

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18491

研究課題名(和文) IL1bによる滑膜間葉系幹細胞の増殖の分子メカニズムの解析

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell proliferation by IL1b

研究代表者

松村 恵津子 (Matsumura, Etsuko)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・非常勤講師

研究者番号：30831854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はIL1bによる間葉系幹細胞(MSC)増殖の分子機序を明らかとすることで、IL1bの効果は血清の存在下でのみ観察されたことから、IL1bは、血清中に存在する他の増殖因子の作用を増強すると考えられた。さらに細胞内Erk1/2のリン酸化を検証したところ、血清刺激により観察されるErk1/2のリン酸化をIL1bが延長させることが明らかとなった。この現象はMSC特異的であった。MSCにおいて観察される遅延型Erk1/2リン酸化の分子機序を明らかとする目的で、IL1受容体の発現解析を行ったところ、MSCでは主に短いアイソフォームが発現していること、細胞質に局在することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間葉系幹細胞(MSC)は、関節軟骨等運動器の再生への応用が期待されている材料である。私たちは、IL1bがMSCの強力な増殖因子であることを示してきた。しかしながら、IL1bは非常に強力な炎症性サイトカインであると同時に軟骨細胞に対して軟骨基質産生抑制、軟骨基質分解酵素の発現増強作用が報告されているため、現在の再生医療に直接応用することは難しいと考えられた。そこで本研究における核心的問いとして、IL1bによるMSC増殖の詳細な分子メカニズムの解析を試みる。その成果は、より効率的かつ安全なMSC培養技術の確立に寄与できると考えている。

研究成果の概要(英文)：IL-1 is a potential growth factor for human mesenchymal stem cells (MSCs) without affecting their multipotentiality. However, surface marker expression analyses indicated that the population of MSCs positive for CD121a/IL-1R1 is quite low although it varied between the individuals. To understand the underlying molecular mechanisms how IL-1 enhances MSC proliferation, we analyzed the intra-cellular signaling pathways activated by IL-1. The effects of IL-1 on the proliferation of MSCs were observed only in the presence of 10% FBS. Western blotting analyses indicated that a truncated (short) form of CD121a/IL-1R1 was expressed in the MSCs and IL-1 enhanced the duration of Erk1/2 phosphorylation only in these cells. Immunocytochemical analyses indicated that the CD121a/IL-1R1 was specifically expressed in the cytosolic fraction of the MSCs. These data suggest a novel signal transduction mechanisms of IL-1 which promotes MSC proliferation in the presence of serum factors.

研究分野：整形外科学

キーワード：間葉系幹細胞 サイトカイン IL1beta 細胞増殖 再生医療

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞(MSC)は、造血幹細胞と同様に生体が有する組織幹細胞で、種々の臓器のホメオスタシスに重要な機能を果たしていると考えられている。生体組織から比較的容易に分取可能で、in vitroにおいて限定された増殖能と骨、軟骨、脂肪細胞への分化能を有するため、骨、軟骨の再生医療への応用が試みられている。当科のこれまでの解析では、膝滑膜組織より分取、培養して得られたMSCは、in vitroにおいて高い軟骨基質産生能を有しており、関節内に移植することで、関節軟骨や半月板の退行変性抑制並びに再生を有意に促進することを示してきた(1, 2, 他17報)。

これらの結果に基づいて、本学では、自家滑膜由来MSCの関節内注射による関節軟骨、半月板の再生のための臨床試験をすでに開始しており、移植後2年で良好な軟骨再生が観察されることを報告してきた(3)。以上の結果は、内在性のMSCの数的増加が関節軟骨の損傷後修復機能を飛躍的に増大させることができることを示している。この考えから、MSCを用いた再生医療を効率的に提供するためには、移植用細胞を安定的に供給することが必須であると考え、患者由来の細胞は増殖性に個人差があるため、十分な移植用細胞の数を常に確保できるとは限らないのが現状である。私が大学院時代に行った先行研究では、IL1b(Interleukin-1-beta)がin vitroにおいてMSCの強力な増殖因子として機能することを示した(4)。この研究成果を踏まえて、本研究課題では、IL1bの持つ強力なMSC増殖促進活性を今後の移植治療における細胞加工品の生成プロセスに応用できるかを検証することを最終的な目標としている。

IL1bは、in vitroにおいてはMSCにとって強力な増殖因子であるが、in vivoでは炎症誘導性サイトカインとしても機能する為、軟骨細胞に対して軟骨基質産生抑制、軟骨基質分解酵素の発現を増強することが報告されている。そのため、現在の細胞移植治療に直接応用することは難しいと考えられた。そこで本研究では、MSCにおけるIL1bの情報伝達経路の詳細な解析を行い、MSCに対する増殖因子としての生理機能と、軟骨変性作用を乖離できるか考察し、IL1bによるアナボリックな作用のみを今後の細胞移植治療に還元することが可能かの検証を試みる。

参考文献

- (1) Ozeki N. et al. *Osteoarthritis Cartilage*. 2016;24(6):1061-70.
- (2) Hatsushika D. et al. *Osteoarthritis Cartilage*. 2014;22(7):941-50.
- (3) Sekiya I. et al. *Clin Orthop Relat Res*. 2015;473(7):2316-26.
- (4) Matsumura E, et al. *Cytotherapy*, 2017; 19: 181-193.

