

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592851

研究課題名(和文) 歯髄由来間葉系幹細胞の移植片対宿主病抑制機構に関するリンパ球亜集団の検討

研究課題名(英文) Study for subsets of lymphocyte which take a role on the mechanism that mesenchymal stem cells derived from dental pulp reduce graft versus host disease

研究代表者

高山 英次(Takayama, Eiji)

朝日大学・歯学部・准教授

研究者番号：70533446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：異系統マウス脾細胞の混合培養に種々のマウス系統由来間葉系幹細胞を加えた移植片対宿主病(GVHD)抑制試験管内モデルを用いて、間葉系幹細胞のGVHD抑制における仕組みを検討した。このGVHD抑制モデルにおいて、間葉系幹細胞はinterferon- γ 産生を抑制した。しかし、この抑制機構に間葉系幹細胞が発現する主要組織適合性複合体(MHC)の遺伝子型や発現の有無が関与する可能性は認められなかった。また、この抑制機構に関するリンパ球亜集団は特定されなかった。本研究において得られた成果は、ヒトGVHD患者における歯髄間葉系幹細胞による治療にも重要な知見を提供する。

研究成果の概要(英文)：The mechanism for that mesenchymal stem cells (MSCs) reduce graft versus host disease (GVHD) was investigated on the allogenic mixed-lymphocyte reaction with MSC as in vitro model for GVHD. Regardless of genotypes and expressing or not of major histocompatibility complex (MHC), MSCs reduced produced interferon- γ on this in vitro model. While subsets of lymphocyte which take a role on the mechanism reducing GVHD were not identified. The obtained results have suggested important information for treatment of GVHD with MSC derived from dental pulp on human patients.

研究分野：口腔生化学

キーワード：移植片対宿主病 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 移植片対宿主病(GVHD)に関するサイトカインとリンパ球の関係

GVHD は腫瘍組織適合性複合体 (MHC) class I 分子を認識する通常の CD8 陽性 T 細胞によって引き起こされ、Th1 型免疫反応に關与するインターフェロン- γ (IFN- γ) の産生や、消化管組織などの臓器傷害、などが指標とされる。IFN- γ によって活性化されたドナーの CD8 陽性 T 細胞は、レシピエントの MHC class I 分子を認識することにより、臓器傷害を引き起こすと考えられている。GVHD の引き金となる早期 IFN- γ 産生を担う細胞集団は、マウスにおいては老化に伴って増加する稀な CD122 陽性 CD8 陽性 T 細胞亜集団であり (Takayama E ら, J Immunol, 2000)、ヒトにおいては CD57 陽性 CD8 陽性 T 細胞亜集団である (Takayama E ら, Immunol, 2003) ことを、本研究代表者は明らかにした。そして、これらの T 細胞亜集団により、通常の CD4 陽性 T 細胞による IFN- γ 産生は増強され、引き続き CD8 陽性 T 細胞による臓器傷害など、GVHD は進行すると考えられている。この IFN- γ 産生増強には NK1.1 陽性

TCR 陽性 T 細胞亜集団 (NKT 細胞; CD4 陽性または陰性) とインターロイキン (IL) -18 が關与することを、本研究代表者は明らかにした (Habu Y, Takayama E ら, J Immunol, 2001)。また、通常の CD8 陽性 T 細胞は多様性がある MHC class Ia 分子を認識して IL-2 により増殖するが、稀な CD122 陽性 CD8 陽性 T 細胞亜集団は動物個体同一集団内 (例えばヒトでは同一民族) において多様性が低い MHC class Ib 分子を認識して IL-15 により増殖することが明らかにされている (Tough DF ら J Immunol, 2001; Urdahl KB ら, Nat Immunol, 2002)。

(2) 間葉系幹細胞の免疫抑制能

間葉系幹細胞の免疫抑制能は臨床への応用が期待されており (Wolbank S ら, Tissue Engineering, 2007)、GVHD に対する抑制効果も報告されている (Joo SY ら, Cytotherapy, 2010; Cetinalp P ら, Cytotherapy, 2011)。こうした免疫抑制の機構には、液性因子や MHC class I 関連分子が關与する可能性を示した報告もある (Yañez R ら, Exp Cell Res, 2010; Musso A ら, Hematologica, 2011)。しかし、これらの報告も他の因子が關与する可能性を示しており、間葉系幹細胞の免疫抑制機構は未だ十分には明らかにされていない。

