

令和元年6月25日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10858

研究課題名(和文) M2マクロファージの骨再生作用の検討

研究課題名(英文) Study of bone regeneration of M2macrophage

研究代表者

岡本 美奈 (OKAMOTO, MINA)

大阪大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50457008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：骨形成や骨修復過程において機能の異なるM1/M2マクロファージの分極バランスが重要であることが知られている。本研究では、M1/M2マクロファージと骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)の相互作用およびIL17Aが与える影響について検討を行った。その結果、IL17AやMSC産生サイトカインはマクロファージをM1型からM2型へ転換させた。一方、MSCの骨分化能はIL17Aやマクロファージにより抑制された。M2型は破骨細胞形成能を有する可能性があり、骨修復過程における炎症、抗炎症過程では、各種マクロファージやMSC、免疫細胞産生因子が相互に機能し、総合的に骨リモデリングを調節している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国における急速な高齢化に伴い、骨粗鬆症による骨折の増加や糖尿病の合併症による骨折リスクの増加への対応は臨床の現場でも課題となっている。骨再生や骨修復における骨免疫の調節メカニズムの解明は創薬や再生医療への応用につながる。

骨免疫を担うM1/M2マクロファージはそれぞれ拮抗する機能を持ち、骨折治癒過程での微小環境においてはM1/M2バランスが重要であることが知られているが、その詳細な働きについて未だ報告は少ない。本研究において、M1/M2型の分極化や骨再生を担うMSC、骨修復に関連する免疫細胞産生因子が相互に作用する可能性を見出したことは、骨免疫調節メカニズムの解明につながると考える。

研究成果の概要(英文)：The polarity balance of M1 / M2 macrophages with different functional roles is known to be important in bone regeneration or bone repair processes. In this study, we analyzed the interaction between M1 / M2 macrophages and mouse bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) under conditions of IL17A stimulation. As a result, IL17A and cytokines produced by MSCs transferred M1 type differentiation to M2 type. The osteoblastic differentiation ability of MSCs was suppressed by co-culture with macrophages and IL17A stimulation. Furthermore, M2 macrophages showed the ability to differentiate into osteoclasts. These results suggested that MSCs, macrophages and cytokines secreted from immune cells interact with one another, which collectively regulates total bone regeneration.

研究分野：骨代謝

キーワード：M1/M2型マクロファージ マウス由来間葉系幹細胞 骨代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨折治癒の促進や骨再生の免疫細胞であるマクロファージは、機能の異なる炎症型 (M1) および抗炎症型 (M2) に分類され、微小環境の変化によって形質を変化させながら炎症や疾患を調節することが知られている。M1 型は Th1 サイトカイン (IFN や LPS) により古典的活性化を受け、細菌やウイルスに対して炎症応答を惹起し、感染防御の働きを示す一方で、M2 型は Th2 サイトカイン (IL4, IL10, IL13) による選択的活性化を受け、アレルギー応答や腫瘍転移、血管新生などに関与することから、様々な病態において M1/M2 型の機能について研究が進められている。組織内の微小環境の変化に伴い、M1 型から M2 型へ機能変化することが知られており、M1/M2 のバランスが組織における炎症の誘発や炎症抑制作用に重要であることが報告されている。間葉系幹細胞はマクロファージの M1/M2 バランスを調節するという報告があるが、その関連性についての詳細な報告は少ない。骨組織の創傷治癒過程においても、M1/M2 型マクロファージが関与することが知られているが、それぞれの明確な働きについては明らかにされていない。免疫細胞の一種である T 細胞は主に感染制御に関わるとされており、骨折部位では IL17 を産生し、骨形成への関与が示唆されている。IL17 はヘルパー T 細胞や自然リンパ球などからも産生され、マクロファージに作用することで炎症性サイトカインやケモカインなど種々の因子を誘導することにより、炎症を誘引する。骨分化誘導において、IL17 はヒト由来 MSC の増殖や骨分化能を促進することが報告されている一方で、ラット calvaria の骨分化においては骨形成能を抑制することが報告されており、その働きは明らかでない。また、M1 型は TNF や IL-6 などの炎症性サイトカインの産生によって破骨細胞を誘導し、炎症を惹起する。マウス炎症性関節炎モデルでは、M1/M2 型細胞表面マーカーを有する破骨細胞前駆細胞の細胞集団が存在し増殖することが知られているが、M1/M2 型マクロファージの活性化によって誘導される破骨細胞形成がどのように制御されているかは明らかにされていない。

