

令和元年6月7日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20039

研究課題名(和文)炎症性サイトカインに対する滑膜由来間葉系幹細胞の応答解析

研究課題名(英文) Response of synovial-derived mesenchymal stem cells stimulated with inflammatory cytokines

研究代表者

小森 啓一郎 (KOMORI, Keiichirou)

東京医科歯科大学・統合研究機構・プロジェクト研究員

研究者番号：20622624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：滑膜由来間葉系幹細胞の軟骨再生における作用機序の解明は、滑膜由来間葉系幹細胞を用いた再生医療の発展・実用化に必須である。本研究では滑膜由来間葉系幹細胞の軟骨再生の作用機序の一端と考えられる炎症性サイトカインに対する応答について調べた。滑膜由来間葉系幹細胞において、TNFは、細胞数を増加させるが、分化能に影響はなかった。由来組織によりサイトカインに対する応答が異なることが示唆された。IL-1刺激による増殖促進は、IRAK-1,-4阻害剤で抑制されなかった。IL-1の影響は添加期間に比例し、さらに、除去後一定期間、効果が持続した。本研究の知見は再生医療の発展・実用化に寄与するものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性サイトカインに間葉系幹細胞が応答し、細胞増殖や細胞形態が変化する事を明らかにしたこと、また、効果が表れる添加期間を示唆したことは、より効果的な細胞投与タイミングや、より治療効果が高い状態での細胞投与を行うための知見が得られた。さらに、これらの結果を入り口としてより詳細に探求する事で、滑膜由来間葉系幹細胞の新たな可能性の探索につながることから、これらを明らかとすることは、より効果的な細胞投与タイミングや、より治療効果が高い状態での細胞投与を行うための知見が得られると考えられる。このことから、本研究は間葉系幹細胞を用いた再生医療の発展に寄与するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of action of synovium-derived mesenchymal stem cells in cartilage regeneration is essential for the development and practical use of regenerative medicine. In this study, we investigated the response to inflammatory cytokines which is considered to be one of the mechanisms of cartilage regeneration of synovium-derived mesenchymal stem cells. In synovial-derived mesenchymal stem cells, TNF increased the number of cells but had no effect on differentiation ability. It was suggested that the origin tissue has different responses to cytokines. Growth promotion by IL-1 stimulation was not suppressed by the IRAK-1, -4 inhibitor. The effect of IL-1 was proportional to the addition period, and the effect continued for a fixed period after removal. The findings of this research are expected to contribute to the development and practical use of regenerative medicine.

研究分野：再生医療

キーワード：滑膜幹細胞 関節炎 変形性膝関節症 炎症性サイトカイン 再生医療

1. 研究開始当初の背景

軟骨組織は低い細胞密度に加え血行を欠くことから再生能力が乏しいため、軟骨に欠損が生じた場合、多くの患者において変形性の関節症へと進行することが知られている。損傷した関節軟骨を修復する治療法として、申請者らは高い軟骨分化能を有する滑膜から分離した間葉系幹細胞を用いた軟骨再生等の臨床研究を精力的に行ってきた。

この滑膜間葉系幹細胞を用いた軟骨再生の作用機序としては、滑膜間葉系幹細胞が直接軟骨へ分化する系と、滑膜間葉系幹細胞から放出されると予想される因子により軟骨再生が促進される系の2種類存在することが示唆されているが、このうち後者については未解明の部分が多く残されている。

滑膜由来間葉系幹細胞の軟骨再生作用機序の解明は、投与効果の予測指標分子に関する知見が得られるばかりでなく、投与治療の発展・進歩に寄与すると考えられることから、必須である。