(3) 移植片対宿主病(GVHD)抑制に關与するリンパ球

Foxp3 陽性 CD4 陽性の調節性 T 細胞 (Treg 細胞) は、通常の CD4 陽性 T 細胞と分別される亜集団である (Sakaguchi S ら, J Immunol, 1995; Sakaguchi S ら, Cell,

2000)。マウス GVHD モデルを用いた検討から、Treg 細胞の GVHD 抑制能が近ごろ報告された (Ma H ら, J Clin Invest, 2011)。しかし、間葉系幹細胞の GVHD 抑制における、Treg 細胞、CD122 陽性 CD8 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、などリンパ球亜集団の關与は、未だほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

歯髄、骨髓、脂肪組織より得られる間葉系幹細胞の免疫抑制能は、抑制される免疫反応の類型が明らかとされつつあり、臨床応用への期待が高まっている。しかし、この免疫抑制の機構は十分には明らかにはされていない。そこで本研究では、間葉系幹細胞の移植片対宿主病(GVHD)抑制において、サイトカインの動態と關与するリンパ球亜集団を明らかにするため、マウスの *ex vivo* モデルを用いた検討を行った。本研究により得られた知見は、単に GVHD のコントロールを目的とした間葉系幹細胞の臨床応用における科学的根拠を明らかにするのみならず、間葉系幹細胞の免疫抑制能を幅広く種々の免疫性疾患の治療に臨床応用できる可能性を探る知見を提供している。

3. 研究の方法

(1) マウス脾リンパ球混合培養による *ex vivo* の GVHD モデルを用いて調べた。ドナーとレシピエントのリンパ球を個々に調べるために、BALB/c 系統と Ly5.1 接合 C57BL/6 系統由来の脾リンパ球を用いた。

(2) 間葉系幹細胞は、MHC 遺伝子型の異なる C3H/HeN 系統、BALB/c 系統と C57BL/6 系統、および MHC class I の発現を欠損した 2 microglobulin (2m) 欠損 C57BL/6 系統より単離した。単離した間葉系幹細胞の骨芽細胞と脂肪細胞への分可能を確かめた。

(3) リンパ球混合培養に間葉系幹細胞を加え 48 時間培養した。そして、急性の GVHD を引き起こす引き鉄となる IFN- γ の産生を、酵素結合免疫吸着 (ELISA) 法により定量した。また、リンパ球の活性化抗原の発現変化を、フローサイトメーター (FACS) 法により解析した。

4. 研究成果

(1) ドナーともレシピエントとも MHC 遺伝子型の異なる C3H/HeN 系統、ドナーである BALB/c 系統とレシピエントである C57BL/6 系統いずれの間葉系幹細胞も、ほとんど同様に、リンパ球混合培養による IFN- γ 産生を抑制した。この結果は、GVHD はドナーとレシピエントの MHC 遺伝子型が異なることにより引き起こされるにもかかわらず、急性の GVHD を引き起こす引き鉄となる IFN- γ の産生を間葉系幹細胞が抑制する仕組みは、間葉系幹細胞の MHC 遺伝子型にかかわらない仕組みに

よるものであることが明らかとなった。

(2) MHC class I の発現を欠損した 2m 欠損 C57BL/6 系統より単離した間葉系幹細胞もまた、野生型 C57BL/6 系統由来の間葉系幹細胞とほとんど同様に、リンパ球混合培養による IFN- γ 産生を抑制した。この結果は、GVHD はドナーとレシピエントの MHC 遺伝子型が異なることにより引き起こされるにもかかわらず、急性の GVHD を引き起こす引き鉄となる IFN- γ の産生を間葉系幹細胞が抑制する仕組みは、間葉系幹細胞が発現する MHC が関わらない仕組みによるものであることが明らかとなった。

(3) 間葉系幹細胞は IFN- γ 産生を抑制するにもかかわらず、ドナー-BALB/c 系統およびレシピエントである C57BL/6 系統の T リンパ球の活性化抗原の発現はいずれも、間葉系幹細胞の有無により、変化せず、関与するリンパ球亜集団を特定できなかった。この結果は、GVHD は T リンパ球が MHC の遺伝子型の違いを認識して活性化することが引き鉄になり引き起こされるにも関わらず、急性の GVHD を引き起こす引き鉄となる IFN- γ の産生を間葉系幹細胞が抑制する仕組みは、単に T リンパ球の活性化を抑制するものでは無い可能性を示唆している。急性の GVHD における間葉系幹細胞の IFN- γ 産生抑制に関与するリンパ球亜集団を特定するためには、より敏感にリンパ球の活性化を検出できる測定技術やあらかじめリンパ球を亜集団に分離する技術を必要とするのかもれない。あるいは、この IFN- γ 産生抑制は、間葉系幹細胞による直接的な仕組みによるもの、あるいは顆粒球系や単球系などリンパ球以外の細胞亜集団が関与する仕組みによるものであるのかもしれない。