(2) 本研究の目的

本研究では、ヒト膝滑膜由来の間葉系幹細胞を実験材料として用い、IL1bによる細胞増殖並びに炎症性サイトカイン発現誘導の細胞内情報伝達を検証することを主たる目的とする。そのために、

1. IL1b受容体(CD121a)陰性細胞に対するIL1bの細胞増殖活性の測定
2. IL1bによる細胞増殖因子発現解析(タンパク並びにmRNA)
3. IL1b受容体(CD121a)陽性、陰性細胞におけるIL1b添加後の細胞内タンパク活性化(リ

ン酸化)のプロファイリング

の3項目に関して検討を行う。本研究は、IL1bによるMSC増殖の新規分子メカニズムの解析を行うものであり、先行研究は存在しない。

3. 研究の方法

本研究では、ヒト膝滑膜由来初代培養線維芽細胞を用いた。本学倫理委員会の了承と患者の同意のもと、人工膝関節置換術の際に廃棄された膝蓋上囊滑膜をコラゲナーゼ処理することにより得た有核細胞を2次元培養することにより得た線維芽細胞は、in vitroにおいて骨芽細胞様細胞、軟骨細胞様細胞、脂肪細胞様細胞に分化誘導することが出来、かつ、間葉系幹細胞抗原(CD73, 90, 105)の発現が観察される。これら細胞を用いて、表面抗原発現解析(フローサイトメトリー: BD Bioscience FACSVerse)、増殖試験(MTT Assay)、細胞内タンパクの発現解析並びにリン酸化解析(Western Blot)、細胞内タンパクの局在化(Immunocytochemistry)を行った。

4. 研究成果

本研究を開始するにあたって、IL1 β によるMSC増殖の分子メカニズムのアウトラインとなる仮説を立てるための予備的検討を行った。最初に初代滑膜MSCにおけるIL1 β 受容体(CD121a)の発現を、フローサイトメーターを用いて測定したところ、全体の5%程度の細胞にしか発現が観察されなかった。IL1 β 存在下、第4継代まで細胞を維持してもIL1 β 受容体陽性細胞の分画に変動は観察されなかった(図1)。このことは、IL1 β の増殖促進効果はIL1 β がその受容体に結合して生じる直接作用ではないことを示唆している。

次に、血清濃度を0.1%まで減少させた培地を用いて増殖試験を行なったところ、IL1 β による増殖促進作用は観察されなくなった。このことは、IL1 β による増殖促進作用に血清中の共役因子が必要であることを示唆している(図2)。さらにIL1 β の作用は、U0126(MEK阻害剤)により完全に抑えられたことから、血清中に存在する細胞増殖因子がその受容体に結合することによって生

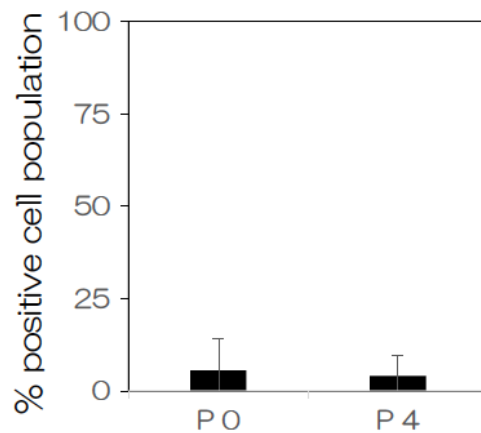


図1 IL1b受容体発現細胞は、全体の5%程度のMSCにしか観察されず、その比率は第4継代(P4)においても変化しなかった。(FACS; n=5)