2. 研究の目的

骨形成や骨修復過程において、骨形成に関与する間葉系幹細胞 (MSC) や骨免疫を担う M1/M2 マクロファージ、免疫細胞が産生するサイトカインが重要な役割を果たす。本研究では、M1/M2 マクロファージの分極化や MSC の骨分化誘導過程における相互作用の解明を試みた。また、これまで、骨形成への関与が示唆されている IL17A が MSC の骨分化の調節作用について相反する報告が散見されることから、マウス骨髄細胞から樹立した MSC を用いて、IL17A の骨分化に及ぼす影響について検討を行った。さらに、M1/M2 型に分極化したマクロファージにおける破骨細胞形成能についても調べた。

3. 研究の方法

(1) マウス骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) の樹立

C57BL/6J オスマウス (7W) の大腿骨より骨髄細胞を単離し、70 μ m フィルターメッシュを通して組織や細胞塊を除去後、10 cm 培養ディッシュに播種し、10% FBS 含有 DMEM で培養した。非接着性の細胞を除去するため、3 時間後に新しい培地に交換し、以降培養 3 日まで毎日培地交換を行った。約 1 週間後に接着した細胞に増殖が認められるようになり、約 2 週間後には血球系細胞や線維芽様細胞などヘテロな集団が生じた。この段階で継代を行うため、0.25% trypsin/EDTA で 2 分間処理後、剥離した細胞のみを回収して新しい培養ディッシュに播種し、2-3 日ごとに培地交換を行った。P2 の MSC 細胞で FACS 解析を行った。

(2) M1/M2 マクロファージの誘導と MSC の骨分化誘導、IL17A 刺激による各分化マーカー遺伝子発現の検討

単離した骨髄細胞をマクロファージコロニー刺激因子 M-CSF (30ng/mL) を添加した 10% FBS 含有 DMEM で約 1 週間培養を行うと、マクロファージ (M0) が得られる。この M0 マクロファージを LPS (100ng/mL) と IFN (20ng/mL) 存在下で培養することで M1 マクロファージに、IL4 (20ng/mL) と IL13 (20ng/mL) 存在下で培養することにより M2 マクロファージを誘導した。IL17A 刺激時には、分化培地に IL17A (10ng/mL) を添加した。分化培養 6 時間と 48 時間後に mRNA を抽出し、Real Time RT-PCR 法を用いて各分化マーカー遺伝子 (M1 型: IL1, IL6, iNOS, Tnf, MCP-1、M2 型: Arg1, CD206, Fizz1, Ym1) の発現について解析を行った。FACS 解析には分化 24 時間後の細胞を用いた。

また MSC は、Ascorbic acid (50ng/mL), glycerophosphate (10mM), Dexamethasone (10^{-7} M) 存在下で培養することで骨分化を誘導した。骨分化誘導培地に IL17A (10ng/mL) を添加し、IL17A 存在下、非存在下で 21 日間培養後に ArizarinredS 染色を行い、石灰化能について検討を行った。

(3) M1/M2 マクロファージと MSC の分化誘導と間接共培養

M1/M2 の分極に及ぼす MSC の影響を調べるため、セルカルチャーインサートを用いて間接共培養を行った。6well プレートの底面に M0 型マクロファージ (5×10^5 cells/well) を播種し、

細胞接着を確認後、MSC (2×10^5 cells/well) をインサートに播種した。各分化誘導培地で培養することで、それぞれ M1 型、M2 型に分極化させた。6 時間および 48 時間後にマクロファージから RNA を抽出し、Real Time RT-PCR 法で M1, M2 型マクロファージの分化マーカー遺伝子の発現を解析した。

また、MSC の骨分化能におけるマクロファージの作用を調べるため、セルカルチャーインサートを用いて 6well プレートの底面に MSC (2×10^5 cells/well) を、インサートには別の培養ディッシュで分化させた各型 (M0, M1, M2) マクロファージを 5×10^5 cells/well の濃度でそれぞれ播種し培養を行った。6 時間および 48 時間後に RNA を抽出し、Real Time RT-PCR 法で骨分化マーカー遺伝子 (Alp, Bsp, Collagen, Osteocalcin) 発現を解析した。

