

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06991

研究課題名(和文) HMGB1が骨髄由来間葉系幹細胞に与える影響の検討

研究課題名(英文) Examine the effect of HMGB1 on bone marrow derived mesenchymal stem cell

研究代表者

古味 佳子 (Komi, Keiko)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：80782028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、間葉系幹細胞の損傷組織への誘導集積させることで組織再生を促進する因子として注目されているHMGB1が骨髄由来間葉系幹細胞に与える影響を明らかとし、より効率的な組織再生療法を開発することが目的である。マウス大腿骨骨欠損モデルにおいて宿主間葉系幹細胞は骨欠損作製後1日に骨欠損部に集積し、幹細胞集積部位周囲にHMGB1の発現も確認された。in vitroにおけるHMGB1の間葉系幹細胞の機能に与える影響については、幹細胞性、増殖ならびに走化性について明らかな影響は認められなかった。HMGB1の存在下で影響の起こりうる幹細胞の多分化能や免疫調節能についても今後のさらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：In recent years High mobility group box 1 (HMGB 1) is known as a factor promoting tissue regeneration. It is also reported that HMGB1 induces mesenchymal stem cells in the marrow to the damage skin. In this study, we investigated the influence of HMGB1 on bone marrow derived mesenchymal stem cells. In the mouse wound healing model, host mesenchymal stem cell accumulation was detected in 1 day after surgery, and HMGB1 was expressed around the stem cell accumulation site in same day. We examined the effect of HMGB1 on mesenchymal stem cells, but the effect on stemness, stem cell proliferation and migration was not clear. Further studies on multiple differentiation and immunomodulate function that may be affected in the presence of HMGB1 will be necessary in the future.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：間葉系幹細胞 組織再生 創傷治癒

### 1. 研究開始当初の背景

近年、間葉系幹細胞の免疫調節能を応用し、移植片対宿主病や全身性エリテマトーデスなどの全身性自己免疫疾患に対して間葉系幹細胞移植によって症状が寛解すると報告されている(Le Blanc et al., *Lance*, 2004. Sun L et al., *Stem Cells*, 2009.). しかしながら、現状の間葉系幹細胞を応用した組織再生療法や移植療法にはいくつかの問題が挙げられる。そこで移植コストや、移植細胞の生着や機能の調節が困難な幹細胞移植に頼らず、内在性宿主幹細胞を応用した組織再生療法の開発が期待されている。一方で、組織損傷部位や治癒部位には、その周辺から多数の未分化間葉系幹細胞が集積することが報告されており(Karp JM et al., *Cell Stem Cell*, 2009.), これらの集積幹細胞を誘導することで、上記の問題の影響を受けずに組織再生や疾患の改善に繋げようとする試みも始まりつつある(Hong HS et al., *Nat Med.*, 2009. Koning, JJ et al., *Front Immunol.*, 2013. Aikawa E et al., *Sci Rep.*, 2015.).

申請者らも、炎症性サイトカインが豊富な創傷治癒部位に宿主間葉系幹細胞が集積すること、また集積した宿主間葉系幹細胞は炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ ) の影響により間葉系幹細胞の免疫調整能に重要であると報告されている(Akiyama K et al., *Cell Stem Cell*, 2012.). FasL の発現を上昇させ、隣接する CD3 陽性 T 細胞のアポトーシスを誘導することで宿主免疫の抑制作用を増強することを示唆した研究結果を得ている。

ところで、表皮水疱症の壊死過程から大量に放出される HMGB1 が間葉系幹細胞を刺激して血中に動員し、剥離表皮部皮膚に集積して真皮線維芽細胞や表皮角化細胞に分化することにより、損傷皮膚再生を誘導していることが報告され(Aikawa E et al., *Sci Rep.*, 2015.), 難治性皮膚潰瘍に対する臨床治験も開始されている。

しかしながら、HMGB1 が骨髄由来間葉系幹細胞の機能にどのような影響を与えているのかは十分に検討されていないのが現状である。強力な細胞集積因子と見なされている HMGB1 の間葉系幹細胞に対する生物学的機能を明らかにする事は、間葉系幹細胞による、より効率的な組織再生療法の開発に繋がると考える。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、HMGB1 が骨髄由来間葉系幹細胞の多分化能や免疫調節能などの機能にどのような影響を与えるかを明らかにする事で、より効率的な組織再生療法を開発することである。

