中の抗 SS-A 抗体の濃度は有意に低下した（図 2b）。唾液腺の H-E 染色においては、導管周囲の炎症性細胞浸潤が減少していた。10 mm^2 あたりの導管周囲の炎症性浸潤細胞の見られる部位（Focus score）をカウントし定量評価をすると、iPS-EVs 3 投与群で有意にその数が減少していることが分かった（図 2c）。よって、iPS-EVs は他群と比較してより、SS の病態を改善することが分かった。これは、HGF および TGF-β1 産生能力の違いにより EVs の治療効果の差がでている可能性が考えられた。

3. 唾液腺組織中の mRNA の発現量の違いについて。

次に唾液腺組織中の炎症性サイトカイン、抗炎症性サイトカイン、T 細胞の各種サブセットマーカーおよび B 細胞の分化マーカーの mRNA の発現を qPCR にて調べた。結果を図 3 に示す。iPS-EVs 3 を投与した群では、炎症性サイトカインの mRNA の発現が低下している一方で、抗炎症サイトカインの mRNA の発現は上昇していた。また、T 細胞の各種サブセットマーカーに関しては、iPS-EVs 投与群において、炎症の制御に関与する制御性 T（Treg）細胞マーカーである *Foxp3* の発現上昇を認め、炎症の増悪に関与する 17 型 T（Th17）細胞マーカーである *Il-17a* の発現低下を認めた。B 細胞に関してはどの群においても mRNA に変化はなかった。以上から、

HGF および TGF-β1 産生能力の高い EVs を投与することで、Treg 細胞の分化を誘導する一方で、Th17 細胞の分化を抑制している可能性が示唆された。