(4) M1/M2 マクロファージにおける破骨細胞形成能についての検討

M0/M1/M2 型に分極化させたマクロファージを Rank1 ($0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$) および M-CSF ($10 \text{ng}/\text{mL}$) 刺激下で 5 日間培養し、培養破骨細胞を形成させた。培養破骨細胞は TRAP 染色を行い評価した。

4. 研究成果

(1) MSC の樹立

FACS 解析の結果、CD34⁻/CD29⁺/CD105⁺ の細胞集団であった。また、骨分化誘導培地で 3 週間培養を行い、AlizarinredS 染色を行ったところ石灰化を認めた。

(2) M1/M2 分極化と MSC との相互作用

M0 型マクロファージから M1 型と M2 型に分極化させ、特性解析を行った。Real Time PCR 法により、各遺伝子マーカー発現を調べたところ、M1 型では、Tnf, IL6, IL1, iNOS の発現が、M2 型では、Arg1, Ym1, Fizz1, CD206 の発現が有意に上昇することを確認した (図 1, 2)。FACS 解析により、M1 型は CD11b⁺ F4/80⁺、M2 型は CD206⁺ F4/80⁺ の細胞集団であることを確認した。

マクロファージの分化において MSC と共培養を行った結果、M1 型マーカー IL1, IL6, TNF の遺伝子発現は有意に抑制された (図 1)。一方で、M2 マーカー Arg1, Ym1, Fizz1 遺伝子の発現は有意に上昇し、IL17A の添加により Arg と Ym1 の発現についてはさらに増強が認められた (図 2)。

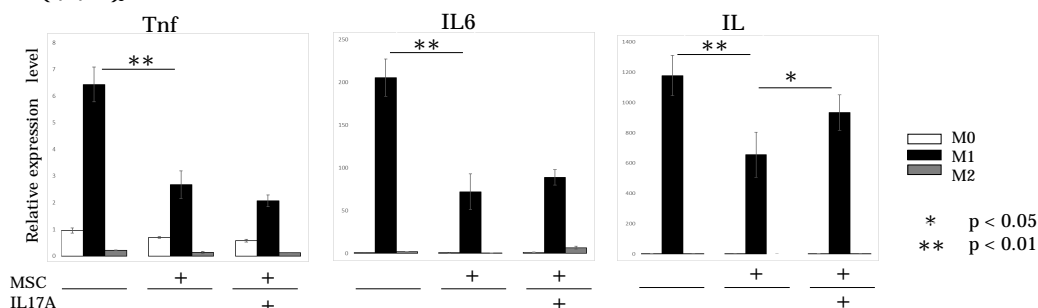


図 1 M1 型分化誘導時における MSC との共培養 (M1 遺伝子マーカーの発現)

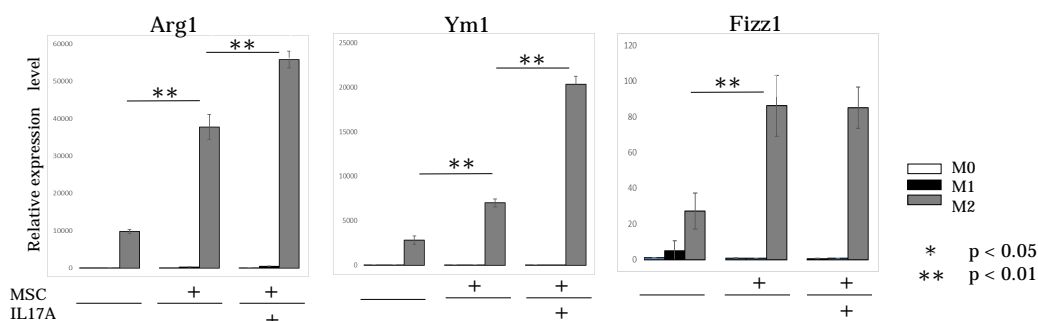


図 2 M2 型分化誘導時における MSC との共培養 (M2 遺伝子マーカーの発現)