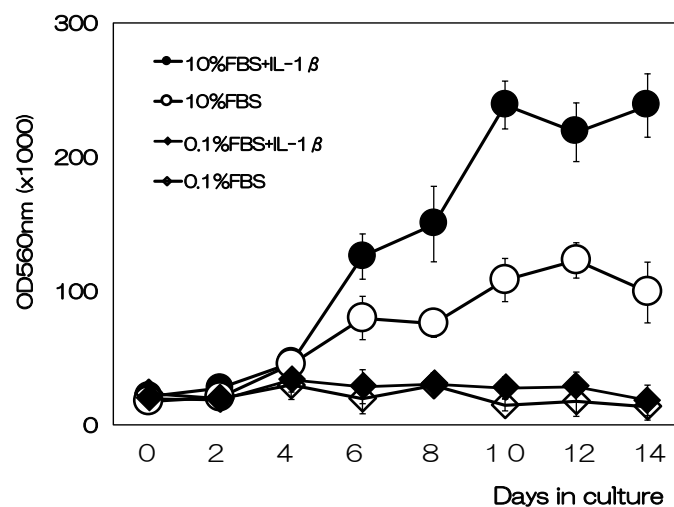


図2. IL1 β は血清存在下、MSCの増殖を促進する細胞増殖は、MTT Assayを用いて計測した (n=6)

じる細胞内 Erk のリン酸化が、IL1 β の作用発現に必須であると考えられた(図3)。そこで、血清並びにIL1 β による細胞内 Erk のリン酸化の継時変化を調べたところ、IL1 β による Erk リン酸化は、血清(増殖因子)刺激よりも遅いタイミングで生じること、すなわち、血清刺激後5分から10分後に生じる Erk のリン酸化がIL1 β 単独刺激では観察されない一方で、20分から30分後に Erk のリン酸化を誘導することが明らかとなった。この現象は血清刺激とは独立して観察されたことから、IL1 β は、血清刺激による細胞増殖の活性化の過程で、Erk のリン酸化状態を延長することにより、増殖共役因子として機能する可能性が示された(図4)。興味深いことに、IL1 β による緩徐な細胞内 Erk のリン酸化は、他の細胞では観察されなかったことから、滑膜 MSC 特異的に存在する細胞内情報伝達の分子機序を介していることが示唆された。

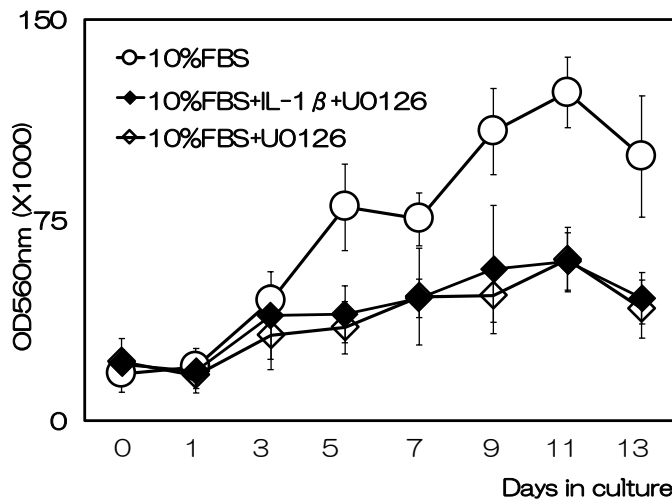


図3. IL1 β による細胞増殖促進効果は、MEK阻害剤(UO126)によって完全に抑制される
細胞増殖は、MTT Assayを用いて計測した (n=6)

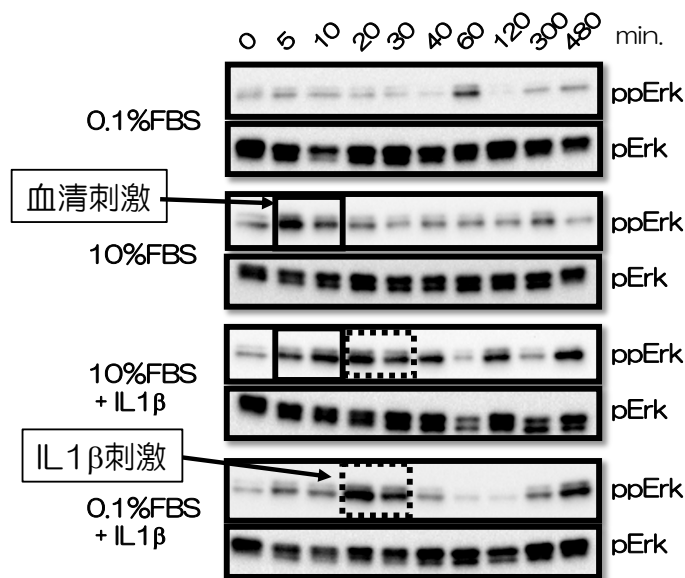


図4. IL1 β は血清刺激により観察されるErkのリン酸化時間を延長する
MSCを0.1%血清培地で24時間培養してから血清±IL1 β (10pM)で刺激した後継時的に細胞内Erkのリン酸化をWestern Blotにて検出した。血清刺激では5~10分でリン酸化が観察されるが、IL1 β 刺激ではその後にErkのリン酸化が誘導される。

