

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26713053

研究課題名(和文)ホスト幹細胞集積による新規組織再生療法の開発

研究課題名(英文)Development of tissue regeneration therapy using host stem cell homing

研究代表者

秋山 謙太郎 (Akiyama, Kentaro)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：70423291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,300,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究は、創傷治癒過程における、再生の場に宿主間葉系幹細胞を集積させることによって組織を再生させる新規再生療法を開発することを目的とする。マウス大腿骨骨欠損モデルにおいて、宿主間葉系幹細胞の集積が、骨欠損作製後1日で確認され、cDNAマイクロアレイ法による網羅的解析では、幹細胞集積因子として炎症性サイトカインのひとつであるTNF α が検出された。TNF α が間葉系幹細胞の機能に与える影響を検討したところ、TNF α によって、幹細胞の増殖が抑制されるとともに、走化性が向上し、さらにはFASLの発現が促進されることによって免疫調節能が促進されていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the mechanism of stem cell accumulation in regeneration site during wound healing process. In the mouse wound healing model, host mesenchymal stem cell accumulation was detected in 1 day after surgery. By using cDNA micro-array analysis, TNF α was detected as one of the stem cell accumulation factor. Thus, we confirmed the effect of TNF α on stem cell function including, cell proliferation, mobilization, immune-modulatory property. While TNF α could inhibit the cell proliferation, cell mobilization was strongly up-regulated. Furthermore, immune-modulatory property was, which was evaluated FASL expression, totally up-regulated. These results indicated that TNF α could stimulate host stem cell function and cause immune tolerance in wound healing site.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：間葉系幹細胞 創傷治癒 宿主免疫応答 内在性幹細胞

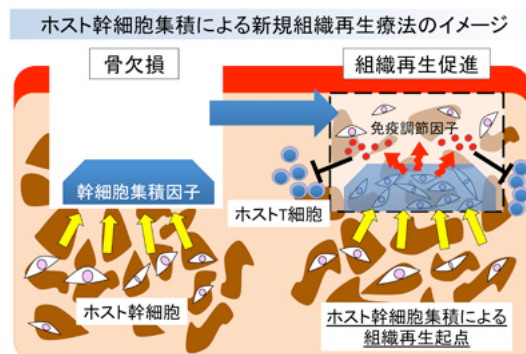
1. 研究開始当初の背景

健康な歯周組織、特に、十分な骨支持を長期にわたって維持する事は歯牙やインプラントにとって、その機能寿命を大きく左右し、口腔内の様々な機能に影響を及ぼす事は周知の事実である。失われた歯周組織の回復方法として骨髄由来間葉系幹細胞が応用されるようになり、更には近年、ES細胞や iPS 細胞など、新たな細胞ソースを求めた再生療法の研究など、その可能性に大きな期待が寄せられているものの、臨床的な組織再生効果はいまだ十分とは言えず、新たな組織再生療法の開発が望まれる。

骨髄由来間葉系幹細胞は、多くの組織特異細胞へ分化する事ができる多分化能を有しており、倫理的な問題の少ないこの間葉系幹細胞を応用した組織再生療法は骨組織再生の進歩に大きく貢献し、臨床・前臨床研究に於いて数多くの報告がなされている。しかしながら、移植局所における詳細な組織再生メカニズムには不明な点が多く、生理的かつ広範囲にわたる組織再生は未だ十分な成功をおさめていない。この間葉系幹細胞を用いた組織再生の信頼性が低い理由として、移植後の幹細胞に細胞死が誘導 (Liu, Akiyama et al., *Nature Medicine*, 2011) されることや、この宿主 T 細胞による組織再生阻害は、抑制性 T 細胞を全身性に移植し、宿主の免疫寛容を誘導することによって抑止される事を初めて明らかにした。このように、組織再生の成否は宿主免疫応答の調節が鍵を握っている事に疑いの余地はない。このことは、局所における組織再生において、局所の免疫寛容を誘導することができれば、より効率的で、早期の組織再生に繋がることは十分に考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、創傷治癒過程にある組織再生局所に、宿主間葉系幹細胞を集積させることによって、局所の免疫寛容を誘導し、これまでの幹細胞移植による組織再生療法とは全く異なる新規組織再生療法を開発する基盤を構築することである。



3. 研究の方法

組織再生の場にホスト幹細胞を集積させる事で組織再生を促進させる方法を開発する事を目的に、以下の方法で段階的に解明する。

(1) 組織再生の場でホスト幹細胞がどのような動態をたどるのかを把握し、再生の場にホスト幹細胞を集積させる因子群を分子生物学的手法にて網羅的に解析する。

① C57BL6/J マウス大腿骨皮質骨に骨欠損 (直径 1 mm) を作製し、創傷治癒過程における宿主間葉系幹細胞の集積を、幹細胞マーカー (CD90, CD146, Sca-1) にて経時的に解析する。

