

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16932

研究課題名(和文) 歯髄幹細胞移植による胸腺機能の改善を介した免疫調節機序の研究

研究課題名(英文) Immunomodulatory mechanisms via improvement of thymic function by dental pulp stem cell transplantation.

研究代表者

園田 聡一郎 (Sonoda, Soichiro)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：10831985

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年、胸腺の間葉系細胞が正常なT細胞のセレクションに重要な役割を果たすことが報告されており、その機能異常が自己免疫疾患の病因になることが推測される。本研究では、胸腺における制御性T細胞のセレクション機序に着目し、胸腺間葉系ストロマ細胞との関連を検討した。具体的には、マウス胸腺から胸腺間葉系ストロマ細胞およびCD4単陽性細胞を単離し、共培養実験を行なった。接触型共培養においてCD4単陽性細胞からCD4・CD25陽性の制御性T細胞への分化が認められた。CD4・CD25陽性の制御性T細胞への分化は、特に髄質の胸腺間葉系ストロマ細胞の細胞表面マーカー特性を示す細胞によって誘導されることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胸腺では、皮質および髄質のそれぞれに特異的に局在するストロマ細胞によって、部位特異的な刺激によってT細胞の成熟・分化が促されることが知られている。本研究により、胸腺髄質間葉系ストロマ細胞が制御性T細胞の胸腺内における部位依存的な分化を担っていることが示唆された。制御性T細胞は免疫自己寛容を司る細胞であり、自己免疫疾患などの免疫の過剰反応を伴う疾患の病因に深く関わっていると考えられている。本研究成果によって、免疫の過剰反応を伴う疾患における、制御性T細胞の賦活化を可能にする新たな治療標的として胸腺髄質間葉系ストロマ細胞が有力な候補であることを示すことができた。

研究成果の概要(英文)：Recently, it has been reported that thymic mesenchymal cells play an essential role in the selection of normal T cells, and their dysfunction is considered an etiological factor in autoimmune diseases. In this study, we focused on the selection mechanism of regulatory T cells in the thymus and examined their relationship with thymic mesenchymal stromal cells. Thymic mesenchymal stromal cells and CD4 single cells were isolated from mouse thymus and co-cultured. In direct co-cultures, CD4 single positive cells differentiated into CD4 and CD25 positive regulatory T cells, which were shown to be induced by thymic medullary mesenchymal stromal cells-like cells.

研究分野：間葉系ストロマ細胞

キーワード：胸腺間葉系ストロマ細胞 制御性T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胸腺は、T 細胞の発生に關与する生体の免疫システムの中枢を担う臓器である。したがって、自己免疫疾患などの免疫性疾患の治療ターゲットとなると考えられる。間葉系幹細胞は T リンパ球に対し高い免疫調節機能を示すことが知られているが、間葉系幹細胞による胸腺機能の制御機構は知られていない。

研究代表者らは、歯髄幹細胞の免疫調節能に着目した研究を行ってきた。ヒト歯髄幹細胞は、永久歯および乳歯の歯髄組織で発見された組織幹細胞であり、象牙質・歯髄複合体の発生・維持に役割を果たす責任細胞である。歯髄幹細胞は自己複製能と間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells, MSCs) の minimal criteria を示す細胞である。骨髓由来 MSCs と比べ、優れた免疫調節機能を持ち、全身性エリテマトーデスモデル動物の MRL/lpr マウスへの移植実験で、高い治療効果を示している。

歯髄幹細胞を含めた MSCs の免疫調節機序として、Cell-Cell コンタクトやサイトカインなどの液性因子による制御が報告されている。MSC 移植により末梢血中に誘導性制御性 T 細胞 (induced regulatory T cell, iTreg) が増加し、MSCs による免疫制御の中心的機序と考えられている。この末梢血 iTreg が誘導されるメカニズムとして、MSCs が Fas-FasL を介して T 細胞アポトーシスを誘導し、アポトーシス小体を貪食したマクロファージから分泌される TGFβ が iTreg を誘導する考えが有力である。

Treg には iTreg 以外にも胸腺内で誘導される内在性 Treg (naturally occurring Treg, nTreg) が存在する。nTreg と iTreg を抗原により区分するのは難しいが、いずれも全身の免疫寛容へ貢献していることが知られている。したがって、歯髄幹細胞を含む MSC 移植における免疫調節機序を解明する上で、胸腺における nTreg に対する作用を検討する必要があるが、これまでの研究では解明されていない。

