

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20560

研究課題名(和文) 幹細胞の免疫寛容を利用した同種脂肪由来幹細胞による骨組織再生法の基礎的研究

研究課題名(英文) Fundamental study on bone regeneration by allogeneic adipose-derived stem cells utilizing immunotolerance of stem cells

研究代表者

高橋 直子 (Takahashi, Naoko)

東京大学・医学部附属病院・病院診療医

研究者番号：10569635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ASCの免疫寛容に関与する因子を同定、評価をおこなったが、FACSで分離したASCはヘテロな細胞集団のため、免疫寛容に関与する細胞の同定を次世代シーケンサーを用いて検証した。その結果、ASCには、遺伝学的類似性から10の集団が存在することを確認し、網羅的な遺伝子解析により、ある細胞集団Xにおいて、免疫応答に関与する遺伝子群の発現上昇を認めた。この集団XをCD3+T細胞とLPS添加培地で共培養したところ、CD3+T細胞のTreg分化が有意に増加することを認め、さらに集団XとCD3+T細胞間に存在するシグナルをRNA-Seqにより検証をおこなったところ、免疫応答に関与する候補因子を確認した。

研究成果の概要(英文)：We examined the factors associated in immune tolerance by cytokine assay. However, ASC isolated by FACS was remained an issue, as these cells were heterogeneity cell population. Therefore, we verified whether there are cells involved in immune tolerance in the population using single cell RNA-Seq. As a result, ASC isolated by the conventionally method revealed that were consists of ten populations from genetic similarity. Furthermore, through global gene analysis, expression of a genes related in an immune tolerance were upregulated in a specific cell population X. When this cell population was co-cultured with CD3-positive T cells in LPS-supplemented medium, we confirmed differentiation of CD3 positive T cells to CD4/25/Foxp3 positive Treg was significantly increased. In addition, the signal existing between population X and CD3 positive T cells was analyzed by RNA-Seq. As a result, we identified candidate factors associated in the immune tolerance.

研究分野：再生医療

キーワード：脂肪由来間葉系幹細胞 免疫寛容 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

従来、口腔外科領域における先天異常、外傷、外科手術にともなう骨を含む組織欠損に対して、セラミックや金属プレートなどの人工材料、骨細胞や海綿骨細片 (PCBM) などの自己由来細胞・組織などが治療に用いられてきた。しかし、これらの材料や組織を用いることによる術者のハンドリングの悪さ、侵襲性、術後感染などが問題となる。また、自己組織から採取できる量はごく少量であることから適応に制限がある。骨髄由来間葉系幹細胞 (BM-MSC) は多能性幹細胞であり、抗炎症作用、治癒促進作用を有することから、BM-MSC を骨欠損に対する治療法として期待されているが、採取に際しての侵襲性や自由度、細胞の特性などの優位性から近年、**脂肪由来幹細胞 (ASC)** が注目されている。また MSC は一般に、免疫抑制作用を有することも示唆されることから、再生医療における組織移植の最終目標である、『**移植片を免疫応答を引き起こさずに機能的に生着、成熟させる**』ことが可能であると考えられる [Gonzalez 2009 Gastroenterology]。MSC の免疫寛容の機構に関して、先行研究によれば、免疫系に関わる病態および疾患の治療において MSC を用いる方法について 1. MSC によって樹枝状細胞 (DC) を刺激することで、腫瘍抑制およびウイルス感染症に対する免疫を促進する IFN- $\gamma$  を産生することができ、2. MSC は、免疫応答の抑制的制御 (免疫寛容) を司る T 細胞の一種である制御性 T 細胞 (Treg 細胞) および/または DC からの IL-10 の放出を発生させることにより、自己免疫性疾患または他の望ましくない免疫反応といった免疫応答を抑制することができるとしている [Pittenger 2013 Nat Med]。この Treg の発生には転写因子である Foxp3 が大きく関与し、Foxp3 が誘導されることにより T 細胞が Treg に分化すると考えられることから [Ohkura 2012 Immunity]、この Foxp3 の恒常的な発現が、Treg による免疫応答の制御に重要な役割を果たすと考えている。また、MSC が Foxp3 の発現を誘導することを鑑みても [Sundin 2011 J Immunol]、移植にともなう免疫応答を抑制するために MSC が重要な要素であることが伺える。しかしながら、通法によって獲得する MSC はヘテロな細胞集団であること、また、採取時の血球系や他の間葉系細胞の混入をともなうため、Foxp3 発現を誘導する TGF- $\beta$  など本来の MSC が分泌する因子の作用が弱く、恒常的に誘導刺激することが難しいのが現状である。その結果として、他家移植では当然ながら、**本来免疫寛容を有するはずの MSC を同種移植したとしても、移植部および周囲に炎症反応を惹起し、あるいは移植片が免疫拒絶により生着できず脱離してしまう**という現象が生じる (図 1)。これは、MSC が純化されていないことで、MSC 以外の細胞が抗原として感作されることに起因すると申請者は考えてい