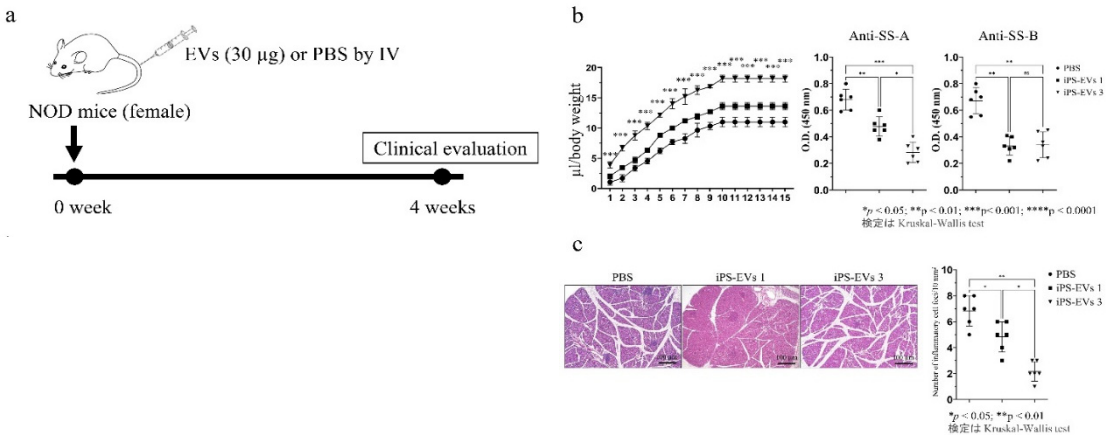


図 2. EVs の SS モデルマウスへの治療効果について

a） 本実験の投与スケジュール。

b） 唾液分泌量（左）と血清中の抗 SS-A 抗体および抗 SS-B 抗体の濃度（右）。

c） 各群の 4 週後の唾液腺の H-E 染色（左）と focus score（右）。

*p＜0.05、**p＜0.01、***p＜0.001、****p＜0.0001。検定は Kruskal-Wallis test。

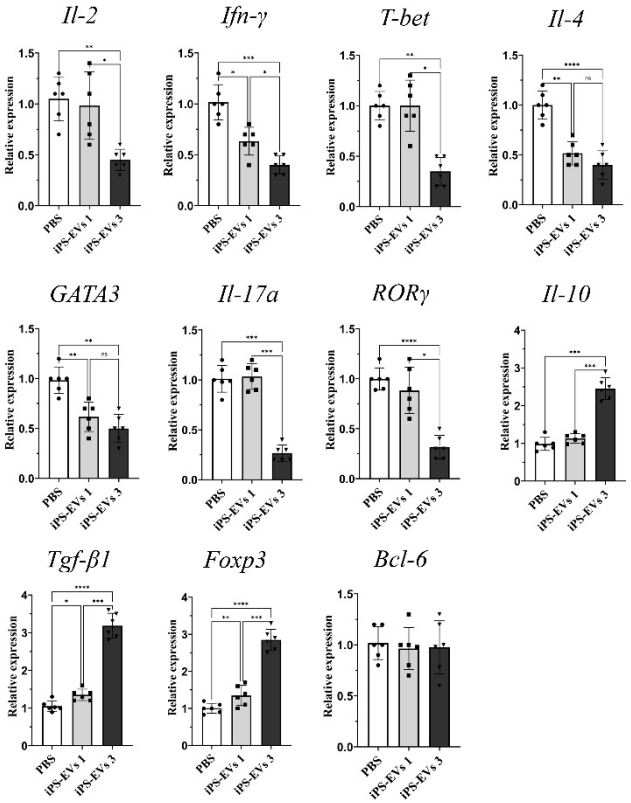


図 3. マウス唾液腺組織中における mRNA 発現について

炎症性サイトカイン、抗炎症性サイトカイン、T 細胞マーカーおよび B 細胞マーカーについて qPCR を行った。*p＜0.05、**p＜0.01、***p＜0.001、****p＜0.0001。検定は、Kruskal-Wallis test。

4. EVs 中のマイクロ RNA である let-7 が Toll-like receptor（TLR）4 を介した炎症誘導を抑制する。

iPS-EVs 1 および iPS-EVs 3 のマイクロ RNA の差異を網羅的に検索するために、マイクロ RNA アレイを施行した。図 4a、b に示すように、iPS-EVs 3 にはより多くの let-7 が含まれていることが分かった。Let-7 family は、過去報告から自然免疫に関与する Toll-like receptor （TLR）の制御に関わるとの報告 ［6］があるため、マウス脾臓の mRNA の Tlr の発現量の違いについて検索した。その結果、iPS-EVs 3 を投与した群では、他群と比較して有意に Tlr4 のみに発現量の低下を認めた（図 4c）。そこで、マウス全血から末梢血単核細胞（PBMC）を分離し、マクロファージへと分化させた。その後、リポ多糖入りの培地に交換した上で iPS-EVs 1 および 3（それぞれ 20 μg/ml）を添加し、24 時間後にその培養上清中の各種サイトカイン濃度を ELISA を用いて調べた。図 4d から、iPS-EV 3 を添加した群では炎症性サイトカインである IL-6 と TNF-α の濃度が他群と比較して有意に低下していることが分かった一方で、抗炎症サイトカインである IL-10 と TGF-β1 は有意に上昇していることが分かった。マウス脾臓組織におけるウエスタンブロットにおいても、iPS-EVs 3 を投与した群においては、炎症性サイトカイン産生の主要経路と考えられている MAPK および TLR4 の発現の低下を認めた（図 4e）。以上から、EVs 中の let-7 family がマクロファージなどの自然免疫に関与する細胞上の TLR4 の発現を抑制し、その結果として MAPK を介した炎症性サイトカイン産生の抑制および抗炎症サイトカイン産生の促進につながり、Th17 細胞の分化・増殖の抑制や Treg 細胞分化・増殖の促進につながる可能性が示唆された。