本研究では、胸腺の正常な発生・発育・維持には神経堤由来の間葉系細胞が必須であることに着目し、発生学的に神経堤に由来する歯髄幹細胞を自己免疫疾患モデルマウスへ移植し、胸腺への影響と治療効果との関連性を解明することとした (図 1)。

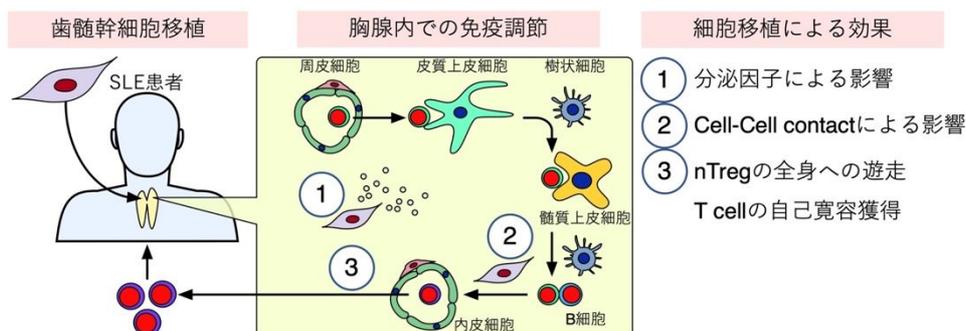


図 1: 研究仮説

2. 研究の目的

本研究の当初からの目的は、(1)自己免疫疾患に対する新規治療方法確立へ向けた科学的基盤を得ることならびに(2)倫理的制約から研究が困難なヒト神経堤の生体での機能に関する基礎的知見を得ることである。特に、(1)を社会的利益に直接的に貢献する主題であると考え、胸腺における制御性 T 細胞誘導メカニズムと間葉系ストロマ細胞との関わりに主眼を据えて、研究を遂行した。

3. 研究の方法

(1) 胸腺間葉系ストロマ細胞の単離および特性解析

マウス胸腺から付着コロニー形成法を用いて、間葉系ストロマ細胞を単離した。単離した胸腺間葉系ストロマ細胞と歯髄幹細胞の特性を比較解析した。

胸腺間葉系ストロマ細胞と歯髄幹細胞の比較特性解析の結果、胸腺間葉系ストロマ細胞は歯髄幹細胞と類似した特性を示すことが明らかになった(図 2)。したがって、歯髄幹細胞の移植ならびに歯髄幹細胞による免疫調節メカニズムを解析することに先立って、胸腺間葉系ストロマ細胞の胸腺 T 細胞制御能の解析を行うこととした。

(2) 胸腺間葉系ストロマ細胞の胸腺 T 細胞制御能解析

マウス胸腺から CD4 シングルポジティブ T 細胞ならびに CD8 シングルポジティブ T 細胞、CD4・CD8 ダブルポジティブ T 細胞を単離し、胸腺間葉系ストロマ細胞との共培養実験を行なった。共培養後の T 細胞をフローサイトメトリーにて解析し、T 細胞の生存ならびに分化について検討を行った。

4. 研究成果

本研究では、胸腺から間葉系ストロマ細胞を効率的に単離・培養することに成功した。付着コロニー形成法を用いることで、コロニー形成能を有する間葉系ストロマ細胞を単離することが出来た(図 2)。また、細胞表面抗原解析および骨・象牙質分化解析により、単離した胸腺間葉系ストロマ細胞は歯髄幹細胞と類似した細胞特性を示すことが明らかになった(図 2)。