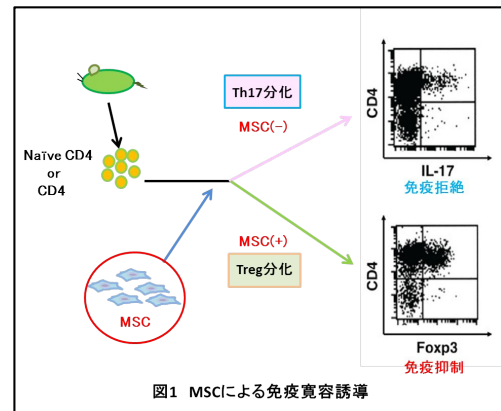


図1 MSCによる免疫寛容誘導

る。したがって、MSC の本来有する機能であろう免疫寛容を検証し、最大限に活用するためには、MSC の純化こそが重要と考えるに至った。

2. 研究の目的

近年、BM-MSC に特異的に発現するマーカーが発見されたことにより、フローサイトメトリーを用いて純化することが可能となっている。CD31 $^{-}$  CD45 $^{-}$  Ter119 $^{-}$  Sca-1 $^{+}$  PDGFR- $\alpha$  $^{+}$  (Pa-S) で分画される BM-MSC は multilineage reconstruction assay において、P-S で分画された細胞の 20 個に 1 個

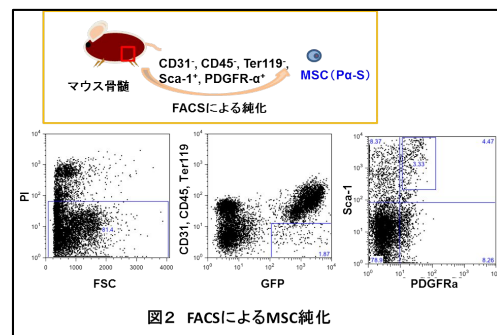


図2 FACSによるMSC純化

が MSC であることから、非常に高い純化度を示すことが分かっている (図 2)。なかでも脂肪組織は、容易に採取でき、また大量の幹細胞が含まれていると示唆されているため [Yoshimura 2006 J Cell Physiol]、ASC は、BM-MSC に代わる新たな再生医療の細胞源として注目を集めている。しかし、通法にて採取した ASC はヘテロな状態であること、採取時に ASC 以外の血球系や他の間葉系細胞の混入も見られることから、ASC を純化する技術の獲得は喫緊の課題である。近頃、P-S が脂肪組織においても骨髄同様に存在することが示唆されているが、詳細な機能解析までには至っていない。したがって、本研究の目的は ASC の純化のための単離法と培養法を確立し、幹細胞が本来有する免疫寛容を検証するとともに、口腔外科領域における再生医療の**新たな移植細胞源**としての ASC の免疫寛容を利用した同種移植へ応用することである。