滑膜由来間葉系幹細胞に関しては、正常膝関節液中にはほとんど存在しないが、前十字靭帯、半月板、関節軟骨を損傷すると、膝関節液中に増加すること(Sekiya, J Orthop Res 2012、Matsukura, Clin Orthop Relat Res 2014)さらに、正常な膝と前十字靭帯損傷膝から採取した関節液より分離した間葉系幹細胞を培養すると、正常膝からの細胞は小さなコロニーが少数形成されるのに対して、前十字靭帯損傷膝からの細胞は、大きなコロニーが多数形成されるという報告(Morito, Rheumatology 2008)がある。また、炎症モデルである半月板切除ラットにヒト間葉系幹細胞を移植したところ、ヒト間葉系幹細胞において、軟骨形成に関与するサイトカインである BMP-2 の mRNA が発現するという報告がある。さらに、BMP-2 の遺伝子発現は、NF - κ B と関連しているという報告(Feng, J Biol Chem 2003)があるが、NF - κ B は炎症性サイトカインである IL-1 β や TNF - α により活性化される転写因子の一つである。

これらは炎症に関連して間葉系幹細胞が応答し、遊走能や増殖能を活性化させ、さらに分化を促進させることで、損傷部分の治癒促進に関連していることを示唆している。このことから、炎症に対する間葉系幹細胞の応答解析は、滑膜由来間葉系幹細胞の軟骨再生作用機序を解明する知見が得られる可能性が高い。

2. 研究の目的

間葉系幹細胞は滑膜、骨髄、脂肪などから比較的簡便に採取でき、自己増殖能や間葉系組織細胞への分化能を持つことから、再生医療への応用が期待されている。滑膜から採取可能な間葉系幹細胞は高い軟骨分化能を持つため、自己再生能力に乏しい関節軟骨や半月板の再生医療に有用である。申請者らは滑膜由来間葉系幹細胞を用いた軟骨再生等の臨床試験を精力的に行ってきたが、滑膜由来間葉系幹細胞の軟骨再生における作用機序は、未解明の部分が多く残されている。これら作用機序の解明は、滑膜由来間葉系幹細胞を用いた再生医療の発展・実用化には必須である。そこで、本研究では滑膜由来間葉系幹細胞による軟骨再生の作用機序の一端と考えられる炎症性サイトカインに対する滑膜由来間葉系幹細胞の応答を明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 炎症性サイトカインが滑膜由来間葉系幹細胞に及ぼす影響を検証するため、炎症性サイトカインの1つである TNF α を添加し滑膜由来間葉系幹細胞を培養し、総細胞数、コロニーあたりの細胞数を測定した。また、TNF α 添加培養を行った滑膜由来間葉系幹細胞の軟骨脂肪骨分化能を確認した。
- (2) TNF α 以外の炎症性サイトカインについて滑膜由来間葉系幹細胞と滑膜以外の組織由来間葉系幹細胞に及ぼす影響を比較検討するため、滑膜由来間葉系幹細胞と骨髄由来間葉系幹細胞に炎症性サイトカインである IL-1、IL-1、IL-6、抗炎症性サイトカインの IL-10 をそれぞれ添加して培養し、増殖能を確認した。
- (3) 炎症性サイトカインである IL-1 及び IL-1 が滑膜由来間葉系幹細胞に及ぼす影響について詳細に検討するため、滑膜由来間葉系幹細胞に炎症性サイトカインである IL-1 及び IL-1 をそれぞれ添加すると同時に、IL-1シグナル伝達の下流にある IRAK-1、-4 の阻害剤を同時に添加して、IL-1 及び IL-1 の細胞増殖に対する影響を検討した。さらに IL-1 及び IL-1 の添加期間を変えて細胞増殖に及ぼす影響について検討を行った。