### 3. 研究の方法

HMGB1 が骨髄由来間葉系幹細胞の機能にどのような影響を与えるかを明らかにする事でより効率的な組織再生療法を開発す

ることを目的に、以下の方法で段階的に解明する。

(1) マウス大腿骨穿孔モデルの創傷治癒過程における HMGB1 の発現ならびに分布を経時的に組織学的に解析する。

①全身麻酔下で C57BL6/J マウスの下肢大腿骨を露出させた後、直径1.0mmのラウンドバーを用いて大腿骨皮質骨腹側を穿孔する。穿孔後 1, 3, 5, 7 日に大腿骨を採取する。

②HMGB1 抗体の分布を免疫染色で組織学的に経時的に評価する。

(2) HMGB1 の骨髄由来間葉系幹細胞 (BMMSCs) に対する影響を、マウス大腿骨より細胞単離後、HMGB1 存在下で細胞培養し、分子生物学的手法を用い解析する。

①C57BL6/J マウス大腿骨から骨髄を採取、培養皿に播種し、マウス骨髄由来間質細胞 (mouse bone marrow stromal cells: mBMSCs) を Friedenstein らの方法 (Friedenstein AJ et al., *Cell Tissue Kinet.*, 1970)によって分離・培養する。

②HMGB1 抗体がmBMSCsへどのような影響を与えるのかを検討するために、HMGB1 を添加したmBMSCs の幹細胞性について解析する。

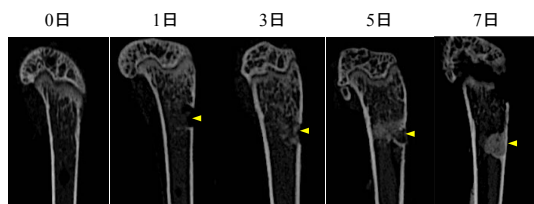
### 4. 研究成果

(1) マウス大腿骨穿孔モデルの創傷治癒過程における HMGB1 の発現ならびに分布。

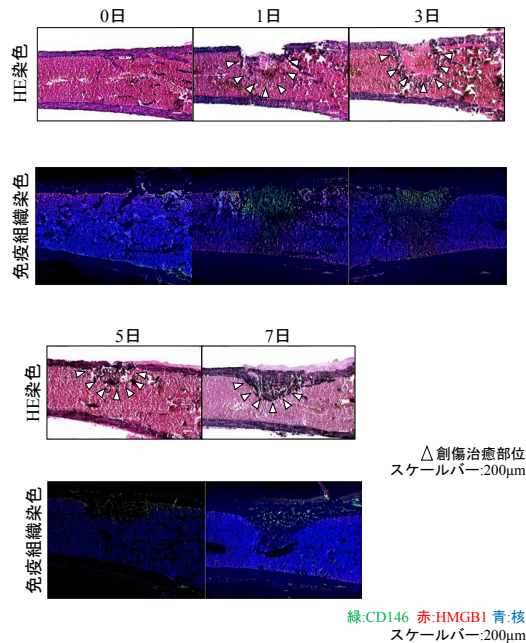
創傷治癒過程を評価するためにマウス大腿骨穿孔モデルの穿孔後 1, 3, 5, 7 日に大腿骨を回収し  $\mu$ CT 解析ならびに凍結切片作製後、ヘマトキシリンエオジン (HE) 染色を行った。

さらに創傷治癒過程における宿主間葉系幹細胞の集積と HMGB1 の発現ならびに分布を把握する為に、凍結切片作製後、CD146 と HMGB1 の蛍光免疫組織染色を行った。

結果として、 $\mu$ CT 像でも HE 染色像でも穿孔後 1 日から 7 日にかけて創傷部位の治癒を経時的に確認できた。(結果 1) また CD146 陽性細胞の集積は骨欠損作製後 1 日に骨欠損部で多く認め、また CD146 陽性細胞集積部位周囲に HMGB1 の発現も観察された。(結果 2)