3. 研究の方法

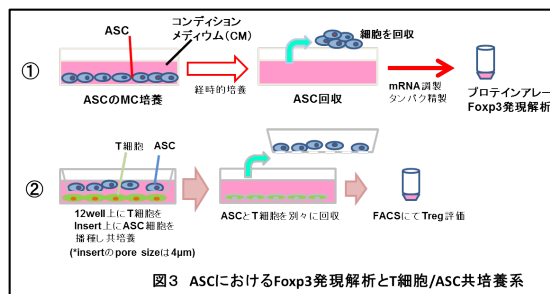
in vitro における ASC の純化・培養法の確立および特性評価

ASC は従来法として、6 週齢の C57BL/6J

マウスの鼠径部より脂肪組織を摘出し、1~2mm 大に細切した後、0.075%コラゲナーゼを含むPBS中で37℃、30分間分解を行う。その後800g、10分間遠心分離を行い、脂肪細胞と線維性組織をペレットから分離した後、ペレットのみを再懸濁する。100 $\mu$ mのフィルターに通したのち、抗体染色を行う。FACS Aria Fusion (BD Bioscience社)にて、CD31、45 陰性、CD34 陽性で分画される集団をASCとして採取し、10% FBS 含有DMEM 培地にて10cm ディッシュに播種する(初代培養、P0)。1週間培養した後、P1で検討に使用する[Yoshimura 2006 J Cell Physiol]。また、新法として、CD31、45、Ter119 陰性、Sca-1、CD140a で分画される細胞集団(Pa-SあるいはASC)を用いる。特性評価は、採取したASC 1.0x10<sup>3</sup>細胞を10cm ディッシュに播種し、10日後のコロニー形成能を評価するCFU-F アッセイ、初代培養(P0)~P8までの細胞増殖率を評価する細胞増殖能、骨、軟骨、脂肪の間葉系3系統誘導培地による分化能を評価することで確認を行う。

#### ASCの恒常的Foxp3発現を維持するin vitro 培養系の確立

ASCの抗炎症、免疫抑制作用のin vitro 検証に関しては、ASCを培養した際の培養上清(コンディショナルメディアム、CM)を6-well plateにRAW264.7細胞8.0x10<sup>5</sup> cells/wellの細胞濃度で播種し、10%FBSを添加したD-MEMで24時間培養し上清を吸引除去しPBSで洗浄する。Control群とLPS刺激群は無血清のMEM-alphaに、CM添加群はCMに培地を入れ替える。続いてLPS 100 ng/mlを添加し24時間後にRAW264.7細胞のmRNAおよびタンパクを抽出する。その後、先行研究にて報告されているASCの分泌する抗炎症作用に關与する因子を[Toyserkani 2015 Ann Plast Surg]を基に、mRNAは定量的RT-PCR法にてタンパクはwestern blottingにて成長因子、炎症性サイトカインおよびケモカイン発現量を検討する。同時に、ASCのFoxp3発現変動を確認し、この発現量の結果から、Foxp3発現が高いレベルで維持され、また抗炎症に強い関与が示唆される因子に關して、因子の発現を抑制するshRNAを用いてloss of functionの系を立ち上げる。これにより、ASCの抗炎症、免疫抑制に實質的に關与する因子を特定するとともに、Foxp3発現を制御していることを検証する。特定因子が細胞外基質であれば、ディッシュに固着化させ、液性因子であれば、リコンビナント蛋白質が存在する場合は、培地に添加することで、ASCにおけるFoxp3発現維持を検証する。リコンビナント蛋白質が存在しない場合は、レンチウイルスベクターに因子を恒常発現するようにASCへ導入することによりASCにおけるFoxp3発現が維持されることを検証していく。



#### in vitroにおけるASC/T細胞共培養系の確立とTreg分化の検証

T細胞には、ASCとの識別とASCとの共培養の後にT細胞を速やかに除去できるように緑色蛍光GFPで標識されたマウス(グリーンマウス)を用いる。T細胞単離方法としては、8-10週齢マウス末梢血より採取した血液を遠心分離して血漿成分を除去し、その後蒸留水を加え赤血球を浸透圧破壊、したのち、FACS(BD社製Aria Fusion、現有)を用いてT細胞マーカーCD4陽性、GFP陽性の細胞を選別し、T細胞維持培地にて培養する。ASCは項で用いた従来法、および新法にて採取する。共培養は、トランスウェル付き12ウェルプレート底面にGFP陽性T細胞1x10<sup>3</sup>細胞、トランスウェル上にASC 1x10<sup>3-4</sup>細胞を、項で使用したRAW264.7細胞のみを培養した培地のみを用いて培養を行う。共培養期間を1、2、4、6日間と設定し、培養後ASCとT細胞を回収する。回収した細胞のmRNAを回収し、遺伝子解析を行う。また、回収したT細胞をFACSにてCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45R<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup>で標識されるTregを評価する。対照にはT細胞単独で培養したものを、比較検討する(図3)。

