

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K23080

研究課題名(和文) MSCs・M 相互作用による組織再生起点メカニズム解明と組織再生加速技術の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the tissue regeneration initiation mechanism through MSCs and Macrophage interaction and development of tissue regeneration acceleration technology.

研究代表者

田頭 龍二 (Tagashira, Ryuji)

岡山大学・大学病院・医員

研究者番号：20882640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：長管骨損傷モデルでは、損傷部にM1マクロファージ(M1)・間葉系幹細胞(MSCs)が集積しM2マクロファージ(M2)が増加、マイクロCT解析でマクロファージ枯渇群が損傷部の骨再生が遅延したことから、M1・MSCsの集積とM2の増加は組織再生に重要な役割を果たしていると考えられた。MSCs共培養によりM1の活性化指標のサイトカイン産生が減少、MSCsの活性化指標のサイトカイン産生が増大、M2形質転換因子の産生も増大しており創傷治癒においてM1がサイトカインを産生しMSCsを損傷部に集積させ、次いでMSCsが炎症を制御するとともにM1をM2に形質転換させ組織再生を促すことが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間葉系幹細胞(MSCs)は、その多分化能や免疫調節能から組織再生の要として着目されてきた。一方で、マクロファージ(M)は自然免疫や組織恒常性維持だけでなく、炎症性M(M1)から抗炎症性M(M2)へと極性を変化することで過剰な免疫を調節し、組織再生を誘導する可能性が示唆されている。しかし、MSCsとMが創傷治癒過程でどのように関わり、組織再生にどう影響を与えるかはほとんど明らかにされていない。この相互作用を明らかにし、促進することにより、効率的な歯槽骨再生や、歯周病やインプラント周囲炎などの炎症性疾患の病態形成を抑制する新規治療法の開発に繋がると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In a long bone injury model, it was suggested that the accumulation of M1 macrophages and mesenchymal stem cells (MSCs) in the damaged area, along with an increase in M2 macrophages, played an important role in tissue regeneration, as evidenced by delayed bone regeneration in the macrophage-depleted group through micro-CT analysis.

Co-culturing with MSCs resulted in a decrease in the production of cytokines associated with M1 activation, an increase in cytokine production associated with MSC activation, and an increase in the production of M2 phenotype conversion factors. Therefore, it is suggested that in wound healing, M1 produces cytokines to recruit MSCs to the damaged area, and then MSCs control inflammation while converting M1 to M2 to promote tissue regeneration.

研究分野：分子生物学

キーワード：間葉系幹細胞 マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞 (MSCs) は中胚葉由来の組織常在の幹細胞であり、全身の様々な組織に存在することが確認されている。MSCs の特徴として、自己複製能や様々な組織特異細胞に分化する多分化能を有し、数多くの組織再生工学の分野で研究・臨床応用がなされてきた。さらに近年では、様々な免疫細胞に対する MSC の調節機能が注目される様になり、自己免疫疾患等に対する全身細胞移植治療にも用いられるようになってきた。一方、創傷治癒過程における組織修復部位に、損傷部位からの SDF-1/CXCR4 および MCP-1/CCR2 などのサイトカイン・ケモカインを介して、MSC が動員されることも知られている。我々もこれまでに抜歯窩や露髄部位に MSC が集積することを報告してきたが、創傷治癒部位局所での MSCs の具体的な役割についてはいまだ不明である。

炎症や外的要因によって組織が損傷した場合、その創傷治癒局所では、まず好中球や T 細胞などが集積する。これら免疫細胞が産生する炎症性サイトカインは、不活性型のマクロファージ (M0) の増殖を促した後、炎症性マクロファージ (M1) へと活性化させる。マクロファージは、自然免疫や組織の恒常性維持に関与するだけでなく、表現型を炎症誘発性 (M1) から抗炎症性 (M2) に切り替えることによって過剰な免疫を調節し、損傷部位の組織再生に寄与することが知られている。M0 から活性化した M1 は、炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-1 β 、IL-12、IL-23、IL-6 および炎症メディエーターである一酸化窒素を産生し、T 細胞や B 細胞などの免疫細胞をさらに活性化させることで抗原の排除や炎症を制御しているとされている。その後、免疫調節期になると、M2 へと極性を変化させ、抗炎症性サイトカインである IL-10 および TGF- β 、修復関連因子である BMP-2 および VEGF の産生により免疫細胞の活性化やそれによって引き起こされるはずの炎症が抑制される。組織再生におけるマクロファージの関わりとして、M1 由来の TNF- α が組織修復に関わる間葉系幹細胞の細胞死を抑制したり、M1 から極性変化した M2 が組織再生を促進させるとの報告、さらに、全身性に移植された MSC がマクロファージの極性を M2 へと誘導することで自己免疫疾患の症状を改善したという報告もなされている。このように、マクロファージは組織再生の初期から後期にわたり重要な役割を果たすと考えられている。したがって、創傷治癒部位局所に動員・集積された MSCs が、これら M1 ならびに M2 となんらかの関わりをもつことは容易に想像できる。しかし、感染のない純粋な長管骨・骨髄損傷治癒モデルにおける M1、M2 と MSCs の治癒過程における時空間的な集積、誘導状況やマクロファージを枯渇した際の細胞動態や骨性治癒については十分明らかではない。また、これらの骨・骨髄損傷治癒モデルにおける炎症再生連関における主要細胞要素であるマクロファージと MSC は骨髄組織より供給されると考えられるが、炎症を抑制し、再生に結びつけるマクロファージと MSC の相互作用の分子基盤はほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