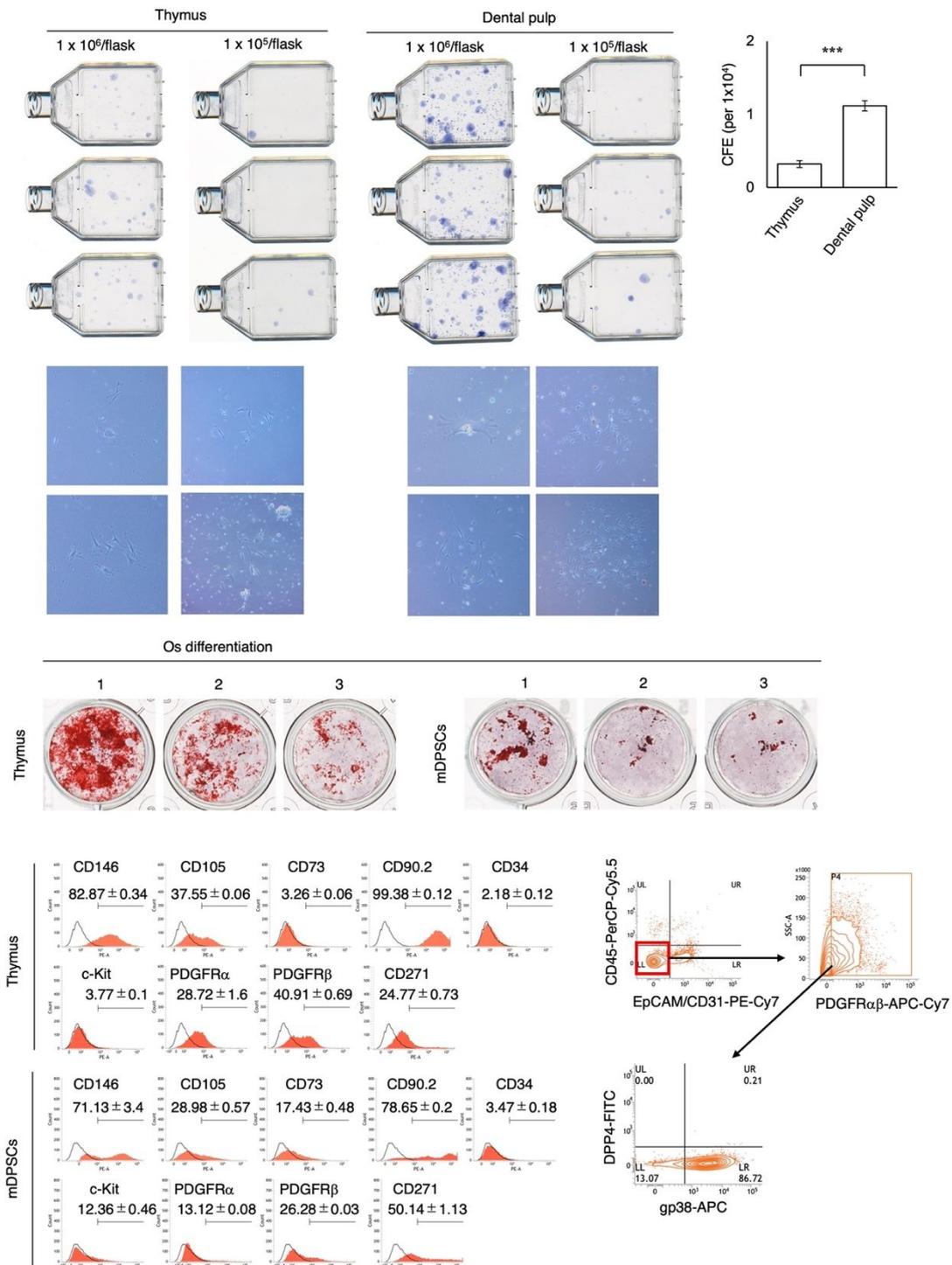


図 2: 胸腺間葉系ストロマ細胞の特性解析

また、単離・培養した胸腺間葉系ストロマ細胞は胸腺髄質間葉系ストロマ細胞の細胞表面抗原特性を示すことが明らかになった。

次に、歯髄幹細胞の移植ならびに歯髄幹細胞による免疫調節メカニズムを解析することに先立って、胸腺間葉系ストロマ細胞の胸腺 T 細胞制御能の解析を行うこととした。

胸腺 T 細胞と単離した胸腺間葉系ストロマ細胞の共培養試験を行うと、非接触型共培養では胸腺 T

細胞の免疫表現型に変化は認められなかったが、接触型共培養において CD4 シングルポジティブ細胞から CD4⁺ CD25⁺ ポジティブの制御性 T 細胞へ分化したポピュレーションが同定された。CD4⁺ CD25⁺ ポジティブの制御性 T 細胞への分化は特に髄質の胸腺間葉系ストロマ細胞によって誘導されることが示された。

研究開始当初は歯髄幹細胞の免疫調節能に着目し、歯髄幹細胞を補充的に移植することによって、胸腺での制御性 T 細胞誘導を賦活化し、過剰な免疫反応を伴う疾患の新規治療法開発の基盤とすることを想定していた。しかし、上記の共培養試験の結果から、胸腺間葉系ストロマ細胞が制御性 T 細胞誘導能を備えていることが示唆され、胸腺間葉系ストロマ細胞を直接の標的とする治療方法をより効果的な治療方法として想定するに至った。