(3) マクロファージの分極における IL17A と MSC の作用

マクロファージの M1/M2 型への分極化において IL17A を添加した結果、M1 型マーカーである Tnf, IL6, iNOS の発現は低下し、M2 型マーカーである Arg1, Ym1, CD206, Fizz1 の発現は有意に上昇が認められた。また、この M1 型から M2 型への転換は MSC との共培養により、促進された (図 3, 4)。

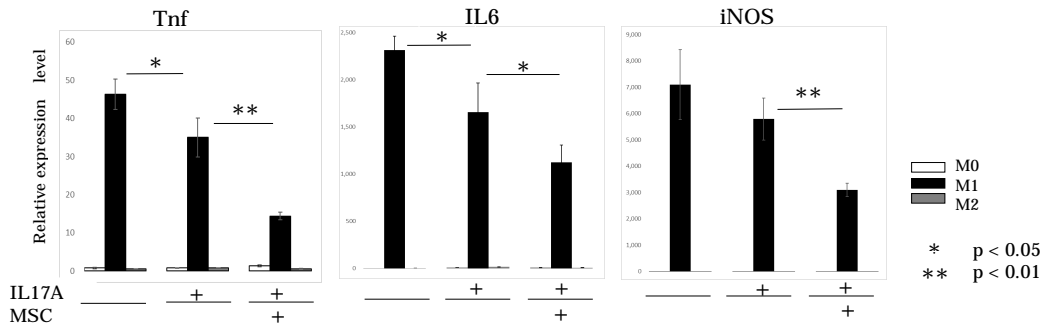


図3 M1型分化誘導時におけるIL17Aの作用 (M1遺伝子マーカーの発現)

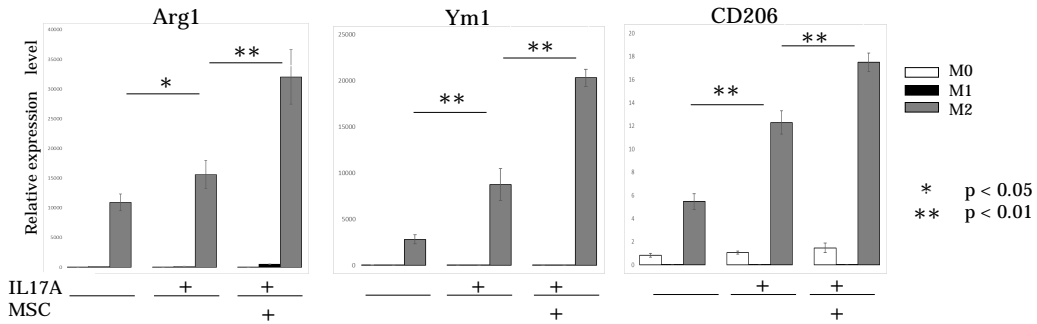


図4 M2型分化誘導時におけるIL17Aの作用 (M2遺伝子マーカーの発現)

また、マクロファージの遊走に重要な役割を果たすケモカイン MCP-1 は、主に M1 型において発現が高いとされており、本研究においても M1 型分化後に発現上昇が認められた。しかし、IL17A 刺激下で培養したところ、M1 型で発現が抑制され、M2 型において上昇した。さらに、IL17A 刺激のもと、MSC との共培養をおこなったところ、M1 型ではさらに発現は抑制され、M2 型において上昇が認められた (図5)

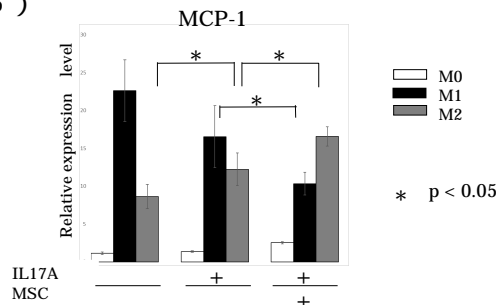


図5 M1/M2分極化におけるIL17Aの作用

(4) MSCの骨分化誘導過程におけるIL17Aおよびマクロファージの作用

MSCを骨分化培地で培養すると、骨分化前期マーカーであるAlpとCollagen、比較的後期のマーカーであるBspとOsteocalcinの遺伝子発現が上昇したが、IL17A刺激下で培養すると、いずれの遺伝子発現も有意に抑制された(図6)。IL17Aが骨分化誘導を抑制するという結果は、AlizarinredS染色において石灰化能が抑制されていることから明らかであった(図7)。