(4) さらに、これらの仕組み詳細に検討することは、単に GVHD のコントロールを目的とした歯髓由来間葉系幹細胞の臨床応用における科学的根拠を明らかにするのみならず、歯髓由来間葉系幹細胞の免疫抑制能を幅広く種々の免疫性疾患に臨床応用できる可能性を明らかにするであろう。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. Ono T, Yamaguchi Y, Oguma T, Takayama E, Takashima Y, Tadakuma T, Miyahira Y. Actively induced antigen-specific CD8+ T cells by epitope-bearing parasite pre-infection but not prime/boost virus vector vaccination could ameliorate the course of Plasmodium yoelii blood-stage infection. Vaccine, 査読有, 30(44):6270-8, 2012 Sep 28.

doi: 10.1016/j.vaccine.2012.08.009.

2. Kondoh N, Takayama E, Kamiya M, Kawaki H, Motohashi M, Muramatsu Y, Shikimori M, Mitsudo K, Tohnai I. Comprehensive Study of Oral Squamous Cell Carcinoma Patients Using Blood Samples and Gene Expression Profiles. J Cancer Sci Ther, 査読有, 2012, S18: 001. doi:10.4172/1948-5956.S18-001.
3. Nagaya R, Mizuno-Kamiya M, Takayama E, Kawaki H, Onoe I, Tanabe T, Nagahara K, Kondoh N. Mechanisms of the immunosuppressive effects of mouse adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells on mouse alloreactively stimulated spleen cells. Exp Ther Med, 査読有, 7(1):17-22, 2014 Jan. doi: 10.3892/etm.2013.1382
4. Iida M, Takayama E, Naganawa K, Mitsudo K, Adachi M, Baba J, Fujimoto-Muto M, Motohashi M, Mizuno-Kamiya M, Kawaki H, Kioi M, Ichinose M, Sumitomo S, Muramatsu Y, Shikimori M, Tohnai I, Kondoh N. Increase of Peripheral Blood CD57+ T-Cells in Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. Anticancer Res, 査読有, 34(10): 5729-34. 2014 Oct.
5. Naganawa K, Takayama E, Adachi M, Mitsudo K, Iida M, Kamiya-Mizuno M, Kawaki H, Ichinose M, Motohashi M, Muramatsu Y, Tohnai I, Sumitomo S, Shikimori M, Kondoh N. Producing Capabilities of Interferon-gamma and Interleukin-10 in Peripheral Blood from Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. Open Dent J, 査読有, 9;120-4. 2015 Mar. doi: 10.2174/1874210601509010120.

〔学会発表〕(計 31 件)

1. Kondoh N, Takayama E, Kamiya M, Kawaki H, Motohashi M and Muramatsu Y. Comprehensive study of oral squamous cell carcinoma patients using blood samples and gene expression profiles. 2nd World Congress on Cancer Science and Therapy. Sep 10 - 12, 2012, San Antonio, TEXAS.
2. 竹内浩子, 高山英次, 川木晴美, 久保朱里, 白木雅文, 近藤信夫, 渋谷俊昭. 実験的歯周炎モデルマウスの IFN-g と IL-10 の産生能. 第 54 回歯科基礎医学会術大会総会, 2012 年 9 月 14-16 日, 郡山, 福島.
3. 長縄鋼亮, 高山英次, 足立誠, 飯田昌樹, 本橋征之, 光藤健司, 村松泰徳, 式守道夫, 藤内祝, 近藤信夫. 口腔扁平上皮癌患者末梢血のサイトカイン産生能と T