制御性 T 細胞は免疫自己寛容を司る細胞であり、自己免疫疾患などの免疫の過剰反応を伴う疾患の病因に深く関わっていると考えられている。本研究成果によって、免疫の過剰反応を伴う疾患における、制御性 T 細胞の賦活化を可能とする新たな治療標的として胸腺髄質間葉系ストロマ細胞が有力な候補であることを示すことができた。さらに、胸腺では皮質および髄質のそれぞれに特異的に局在するストロマ細胞によって、部位特異的な刺激によって T 細胞の成熟・分化が促されることが知られている。本研究により、胸腺髄質間葉系ストロマ細胞が制御性 T 細胞の胸腺内における部位依存的な分化を担っていることが示唆された。

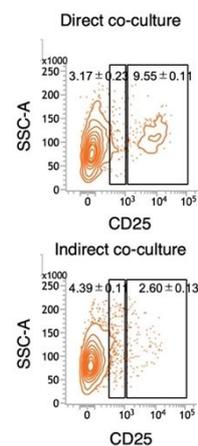


図 3: 共培養試験

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Sonoda Soichiro, Murata Sara, Yamaza Haruyoshi, Yuniartha Ratih, Fujiyoshi Junko, Yoshimaru Koichiro, Matsuura Toshiharu, Oda Yoshinao, Ohga Shouichi, Tajiri Tasturo, Taguchi Tomoaki, Yamaza Takayoshi	4. 巻 66
2. 論文標題 Targeting hepatic oxidative stress rescues bone loss in liver fibrosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Metabolism	6. 最初と最後の頁 101599 ~ 101599
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molmet.2022.101599	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sonoda Soichiro, Yamaza Haruyoshi, Yoshimaru Koichiro, Taguchi Tomoaki, Yamaza Takayoshi	4. 巻 3
2. 論文標題 Protocol to generate xenogeneic-free/serum-free human dental pulp stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 101386 ~ 101386
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2022.101386	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sonoda Soichiro, Yamaza Takayoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Extracellular vesicles rejuvenate the microenvironmental modulating function of recipient tissue-specific mesenchymal stem cells in osteopenia treatment	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1151429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2023.1151429	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sonoda Soichiro, Yoshimaru Koichiro, Yamaza Haruyoshi, Yuniartha Ratih, Matsuura Toshiharu, Yamauchi-Tomoda Erika, Murata Sara, Nishida Kento, Oda Yoshinao, Ohga Shouichi, Tajiri Tasturo, Taguchi Tomoaki, Yamaza Takayoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Biliary atresia-specific deciduous pulp stem cells feature biliary deficiency	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13287-021-02652-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Sonoda Soichiro, Murata Sara, Kato Hiroki, Zakaria Fouad, Kyumoto-Nakamura Yukari, Uehara Norihisa, Yamaza Haruyoshi, Kukita Toshio, Yamaza Takayoshi	4. 巻 206
2. 論文標題 Targeting of Deciduous Tooth Pulp Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles on Telomerase-Mediated Stem Cell Niche and Immune Regulation in Systemic Lupus Erythematosus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 3053 ~ 3063
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2001312	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sonoda Soichiro, Yamaza Takayoshi	4. 巻 23
2. 論文標題 A New Target of Dental Pulp-Derived Stem Cell-Based Therapy on Recipient Bone Marrow Niche in Systemic Lupus Erythematosus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3479 ~ 3479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23073479	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Zakaria MHD, Fouad, Sonoda Soichiro, Kato Hiroki, Ma Lan, Uehara Norihisa, Kyumoto-Nakamura Yukari, Sharifa M. Majd, Yu Liting, Dai Lisha, Yamauchi-Tomoda Erika, Aijima Reona, Yamaza Haruyoshi, Nishimura Fusanori, Yamaza Takayoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Erythropoietin receptor signal is crucial for periodontal ligament stem cell-based tissue reconstruction in periodontal disease	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-024-57361-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 園田 聡一郎, 山座 孝義
2. 発表標題 乳歯幹細胞の細胞外小胞を介した全身性エリテマトーデスの新規治療メカニズムの解明
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 園田 聡一郎, 山座 孝義
2. 発表標題 乳歯幹細胞の細胞外小胞による宿主間葉系幹細胞を標的とした全身性エリテマトーデス治療メカニズムの解明
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 園田 聡一郎、久本 由香里、加藤 大樹、上 原 範久、山座 孝義
2. 発表標題 胸腺間葉系ストロマ細胞による内在性制御性T細胞の産生メカニズムの解明
3. 学会等名 歯科基礎医学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関