4. 研究成果

- (1) 炎症性サイトカインの1つである TNF を添加し、滑膜由来間葉系幹細胞を培養したところ TNF による総細胞数、および、コロニーあたりの細胞数の増加が確認された。また、この細胞数の増加は、25ng/mL まで TNF 濃度依存的であった。さらに TNF 添加培養を行った滑膜由来間葉系幹細胞の軟骨、脂肪、骨分化能を確認したところ、TNF 添加による差は確認されなかった。これらの事から TNF は滑膜由来間葉系幹細胞の増殖能は促進させるが多分化能には影響を与えない事が示唆された。
- (2) 滑膜由来間葉系幹細胞と骨髄由来間葉系幹細胞に炎症性サイトカインである IL-1、IL-1、IL-6、抗炎症性サイトカインの IL-10 をそれぞれ添加して培養を行ったところ骨髄由来間葉系幹細胞では添加した全てのサイトカインで増殖への影響は見られなかった。(図1)一方、滑膜由来間葉系幹細胞では IL-6 および IL-10 は増殖への影響を与えなかったが、IL-1、IL-1 では増殖の促進が確認された。(図2)これらの事から、間葉系幹細胞は、由来組織によりサイトカインに対する応答が異なる可能性が示唆された。

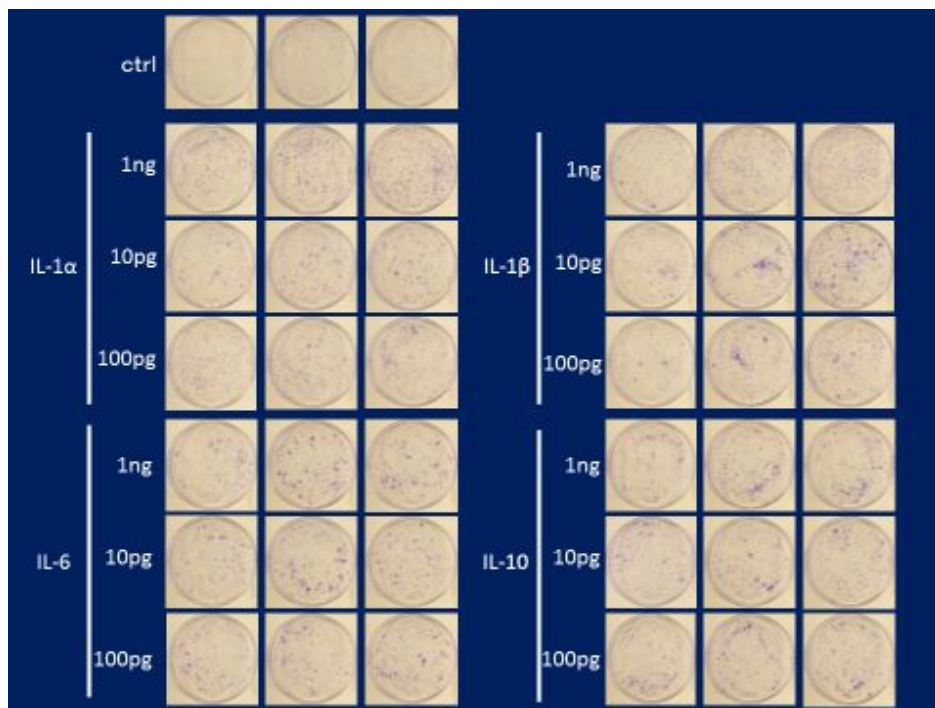


図1 骨髄由来間葉系幹細胞のサイトカインに対する応答

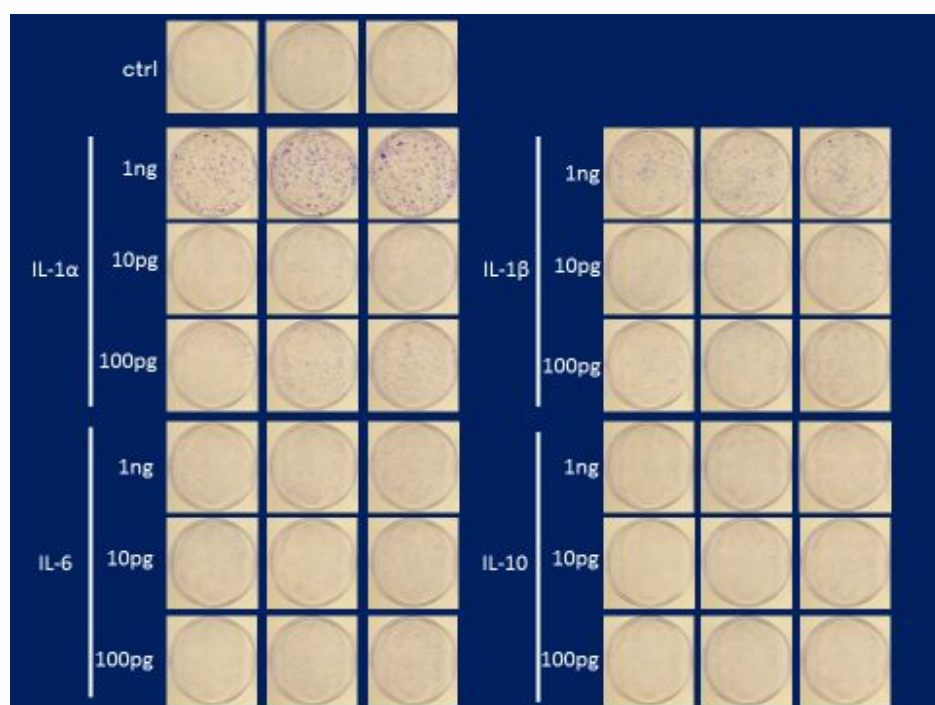


図2 滑膜由来間葉系幹細胞のサイトカインに対する応答

(3) 滑膜由来間葉系幹細胞に炎症性サイトカインである IL-1 α 及び IL-1 β をそれぞれ添加すると同時に、IL-1 シグナル伝達の下流にある IRAK-1, -4 の阻害剤を同時に添加して培養を行ったところ、IL-1 α 、IL-1 β 単独で添加した培養では、(2)の実験同様増殖の促進が確認された。(図3) さらに、増殖促進の抑制が予想された IRAK-1, -4 の阻害剤を同時に添加した培養においても増殖の促進が確認された。(図3) IL-1 α 及び IL-1 β 添加期間の影響については添加期間に比例して増殖が促進された。(図4) また IL-1 α 及び IL-1 β の刺激を抜いた後暫くの期間 IL-1 α 及び IL-1 β の効果が持続する事が示唆された。