- 細胞亜集団. 第54回歯科基礎医学学会術大会総会、2012年9月14-16日、郡山、福島.
4. 尾上一平、川木晴美、近藤雄三、神谷真子、高山英次、土井豊、永原國央、近藤信夫. 骨髄由来間質細胞の増殖と骨芽細胞への分化における焼結炭酸アパタイトの機能解析. 第54回歯科基礎医学学会術大会総会、2012年9月14-16日、郡山、福島.
 5. 川木晴美、久保田聡、尾上一平、近藤雄三、神谷真子、高山英次、近藤信夫、滝川正春. 初期軟骨分化におけるCCN3の機能解析. 第54回歯科基礎医学学会術大会総会、2012年9月14-16日、郡山、福島.
 6. 東康加、神谷真子、川木晴美、高山英次、智原栄一、近藤信夫. マウス口腔扁平上皮癌と間葉系間質細胞の移植が腫瘍の生着と全身免疫系に及ぼす影響. 第54回歯科基礎医学学会術大会総会、2012年9月14-16日、郡山、福島.
 7. Naganawa K, Takayama E, Adachi M, Baba J, Iida M, Mitsudo K, Ichinose M, Muramatsu Y, Tohnai I, Sikimori M, Kondoh N. CD4+ CD57+ T cells and cytokine producing capabilities in peripheral blood from oral squamous cell carcinoma patients. 第71回癌学会学術総会、2012年9月19-21日、札幌、北海道.
 8. 竹内浩子、高山英次、川木晴美、久保朱里、白木雅文、近藤信夫、渋谷俊昭. 歯周炎モデルマウスにおけるIFN-g, IL-10の産生能の検討. 第55回日本歯周病学会秋季学術大会、2012年9月23日、茨城.
 9. Takeuchi H, Takayama E, Kubo S, Kawaki H, Mizuno-Kamiya M, Shiraki M, Kondoh N, Shibutani T. Systemic immunity of the murine model for periodontal disease. The American Academy of Periodontology & The Japanese Society of Periodontology 98th Annual Meeting, Sep 29 - Oct 2, 2012, Los Angeles, CALIFORNIA.
 10. 竹内浩子、高山英次、近藤信夫、渋谷俊昭. マウス咬合性外傷モデルにおける全身免疫能変化. 第12回日本外傷歯科学会、2012年10月13-14日、岐阜.
 11. 竹内浩子、久保朱里、高山英次、北後光信、白木雅文、近藤信夫、渋谷俊昭. 実験的歯周炎モデルマウスにおける全身免疫能の変化. 第7回日本歯周病学会中部地区大学日本臨床歯周病学会中部支部合同研究会. 2012年11月17日、愛知.
 12. 久保朱里、高山英次、足立憲正、川木晴美、神谷真子、倉知正和、近藤信夫、渋谷俊昭. Influences of LPS upon the immunological response against metal ion. 第60回国際歯科研究学会日本支部 (JADR) 総会学術大会、2012年12月14-15日、新潟.
 13. 川木晴美、久保田聡、尾上一平、近藤雄三、高橋潤、神谷真子、高山英次、近藤信夫、滝川正春. ERK1/2経路を介したCCN3の初期軟骨分化における作用の検討. 第55回基礎歯科医学学会学術大会総会、2013年9月20~22日、岡山.
 14. 尾上一平、川木晴美、近藤雄三、高橋潤、神谷真子、高山英次、永原國央、近藤信夫. ラット骨髄由来細胞の増殖分化における炭酸含有アパタイトの焼結温度依存的影響. 第55回基礎歯科医学学会学術大会総会、2013年9月20~22日、岡山.
 15. 田中雅士、川木晴美、小栗健策、森春菜、神谷真子、高山英次、吉田隆一、近藤信夫. 象牙質幹細胞複合体の骨再生への応用. 第55回基礎歯科医学学会学術大会総会、2013年9月20~22日、岡山.
 16. 小栗健策、川木晴美、田中雅士、森春菜、神谷真子、高山英次、吉田隆一、近藤信夫. 培養細胞を用いた象牙質顆粒の機能解析. 第55回基礎歯科医学学会学術大会総会、2013年9月20~22日、岡山.
 17. 高橋潤、川木晴美、尾上一平、近藤雄三、神谷真子、高山英次、永原國央、近藤信夫. 炭酸含有アパタイトの骨髄由来間質細胞の接着増殖促進効果. 第55回基礎歯科医学学会学術大会総会、2013年9月20~22日、岡山.
 18. 近藤雄三、川木晴美、尾上一平、高橋潤、神谷真子、高山英次、永原國央、近藤信夫. 炭酸含有アパタイトの骨芽細胞増殖分化促進効果の検討. 第55回基礎歯科医学学会学術大会総会、2013年9月20~22日、岡山.
 19. 稲垣俊弘、神谷真子、東康加、川木晴美、高山英次、村松康徳、近藤信夫. マウス口腔扁平上皮癌による脾細胞インターフェロン産生能の抑制効果. 第55回基礎歯科医学学会学術大会総会、2013年9月20~22日、岡山.
 20. 東康加、神谷真子、稲垣俊弘、川木晴美、高山英次、櫻井学、智原栄一、近藤信夫. マウス扁平上皮癌による脾細胞インターフェロン産生能の抑制効果. 第55回基礎歯科医学学会学術大会総会、2013年9月20~22日、岡山.
 21. 小栗健策、川木晴美、田中雅士、森春菜、神谷真子、河野哲、高山英次、吉田隆一、近藤信夫. 象牙質顆粒の骨補填材としての機能評価. 第56回基礎歯科医学学会学術大会総会、2014年9月25~27日、福岡.
 22. 田中雅士、川木晴美、小栗健策、森春菜、神谷真子、高山英次、河野哲、近藤信夫、吉田隆一. 象牙質幹細胞凝集複合体を用いた歯周組織再生療法. 第56回基礎歯科医学学会学術大会総会、2014年9月25~27日、福岡.