滑膜 MSC 特異的な緩徐な細胞内 Erk のリン酸化の分子機序の解析を行う目的で、滑膜 MSC における IL1 β 受容体の発現を Western blot により確認を行ったところ、炎症性細胞で通常確認される約 70kDa ではなく、MSC では約 60kDa の短いアイソフォームが主に発現していることが明らかとなった(図5)。また、この抗体を用いて IL1 β 受容体の細胞内局在を、Immunocytochemistry を用いて検証した結果、滑膜 MSC における IL1 β 受容体の発現は、細胞膜ではなく主に細胞質において観察されることが明らかとなった。

以上のことから、MSC を用いたフローサイトメーターで IL1 β 受容体陽性細胞が観察されなかった理由として、滑膜 MSC では細胞外領域の一部が欠失したアイソフォームが主

に発現しており、かつ、受容体が主に細胞質に局在しているためであると考えられた。また、この受容体発現パターンの違いが、滑膜MSCにおける細胞内Erkのリン酸化の延長をを誘導し、IL1 β が増殖因子として機能する分子機序となっていると考えられた(図6)。

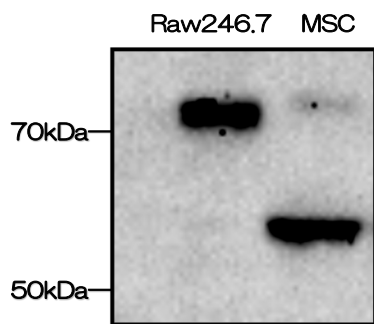


図5. 血液細胞で発現するIL1 β 受容体タンパクの大きさは約70kDaであるが、MSCではそれより短いアイソフォームの発現が優位である。Raw細胞は、ラット由来であるが、Jurkat(ヒトT細胞株)でも70kDa付近にバンドが観察される。

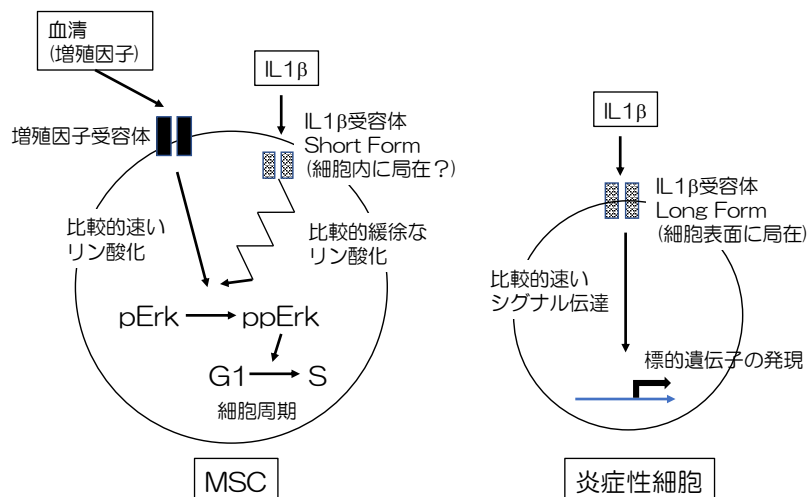


図6. IL1 β によるMSC増殖の分子メカニズムに関する現在の仮説
MSCで発現が観察されるIL1 β 受容体は炎症性細胞とは異なり短いアイソフォームである。この受容体は細胞内で比較的緩徐なリン酸化シグナルを伝達し、増殖因子のシグナルに対して相加的に作用する。これに対し、炎症性細胞では細胞膜表面に存在するIL1 β 受容体が、速やかな細胞応答を誘導する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 唐 果 辻 邦和 小森 啓一郎 関矢 一郎 大川 淳 古賀 英之
2. 発表標題 IL-1 による滑膜由来間葉系幹細胞の増殖活性化の分子メカニズムの解析
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松村恵津子、星野明穂、高橋徹、中村香織、魚水麻里、長谷川翔一、關良太、荻内隆司
2. 発表標題 人工膝関節手術適応患者の年齢と術後成績の変遷
3. 学会等名 日本人工関節学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松村恵津子、星野明穂、高橋徹、中村香織、魚水麻里、長谷川翔一、關良太、荻内隆司
2. 発表標題 人工膝関節手術適応患者の年齢と術後成績の変遷
3. 学会等名 日本整形外科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松村恵津子、林将也、荻内隆司、吉村英哉、高橋徹、中村香織、魚水麻里、星野明穂
2. 発表標題 半月板縫合後の再断裂症例の検討
3. 学会等名 JOSKAS
4. 発表年 2020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
---------	---------