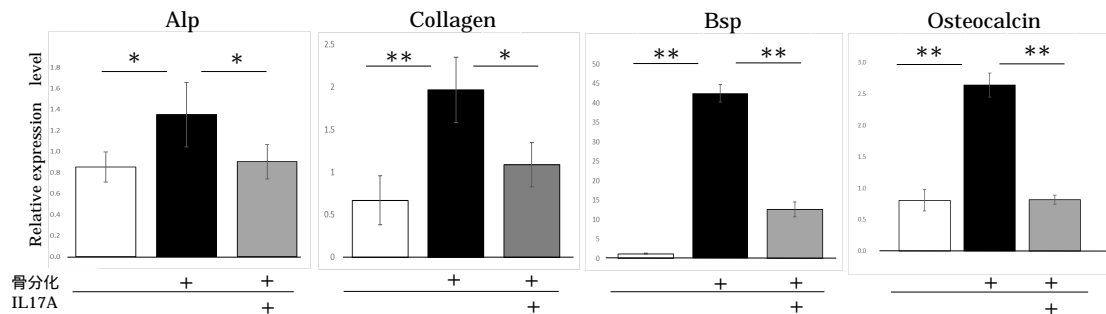


図6 骨分化誘導時におけるIL17Aの作用 (骨分化遺伝子マーカーの発現) * p < 0.05 ** p < 0.01

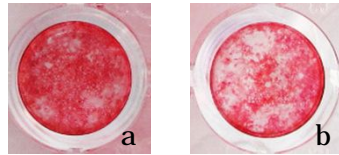


図7 Alizarinred S染色 (a: 骨分化誘導 b: IL17A添加培地で骨分化誘導)

また、MSCの骨分化誘導過程においてマクロファージと共培養を行ったところ、Alp, Collagen, Bsp, Osteocalcinのいずれの骨分化マーカー遺伝子の発現量は抑制された。(図8)

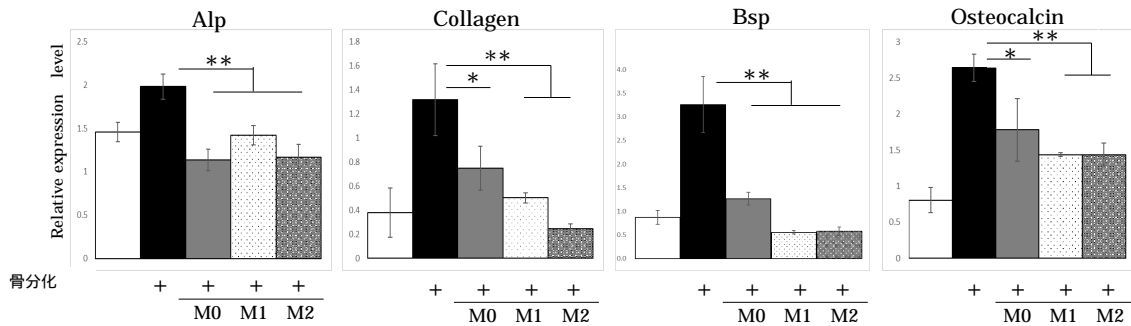


図8 骨分化誘導時におけるマクロファージとの共培養 (骨分化遺伝子マーカーの発現)

* p < 0.05
** p < 0.01

(5) M1/M2 マクロファージの破骨細胞形成能

M1/M2型に分化させたマクロファージの破骨細胞形成能を調べた。M1/M2マクロファージをM-CSFとRank1刺激下で培養破骨細胞を誘導させた結果、M1型では破骨細胞は形成されなかったが、M2型ではTRAP陽性細胞が観察された(図9)