23. 長谷川智哉、川木晴美、神谷真子、河野哲、高山英次、土井豊、玉置幸道、吉田隆一、近藤信夫。 -TCP/Te-CP セメントの培養歯髄由来幹細胞に対する親和性の検討。 第56回基礎歯科医学会学術大会総会、2014年9月25~27日、福岡。
24. 近藤雄三、川木晴美、高橋潤、大崎公資、神谷真子、高山英次、土井豊、永原國央、近藤信夫。 MAP経路を介した炭酸含有アパタイト焼結体の骨芽細胞増殖分化における作用の解析。 第56回基礎歯科医学会学術大会総会、2014年9月25~27日、福岡。
25. 高橋潤、川木晴美、近藤雄三、大崎公資、神谷真子、高山英次、土井豊、永原國央、近藤信夫。 炭酸含有アパタイト多孔体による骨様組織誘導能の評価。 第56回基礎歯科医学会学術大会総会、2014年9月25~27日、福岡。
26. 稲垣俊弘、神谷真子、川木晴美、高山英次、村松康徳、近藤信夫。 マウス口腔扁平上皮癌と間質細胞による脾細胞インターフェロン-産生能の調節。 第56回基礎歯科医学会学術大会総会、2014年9月25~27日、福岡。
27. 足立充隆、神谷真子、川木晴美、高山英次、稲垣俊弘、村松康徳、近藤信夫。 マウス口腔扁平上皮癌細胞株の形質の違いが宿主の抗腫瘍免疫機構に及ぼす影響。 第56回基礎歯科医学会学術大会総会、2014年9月25~27日、福岡。
28. 新谷耕平、川木晴美、神谷真子、高山英次、堀田正人、土井豊、近藤信夫。 チタン基盤への真空紫外線照射がヒト骨髄由来間葉系細胞の活性に及ぼす効果。 第56回基礎歯科医学会学術大会総会、2014年9月25~27日、福岡。
29. Kmeyama Y, Takayama E, Kawaki H, Mizuno-Kamiya M, Yashiro K, Kondoh N. Suppression of transformed phenotypes by SPRR1B is associated with the down-regulation of lysophosphatidic acid receptor 3. 15th International Union of Biochemistry and Molecular Biology & 24th Federation of Asian and Oceanian Biochemists and Molecular Biologists - The Taiwan Society for Biochemistry and Molecular Biology Conference, Oct 21 - 26, 2014, Taipei, CAINA.
30. Inagaki T, Kamiya M, Kawaki H, Takayama E, Adachi M, Adachi M, Motohashi M, Muramatsu Y, Kondoh N. Modulatory effects of mouse OSCC and stromal cells on cytokine-producing capability of spleen cells. 第73回癌学会学術総会、2014年10月25~27日、横浜、神奈川。
31. Adachi M, Kamiya M, Kawaki H, Takayama E, Inagaki T, Adachi M, Motohashi M, Muramatsu Y, Kondoh N. Progressive

phenotypes of mouse OSCC cells variably modulate cytokine-producing capability of host spleen cells. 第73回癌学会学術総会、2014年10月25~27日、横浜、神奈川。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕
特に無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高山 英次 (TAKAYAMA, Eiji)
朝日大学・歯学部・准教授
研究者番号：70533446

(2) 研究分担者

近藤 信夫 (KONDOH, Nobuo)
朝日大学・歯学部・教授
研究者番号：40202072

川木 晴美 (KAWAKI, Harumi)
朝日大学・歯学部・講師
研究者番号：70513670

神谷 真子 (KAMIYA, Masako)
朝日大学・歯学部・助教
研究者番号：70513670

(3) 連携研究者
無し