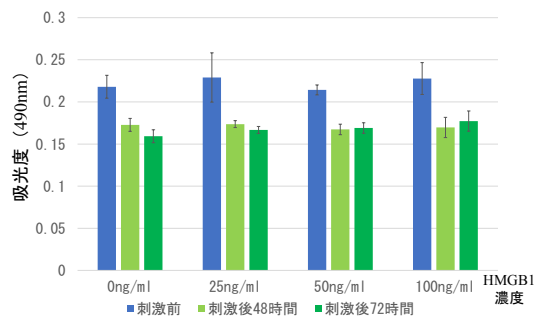
結果 1 創傷治癒過程の $\mu$ CT像



結果 2 創傷治癒過程のHMGB1抗体の分布

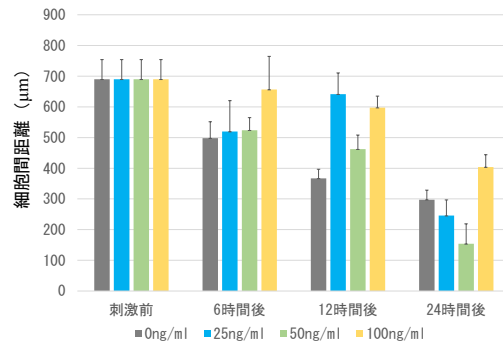
(2) HMGB1 の BMMSCs に対する影響の検討.

・HMGB1の BMMSCs の細胞増殖能に対する影響を MTS assay にて検討したところ、HMGB1は 25ng/ml, 50ng/ml, 100ng/ml の各濃度ならびに 48 時間および72時間の刺激においても細胞増殖能への明らかな影響は認められなかった。(結果3)

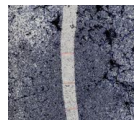


結果 3 HMGB1による細胞増殖能への影響

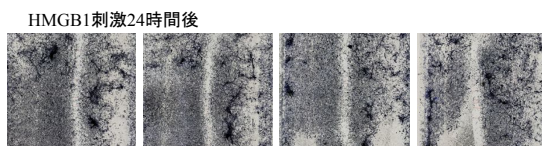
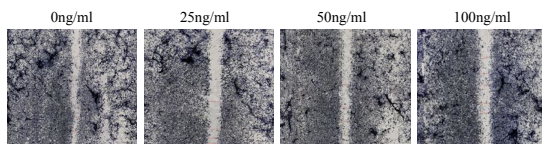
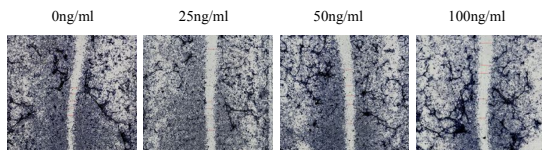
・HMGB1の BMMSCs の細胞走化性に対する影響を Scratch assay にて検討したところ、HMGB1の刺激により BMMSCs の細胞走化性に明らかな影響を与えていることは認められなかった。(結果4)



スクラッチ直後HMGB1刺激前



HMGB1刺激6時間後



結果 4 HMGB1による細胞走化性への影響

以上の結果より、マウス大腿骨骨欠損モデルにおいて幹細胞集積部位周囲に HMGB1 の発現も確認されたことから、組織再生の場において HMGB1 が宿主幹細胞の集積に関与している可能性は示唆された。しかし、*in vitro* において HMGB1 が間葉系幹細胞の機能に与える影響については、細胞増殖ならびに走化性について明らかな影響は認められなかった。HMGB1 の存在下で影響の起こりうる幹細胞の多分化能や免疫調節能についても今後のさらなる検討が必要である。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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：  
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

古味 佳子 (KOMI, Keiko)  
岡山大学病院クラウンブリッジ補綴科  
医員  
研究者番号：80782028

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

窪木 拓男 (KUBOKI, Takuo)  
秋山 謙太郎 (AKIYAMA, Kentaro)  
大野 充昭 (ONO, Mitsuaki)  
丸濱 功太郎 (MARUHAMA, Kotaro)  
吉岡 裕也 (YOSHIOKA, Yuya)  
國友 雅義 (KUNITOMO, Masayoshi)