#### ASC中に存在する免疫抑制に關与する分画の同定および検証

現在用いているマーカー(CD31、45、Ter119(PE-Cy7)、Sca-1(PE)、PDGFR- $\alpha$ (APC))を用いて単離した細胞をASCとしているが、ヘテロな細胞の集合体であることから[Morikawa 2009 J Exp Med]、ASC特性の本質を探るうえでは純度をさらに高める必要がある。この問題を解決する方法として、上記マーカーで分離した細胞を基に、次世代シーケンサー(single cell RNA-Seq)解析をおこなう。これにより、単一細胞あたりの細胞特性評価が可能となり、さらにゲノムの類似性からクラスタリングも可能となる。各クラスタで変化する遺伝子発現パターンを抽出することで、特異性の有無が解析可能となることから、免疫寛容に關与するクラスタを分離し、特性解析をおこなう。

#### 4. 研究成果

脂肪組織由来幹細胞(ASC)は、骨髄由来間葉系幹細胞(BM-MS)に代わる新たな再生医療の細胞源として注目を集めている。しかし、通法にて採取したASCは、採取時にASC以外の血球系や他の間葉系細胞の混入も見られるこ

とから、ASCを純化する技術の獲得は重要である。近頃、ASCの分離マーカーが同定されつつあるが、詳細な機能解析までには至っていない。したがって、ASCの純化法と培養法を確立し、幹細胞が本来有する免疫寛容を検証するとともに、再生医療の新たな移植細胞源としてのASCの有用性評価を本研究の目的として、当年度は、in vitroにおけるASCの純化・培養法の確立および特性評価を実施した。具体的には、マウス鼠径部脂肪組織より間葉系細胞を本法により分離したのち、同細胞集団を抗CD31, 34, 45, 90, 105, 146抗体にて染色をおこなったのち、FACSを用いてソーティングし、CFU-Fアッセイ、細胞増殖試験、多能性評価をおこない、これら細胞がBM-MSCと同程度に幹細胞特性を有していることを確認した。また、これらの細胞を用いてASCの恒常的Foxp3発現を維持するin vitro 培養系の確立を目的として、まず初めに、ASCが免疫抑制作用を有することを検証した。方法として、培養ASCにマウス脾臓からFACSを用いて、CD3およびCD3/4陽性で分画されるT細胞を単離したのち、共培養をおこない、T細胞をCD8陽性に分化促進させる試薬コンカナバリンAを添加したときのT細胞変化を検証した。その結果、ASCはCD8陽性分画への分化を抑制させることが確認されたため、ASCの免疫寛容効果を示唆した。

ASCはMSC同様、免疫応答の抑制的制御（免疫寛容）を司るT細胞の一種である制御性T細胞（Treg細胞）を発生させることにより、免疫応答の制御に重要な役割を果たすと考えている。MSCはまたFoxp3の発現を誘導することを鑑みても、ASCも同様に免疫応答を抑制する重要な要素であることが伺える。したがって、ASCの本来有する機能であろう免疫寛容を検討し、サイトカインアッセイをにより検出されたいくつかの因子に着眼し、検証をおこなったが、影響は個体差が大きく選定因子の効果は免疫抑制の本質でないことが推測された。また、純化したASCは継代培養により、早期に増殖、分化能の低下を生じることが判明したため、分離直後の細胞確保が急務となった。これまで、使用してきた分離マーカーでは、ヘテロな細胞集団をASCとしていたため、集団内に存在する特性を有する細胞の同定をsingle cell RNA-Seqを用いて検証した。その結果、当初使用していたASC細胞集団には、遺伝学的類似性を示す細胞群が10集団存在することが判明し、網羅的な遺伝子解析により、ある細胞集団Xにおいて、免疫応答に関する遺伝子群の発現上昇を認めた。また、この細胞を増殖能、多分化能評価したところ、MSCと同等～以上の能力を有することを確認したことから、脾細胞由来CD3陽性T細胞との共培養をLPS添加、非添加群で検討をおこなった。その結果、LPS添加群共培養によりCD3陽性T細胞のCD4, 25陽性Foxp3陽性Tregの発生を有意に増加させることがわかった。この結果を踏まえ、集団XとCD3陽性T細胞間に存在するシ