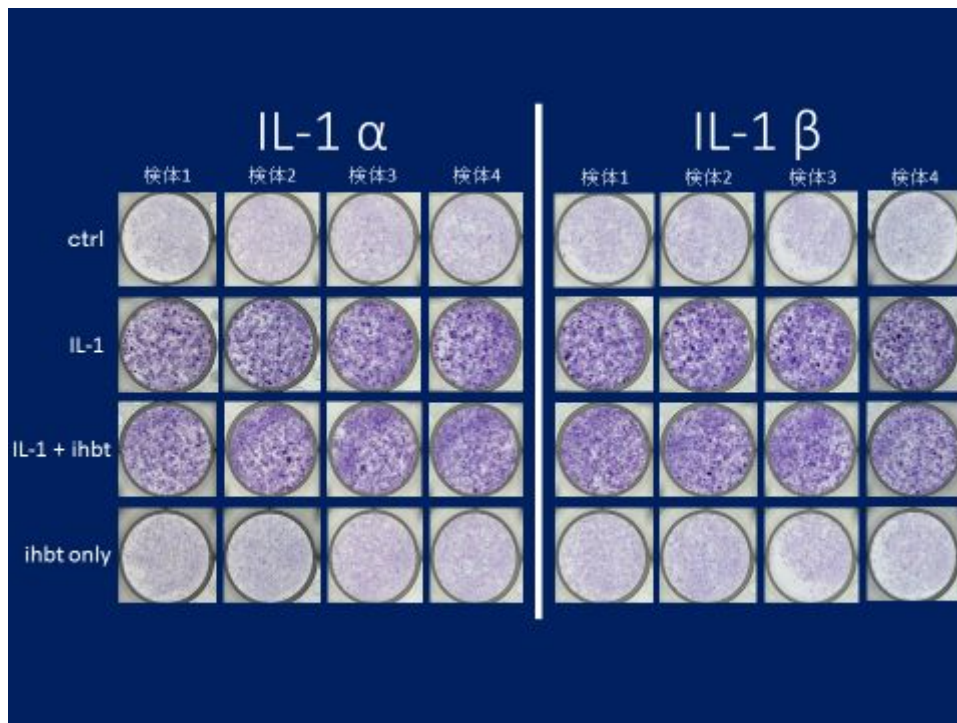


図3 滑膜由来間葉系幹細胞の細胞増殖に対する IRAK-1, -4 阻害の影響

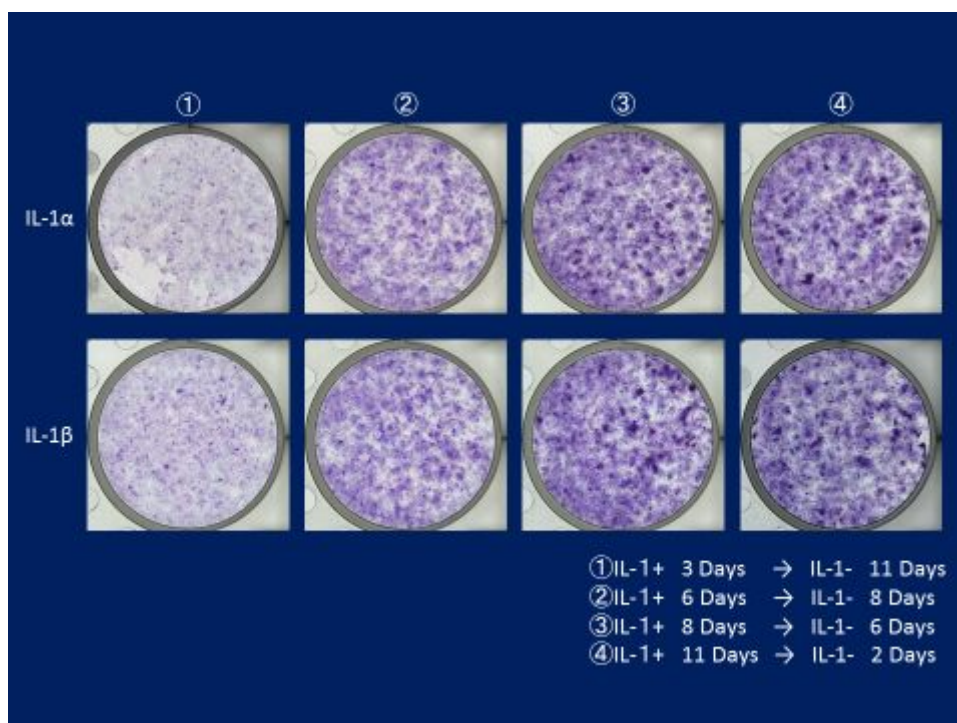


図4 滑膜由来間葉系幹細胞の細胞増殖に対する IL-1 添加期間の影響

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Matsumura.E, Tsuji.K, Komori.K, Koga.H, Sekiya.I, Muneta.T. Pretreatment with IL-1 enhances proliferation and chondrogenic potential of synovium-derived mesenchymal stem cells.Cytotherapy. 査読有 2017 Feb;19(2):181-193.
DOI:10.1016/j.jcyt.2016.11.004. Equib 2016 Dec 12.

Shioda.M, Muneta.T, Tsuji.K, Mizuno.M, Komori.K, Koga.H, Sekiya.I. TNF promotes proliferation of human synovial MSCs while maintaining chondrogenic potential. PLoS ONE. 査読有 2017.05; 12 (5):
DOI:10.1371/journal.pone.0177771.eCollection 2017

〔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：
出願年：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。