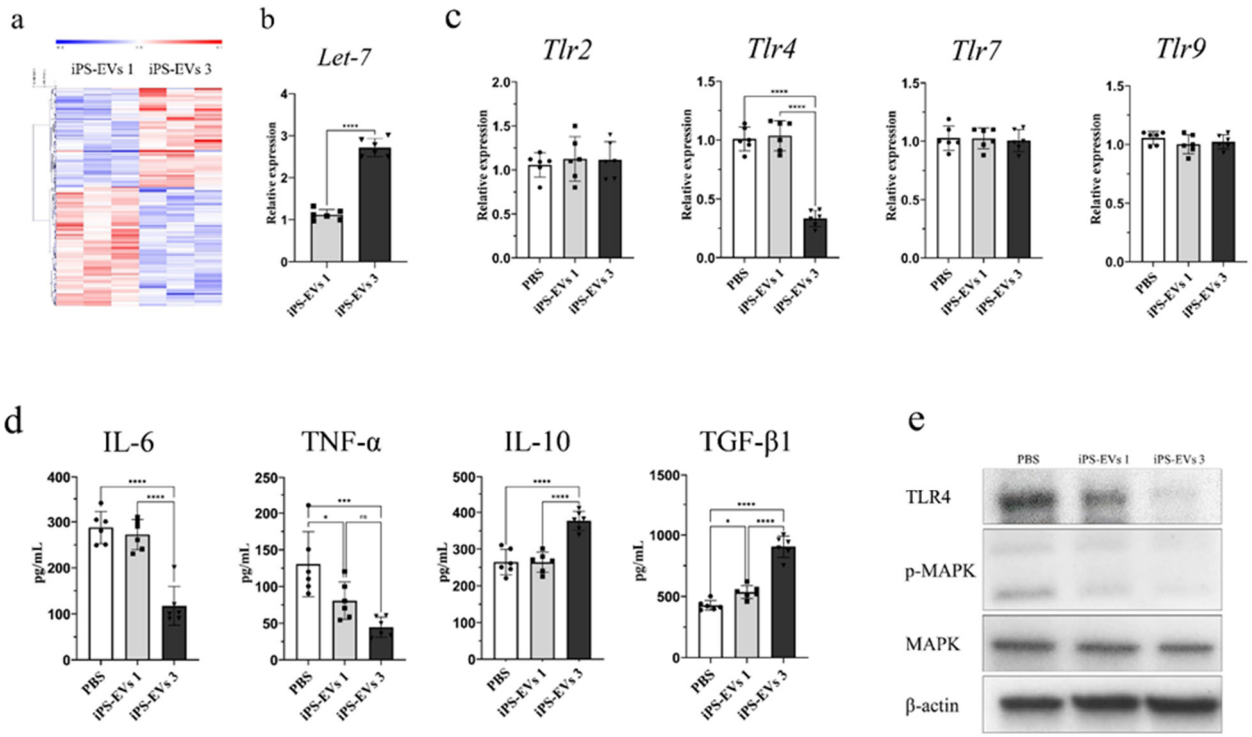


図 4. EVs 中のマイクロ RNA の差異と TLR の発現の違いについて

a） ヒートマップ。

b） Let-7 の qPCR。

c） 各 *Tlr* における qPCR。

d） 各サイトカインにおける ELISA。

e） マウス脾臓組織におけるウエスタンブロット。

*p<0.05、**p<0.01、***p<0.001、****p<0.0001。検定は、Kruskal-Wallis test。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、岐阜医療科学大学薬学部の吉岡弘毅講師である。

文　献

1) Mao F, Tu Q, Wang L, Chu F, Li X, Li HS, Xu W. Mesenchymal stem cells and their therapeutic applications in inflammatory bowel disease. Oncotarget. 2017 Jun 6;8(23):38008-38021. doi: 10.18632/oncotarget.16682. PMID: 28402942; PMCID: PMC5514968.

2) Matsumura-Kawashima M, Ogata K, Moriyama M, Murakami Y, Kawado T, Nakamura S. Secreted factors from dental pulp stem cells improve Sjögren's syndrome via regulatory T cell-mediated immunosuppression. Stem Cell Res Ther. 2021 Mar 16;12(1):182. doi: 10.1186/s13287-021-02236-6. PMID: 33726818; PMCID: PMC7962357.

3) Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. Nat Protoc. 2007;2(12):3081-9. doi: 10.1038/nprot.2007.418. PMID: 18079707.

4) Asplund A, Pradip A, van Giezen M, Aspegren A, Choukair H, Rehnström M, Jacobsson S, Ghosheh N, El Hajjam D, Holmgren S, Larsson S, Benecke J, Butron M, Wigander A, Noaksson K, Sartipy P, Björquist P, Edsbagge J, Küppers-Munther B. One Standardized Differentiation Procedure Robustly Generates Homogenous Hepatocyte Cultures Displaying Metabolic Diversity from a Large Panel of Human Pluripotent Stem Cells. Stem Cell Rev Rep. 2016 Feb;12(1):90-104. doi: 10.1007/s12015-015-9621-9. PMID: 26385115.

5) Humphreys-Beher MG, Peck AB. New concepts for the development of autoimmune exocrinopathy derived from studies with the NOD mouse model. Arch Oral Biol. 1999 May;44 Suppl 1:S21-5. doi: 10.1016/s0003-9969(99)00045-x. PMID: 10414851.

6) Nejad C, Stunden HJ, Gantier MP. A guide to miRNAs in inflammation and innate immune responses. FEBS J. 2018 Oct;285(20):3695-3716. doi: 10.1111/febs.14482. Epub 2018 May 6. PMID: 29688631.