MSCs は、その多分化能や免疫調節能から組織再生の要として着目されてきた。一方で、マクロファージ (M) は自然免疫や組織恒常性維持だけでなく、炎症性 M (M1) から抗炎症性 M (M2) へと極性を変化することで過剰な免疫を調節し、組織再生を誘導する可能性が示唆されている。しかし、MSCs と M が創傷治癒過程でどのように関わり、組織再生にどう影響を与えるかはほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、マウス長管骨損傷モデルを用いて創傷治癒過程における M1、M2 および MSCs の時空間的分布状況を組織学的に検討し、M を実験的に枯渇させた場合に組織再生がどう生物学的に影響を受けるのかを目的とした。

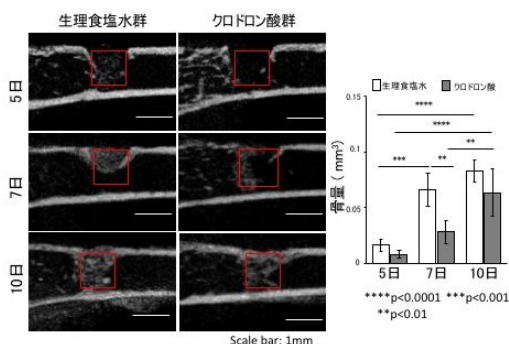
3. 研究の方法

全身麻酔下で6週齢マウス (C57BL6/J, メス) の大腿骨皮質骨を直径1mmのラウンドバーにて穿孔し長管骨損傷モデルを作製した。骨欠損作製5, 7, 10日後 (各n=5) に大腿骨を回収し, 実験に使用した。マイクロCT (μ CT) 解析による骨組織治癒の評価, ならびにTRAP染色, マッソントリクローム染色にて組織形態学的解析を行い, M1, M2, MSCs, 骨芽細胞の経時的な分布を蛍光免疫染色にて検出した。また, 実験的M 枯渇群として, 骨欠損作製の24時間前にクロドロン酸内包リポソーム (12.5 mg/kg) を腹腔内投与し, 生理食塩水投与群を対照群として, 創傷治癒状況を比較した。さらに, マウス骨髄由来MSCsとM1, M2それぞれを, カルチャーインサートを用いて間接共培養し, M1における炎症性サイトカイン (*Tnf- α* , *Il-1 β* , *Il-6*, *iNos*), M2における抗炎症性サイトカイン (*Il-10*, *Tgf- β*), ならびにMSCsの免疫調節能に関連する遺伝子 (*Hgf*, *Tgf- β* , *Fas-1*, *Il-2*) の発現変化をreal time RT-PCR法 (各群n=3) にて解析した。平均値の差は, 二元配置分散分析, 一元配置分散分析または独立t検定を用いて解析した。

4. 研究成果

マイクロCT解析の結果, 損傷7日目における骨再生は, M 枯渇群では対象群よりも有意に抑制されており, マッソントリクローム染色においても M 枯渇群では皮質骨の不完全な再生が観察された。また, RUNX2⁺骨芽細胞数ならびにTRAP⁺破骨細胞数はM 枯渇群では対象群よりも有意に少なかった。蛍光免疫染色の結果, CD80⁺M1はM 枯渇群では5日目に対照群よりも有意に少なく, CD206⁺M2はM 枯渇群では7日目に対照群よりも有意に少なかったものの, 10日目では有意差はなかった。一方でPDGFR⁺MSCsはM 枯渇群と対照群で有意差がなかった。*In vitro*におけるM1/MSCsとM2/MSCsの間接共培養実験では, M1における*Tnf- α* , *Il-1 β* , *Il-6*および*iNos*の発現が有意に減少し, M2における*Il-10*発現が有意に増大した。また, M1/MSCs間接共培養でMSCsにおける*Hgf*, *Il-2*, *Fas-1*, *Il-4*および*Il-13*の発現が有意に増大し, M2/MSCs間接共培養では, MSCsにおける*Hgf*, *Il-2*, *Fas-1*および*Tgf- β* の発現が有意に増大した。

マウス長管骨損傷治癒モデルにおける治癒過程ではM1, MSCsならびにM2の集積と共に骨芽細胞/破骨細胞の分布を認め, この一連の反応はM の枯渇で阻害され組織再生が抑制された。*In vitro*共培養の結果から推測すると, M1により刺激されたMSCsが局所の免疫調節に関与し, M1からM2へ分極誘導することで創傷治癒を促進させる可能性が示唆された。この相互作用を生物学的に促進することにより, 効率的な歯槽骨再生や, 歯周病やインプラント周囲炎などの炎症性疾患の病態形成を抑制する新規治療法の開発に繋がると考えられた。



図マイクロCT解析の結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 田頭龍二
2. 発表標題 間葉系幹細胞・マクロファージ相互作用が担う炎症再生連関
3. 学会等名 日本骨免疫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田頭龍二
2. 発表標題 創傷治癒過程における間葉系幹細胞とマクロファージの相互作用
3. 学会等名 日本補綴歯科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田頭龍二
2. 発表標題 間葉系幹細胞とM1, M2マクロファージの間接的相互作用による骨再生
3. 学会等名 日本口腔インプラント学会
4. 発表年 2022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
---------	---------