グナルをRNA-Seqにより解析をおこなったところ、共培養により免疫応答に關与する因子のいくつかで発現上昇を認めたことから、現在さらなる検証をおこなっている。

#### 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 1 件)

1. 上床喜和子, 須佐美隆史, 井口隆人, 大久保和美, 岡安麻里, 内野夏子, 高橋直子, 松林幸枝, 安部雅修, 未永英之, 森良之, 高戸毅: 尖端巨大症による下顎前突症に顎矯正手術を行った2例 日本顎変形症学会雑誌, 査読有, 第26巻, 第1号, 2016, 26-36.

〔学会発表〕(計 7 件)

<国内学会>

1. 松林幸枝, 須佐美隆史, 大久保和美, 井口隆人, 岡安麻里, 内野夏子, 高橋直子, 上床喜和子, 阿部雅修, 安部貴大, 森良之, 高戸毅: 顎関節強直症による小下顎症の1例. 第76回日本矯正歯科学会大会 2017年10月18-20日 口イトン札幌, 札幌市教育文化会館, 北海道
2. 上床喜和子, 須佐美隆史, 市ノ川義美, 兼古晃輔, 大久保和美, 井口隆人, 岡安麻里, 内野夏子, 高橋直子, 松林幸枝, 高戸毅: 矯正歯科治療・顎矯正手術を行ったOpitz症候群の1例. 第27回日本顎変形症学会総会・学術大会 2017年6月15-16日 東京ビッグサイトTFTホール, 東京
3. 岡安麻里, 須佐美隆史, 西條英人, 大久保和美, 井口隆人, 内野夏子, 高橋直子, 上床喜和子, 松林幸枝, 杉山円, 星和人, 高戸毅: 乳歯列期における顎裂部骨移植後の上顎前歯部の矯正歯科治療. 第41回日本口蓋裂学会総会・学術集会 2017年5月18-19日 ホテルオークラ東京, 東京
4. 内野夏子, 須佐美隆史, 井口隆人, 岡安麻里, 大久保和美, 上床喜和子, 高橋直子, 松林幸枝, 高戸毅: 頭蓋顔面先天異常患者における平均顎顔面形態3Dモデル作成法の開発 第75回日本矯正歯科学会大会 2016年11月7-9日 アスティとくしま, 徳島県
5. 内野夏子, 須佐美隆史, 大久保和美, 井口隆人, 岡安麻里, 上床喜和子, 高橋直子, 松林幸枝, 高橋路子, 平野友紀子, 杉山円, 菅野勇樹, 西條英人, 星和人, 高戸毅: 口蓋裂を伴うTreacher Collins症候群 上下顎移動術に先立ちSARMEを施行した2例 第40回日本口蓋裂学会総会 2016年5月26-27日 ナレッジキャピタル コングレコンベンションセンター, 大阪府

<国際学会>

1. Inokuchi T, Susami T, Saijyoh H, Ohkubo K, Okayasu M, Uchino N, Uwatoko K, Matsubayashi Y, **Takahashi N**, Takato T. : Relation between the palatal morphology and the maxillary growth in patients with unilateral cleft lip and palate. 13th International Congress on Cleft Lip/Palate and Related Craniofacial Anomalies, Feb 8 -11, 2017, Chennai, India, Mahabalipuram
2. Susami T, Ohkubo K, Inokuchi T, Okayasu M, Uchino N, Uwatoko K, **Takahashi N**, Matsubayashi Y, Takato T. :Evaluation of the long-term outcomes: An important role of orthodontists in the team care for craniofacial anomalies. Asian Pacific Craniofacial Association , December 1-3, 2016, Nara, Japan, Nara Centennial Hall

〔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

高橋 直子 ( TAKAHASHI, Naoko )  
東京大学・医学部附属病院・病院診療医  
研究者番号：10569635

(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

高戸 毅 (TAKATO, Tshuyoshi)

星 和人 (HOSHI, Kazuto)

金澤 三四朗 (KANAZAWA, Sanshiro)

宇都 さくら (UTO, Sakura)