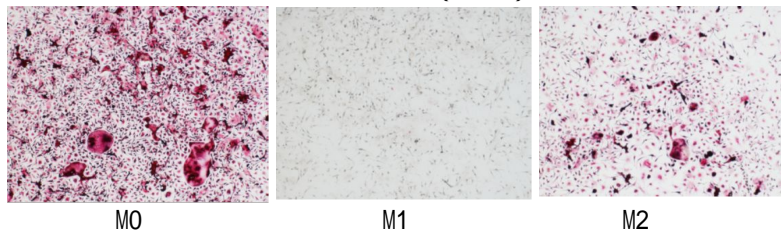


図9 TRAP染色

以上の結果より、MSCやIL17AはM1型マクロファージの分化に対して抑制的に作用し、M2型マクロファージに対しては促進的に作用することが明らかになった。一方で、マクロファージはMSCの骨形成を抑制した。MSCやIL17AはM2型マクロファージの遊走を促し、炎症型から抗炎症型的作用を誘導している可能性がある。また、M2型に破骨細胞形成能を認めたことから、骨形成や骨修復の微小環境において、MSCやマクロファージは密接な関係にあり、互いに作用することで組織の炎症や抗炎症のバランスを制御する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

1. Moriguchi Y, Lee DS, Yoshikawa H, Hamaguchi S, Myoui A, et al. Impact of non-thermal plasma surface modification on porous calcium hydroxyapatite ceramics for bone regeneration. PLoS One. 2018 Mar 14;13(3):e0194303. (査読有) doi: 10.1371/journal.pone.0194303.
2. Yasui Y, Hart DA, Myoui A, Yoshikawa H, Nakamura N, et al. Time-Dependent Recovery of Human Synovial Membrane Mesenchymal Stem Cell Function After High-Dose Steroid Therapy: Case Report and Laboratory Study. Am J Sports Med. 2018 Mar;46(3):695-701. (査読有) doi: 10.1177/0363546517741307. Epub 2017 Dec 11.

3. Kanayama S, Kaito T, Myoui A, Yoshikawa H et al. ONO-1301 Enhances in vitro Osteoblast Differentiation and in vivo Bone Formation Induced by Bone Morphogenetic Protein. Spine (Phila Pa 1976). 2018 Jun 1;43(11):E616-E624. (査読有) doi: 10.1097/BRS.0000000000002439.
4. Yamada S, Imura Y, Myoui A, Yoshikawa H, Naka N, et al. Therapeutic potential of TAS-115 via c-MET and PDGFR α signal inhibition for synovial sarcoma. BMC Cancer. 2017 May 16;17(1):334. (査読有) doi: 10.1186/s12885-017-3324-3.

〔学会発表〕(計 68 件)

1. Myoui A. Current Status in Research and Development of Artificial Bone and Its Functionalization. Interdisciplinary Symposium for Up-and-coming Materials Scientists (ISUMS) 2017. Jun 8-9, 2017. Toyonaka, Japan.
2. Myoui A. Artificial bone substitute in benign bone tumor surgery. The 19th International Society of Limb Salvage General Meeting. May 12, 2017. Kanazawa, Japan.
3. 宮本 諭, 吉田清志, 岡本美奈, 吉川秀樹, 名井 陽. マウス iPS 細胞由来骨芽細胞系前駆細胞の骨形成能. 第 18 回日本再生医療学会総会. 2019.3. 神戸市.
4. 名井 陽, 吉川秀樹. 人工骨と骨再生 研究と実用化の動向. 第 40 回日本バイオマテリアル学会大会. 2018.11. 神戸市
5. 岡本美奈, 吉川秀樹, 名井 陽 他. ヒト滑膜由来間葉系幹細胞バンクの運用と新たなバンク細胞ソース確立に向けた取り組み. ARO 協議会第 6 回学術集会. 2018.8. 福岡市
6. 岡本美奈, 吉川秀樹, 名井 陽 他. ヒト滑膜由来間葉系幹細胞バンクの運用状況と今後の展望. ARO 協議会第 5 回学術集会. 2017.9, 名古屋市.
7. 宮本 諭, 吉田 清志, 吉川 秀樹, 名井 陽. 多能性幹細胞から分化誘導した骨芽細胞系細胞は、高い骨形成能を有し、Semaphorin および Hox 遺伝子を発現する. 第 34 回日本骨代謝学会学術集会. プログラム抄録集. 34: 192, 2016.07. 大阪市.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：名井 陽

ローマ字氏名：MYOUI,Akira

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学部附属病院

職名：准教授

研究者番号(8桁)：10263261

研究分担者氏名：吉川 秀樹

ローマ字氏名：Yoshikawa,Hideki

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：60191558

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。成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。