

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16678

研究課題名(和文) 膝滑膜由来間葉系幹細胞のIL1による増殖の分子機序の解析と再生医療への応用

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of IL1b-induced proliferation of synovial mesenchymal stromal cells

研究代表者

松村 恵津子 (Matsumura, Etsuko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞(MSC)を用いた再生医療を効率的に提供するためには、移植に用いる自家MSCを安全に、且つ十分量供給できるプロトコルを確立することが必須である。しかしながら、患者由来の細胞は増殖性に個人差があるため、移植用細胞の数を常に十分量確保できるとは限らないのが現状である。私たちは、IL1bがMSCの多分化能を損なうことなく強力な増殖因子として作用することを示した。しかしながら、MSCにおけるIL1b受容体陽性細胞分画は約5%程度と低く、未知の情報伝達経路が存在する可能性が示唆された。本研究の最終目標は、IL1bによるMSC増殖の分子機序の解析を行い、組織再生医療への還元を行うことである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、MSC特異的に存在するIL1b受容体を介した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。私たちのこれまでの研究成果から、MSCと炎症性細胞で異なるIL1bに対する細胞応答性が観察される原因として、異なる受容体アイソフォームの発現が考えられたが、このようなIL1b受容体の生理機能は今まで報告されておらず、本研究はIL-1bの新たなパイオロジーの開拓につながると考えている。

研究成果の概要(英文)：To efficiently provide regenerative therapy for articular cartilage using autologous synovial mesenchymal stem cells (MSCs), it is crucial to establish a protocol that ensures the safe and reliable supply of autologous cells for transplantation. However, due to inherent variability in the proliferative capacity of patient-derived cells, maintaining a consistently sufficient number of transplantable cells remains a challenge. Our research has demonstrated that IL-1 acts as a potent growth factor for MSC proliferation without compromising their differentiation capacity. However, the subset of IL-1 receptor-positive cells in MSCs is relatively low, approximately around 5%, suggesting the presence of unidentified IL-1 signaling pathways in MSCs. The aim of this study was to elucidate the molecular mechanisms underlying IL-1-induced MSC proliferation and apply this knowledge to advance tissue regeneration therapies.

研究分野：整形外科学

キーワード：MSC IL1b CD121a Proliferation

## 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。

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。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。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。

## 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、

- 2-1. MSCで選択的に発現しているIL1b受容体アイソフォームと細胞内発現部位の同定
- 2-2. MSC型(Short Form)と炎症細胞型(Long Form)のIL1b受容体の機能的差異の検討
- 2-3. MSCにおいて活性化されるIL1bシグナルの標的遺伝子の同定と炎症性細胞における標的遺伝子との違いの検討

の3項目に関して検討を行った。

IL1bは、炎症反応の急性期に発現が増大する炎症誘発性のサイトカインで、様々な炎症性疾患において炎症の増悪因子として作用することが報告されている。変形性関節症においては、炎症性サイトカイン、ケモカインであるIL6、IL8、RANTESの発現が患者の関節液中において上昇することが報告されているが、IL1bは、軟骨細胞に対してこれら分子の発現を上昇させること

が報告されている (Aigner et al. *Cytokine*, 31(3), 227-240, 2005, Guerne et al. *J Immunology*, 144(2), 499-505, 1990, Lotz, J. *Immunology*, 148(2), 466-473, 1992, Alaaeddine et al, *Arthritis Rheumatology*, 44(7), 1633-1643, 2001, Pulsatelli et al, *J. Rheumatology*, 26(9), 1992-2001, 1999)。そのため、IL1b は、関節リウマチや変形性膝関節症の病的プロセスを促進する因子 (アンチアナボリック、カタボリック因子) として認識されてきた (Stove et al. *Pathobiology* 68, 144, 2000, Chadjichristos et al. *J Biol Chem* 278, 39762, 2003, Shakibaei et al. *Ann Anat* 187, 487, 2005)。実際に、培養軟骨細胞に IL1b を作用させると、アグリカン、II 型コラーゲンの発現が減少することが報告されている。一方で、IL1b は軟骨基質分解酵素である MMP や ADAMTS の発現を増大させることが報告されている (Huh et al, *BMC Complement Altern Med* 12, 256, 2012)。しかしながら、IL1b がどのような分子メカニズムで MSC の増殖に対して機能するかについての報告は渉猟した限り見当たらない。本研究は、IL1b が、炎症の場における組織破壊の促進因子の側面ではなく、修復系細胞の増殖を介して組織修復の起点にもなり得るとの考えに立脚しており、IL1b の新たな生理機能の発見につながると考えている。

### 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とから、間葉系幹細胞 (MSC) に類似した細胞機能を有する細胞であると考えられている。これら細胞を用いて、表面抗原発現解析 (フローサイトメーター: BD Bioscience, FACS Verse)、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

#### 4-1. MSC で選択的に発現している IL1b 受容体アイソフォームと細胞内発現部位の同定

本研究を開始するにあたって、IL1b 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。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、IL1b による増殖促進作用は観察されなくなった。このことは、IL1b 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。さらに IL1b 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じる細胞内 Erk のリン酸化が、IL1b の作用発現に必須であると考えられた。

次に、初代滑膜 MSC における IL1b 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。IL1b 存在下、第 4 継代まで細胞を維持しても IL1b 受容体陽性細胞の分画に変動は観察されなかった。このことは、IL1b の増殖促進効果は IL1b 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。

一方で、初代滑膜 MSC から調製した mRNA を用いて PCR 法により IL1b 受容体の発現を検証したところ、IL1b 受容体の発現は、HeLa 細胞や HEK293 細胞といった他の細胞株と同等な発現量が観察されたことから、MSC において IL1b 受容体陽性細胞が低い理由は、転写語翻訳のプロセスが

他の細胞と異なっていると考えられた。

そこで、Western Blot 法を用いて、IL1b 受容体タンパク質の発現を比較したところ、上記 HeLa 細胞や HEK293 細胞では、約 70KDa のタンパクの発現が観察されたのに対して、MSC では、約 60KDa の短いアイソフォームの発現が観察された。このことから、MSC においては、他の細胞とは異なる転写語翻訳のメカニズムの存在が、示唆された。しかしながら、翻訳語修飾の過程で付加される糖鎖を消化する酵素を作用させても HeLa 細胞や HEK293 細胞で観察される約 80KDa のタンパクの分子量に変化は観察されなかったことから、MSC 特異的 IL1b 受容体タンパク質の発現の分子機序として翻訳後の修飾の特異性の可能性は低いと考えられた。

次に、この、IL1b 受容体タンパクの細胞内局在を免疫染色法で検証したところ、HeLa 細胞や HEK293 細胞では、細胞膜におけるタンパクの局在が観察されたのに対して、MSC においては、そのほとんどが、細胞質に存在していることが明らかとなった。

NCBI (National Center for Biotechnology Information) の遺伝子配列データベースによると、IL1b 受容体遺伝子は、coding region の 1st ATG の直下に signal peptide の配列を有すること、N 末端側のエクソン配列に複数の alternative splicing form が存在することが示唆されている。これらの結果から、MSC 特異的 IL1b 受容体タンパク質の発現の分子機序として、5' 側のエクソンの alternative splicing の可能性が最も高いと考えられた。

#### 4-2. MSC 型 (Short Form) と炎症細胞型 (Long Form) の IL1b 受容体の機能的差異の検討

次に、IL1b による MSC 増殖活性化の分子機序をより詳細に解析する目的で、細胞内 Erk のリン酸化の継時変化を調べた。HeLa 細胞や HEK293 細胞のように細胞膜表面に IL1b 受容体を発現する細胞においては、血清並びに IL1b 刺激による細胞内 Erk のリン酸化は、刺激後 5 分から 10 分後に観察された。これに対して、MSC においては、血清刺激に対する細胞内 Erk のリン酸化は、HeLa 細胞や HEK293 細胞と同様に刺激後 5 分から 10 分後に観察されたのに対して、IL1b 刺激では 10 分から 15 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、IL1b 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。興味深いことに、IL1b 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。

以上のことから、MSC を用いたフローサイトメーターで IL1b 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誘導し、IL1b 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。

#### 2-3. MSC において活性化される IL1b シグナルの標的遺伝子の同定と炎症性細胞における標的遺伝子との違いの検討

次に、MSC において IL1b が増殖因子として働く情報伝達経路に関する検討を行った。Cyclin D は、細胞周期において、G1 期 (DNA 合成準備期) から S 期 (DNA 合成期) への移行期に発現量が增大する細胞周期関連遺伝子である。Cyclin D の発現上昇は、CDK4 や CDK6 (Cyclin dependent kinase) の活性化を誘導する、細胞分裂の開始に必須の現象であるが、MSC において、IL1b は血清刺激と同様に刺激後 6 時間で Cyclin D の発現上昇を誘導した。一方で、この Cyclin D 発現

上昇効果は、Erk の阻害剤である U0126 により、有意に減少した。以上の結果は、MSC に対して IL1b が増殖因子として作用する分子機序として、MSC において発現が観察される細胞内局在型の IL1b 受容体を介する遅延型の Erk のリン酸化反応が、最終的に MSC における Cyclin D 発現の活性化をより長期に誘導するためであると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tang Guo, Asou Yoshinori, Matsumura Etsuko, Nakagawa Yusuke, Miyatake Kazumasa, Katagiri Hiroki, Nakamura Tomomasa, Koga Hideyuki, Komori Keiichiro, Sekiya Ichiro, Ezura Yoich, Tsuji Kunikazu	4. 巻 8
2. 論文標題 Short cytoplasmic isoform of IL1R1/CD121a mediates IL1 induced proliferation of synovium-derived mesenchymal stem/stromal cells through ERK1/2 pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e09476 ~ e09476
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2022.e09476	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------