② 骨欠損モデルの治癒過程における幹細胞集積因子群の候補因子を cDNA マイクロアレイ法による網羅的解析を行うことで検索する。

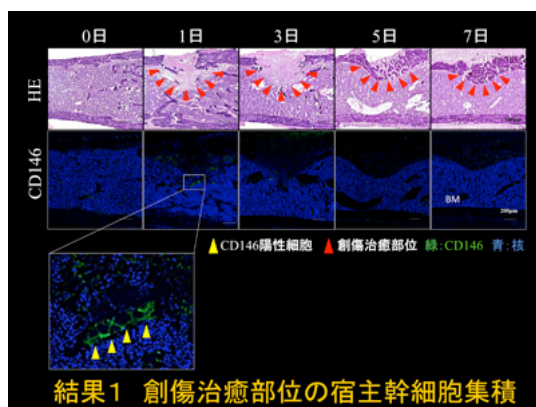
(2) 幹細胞集積候補因子が集積した宿主間葉系幹細胞の機能にどのような影響を与えるのかを検討する。

① 上記マイクロアレイ解析で得られた候補因子を幹細胞培養上澄に添加し、様々な間葉系幹細胞機能の変化を確認する。

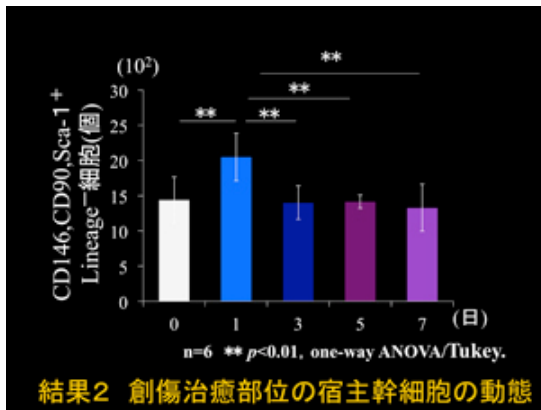
4. 研究成果

(1) 組織再生の場でのホスト幹細胞の動態

① 創傷治癒過程におけるホスト幹細胞の集積を経時的に追跡する為に、大腿骨凍結切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン染色 (HE)、ならびに間葉系幹細胞陽性マーカーのひとつである CD146 の蛍光免疫染色を行った結果、骨欠損作製 1 日後に CD146 陽性細胞の集積が、創傷治癒部位に多く集積している像が観察された (結果 1)。

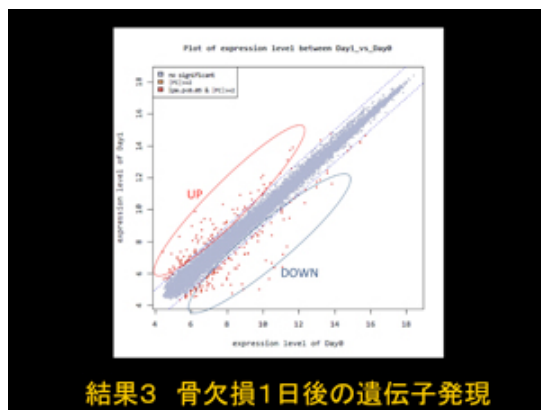


さらに、集積した細胞集団が、間葉系幹細胞であることを確認する為に、骨欠損作製後、経時的に大腿骨骨髄を回収し、フローサイトメトリー解析にて、幹細胞陽性マーカーとされる CD90, CD146, Sca-1 陽性細胞かつ、血球系細胞のマーカーである Lineage が陰性の細胞数を計測した結果、組織学的解析同様、骨欠損作製 1 日後に、間葉系幹細胞マーカー陽性細胞数が有意に上昇し、その後減少していることが明らかとなった (結果 2)。



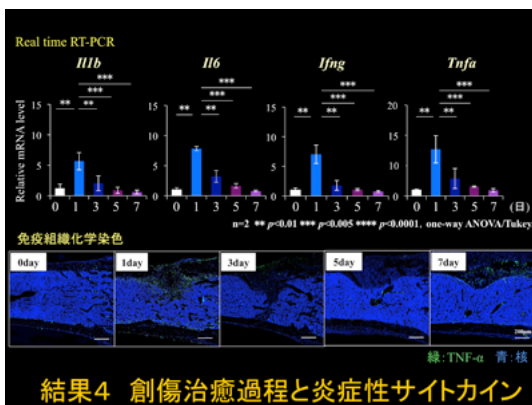
②創傷治癒過程における遺伝子発現の網羅的解析により、幹細胞集積因子の候補遺伝子群を検索する。

①の結果より、骨欠損作製後1日で間葉系幹細胞の集積が確認されたため、骨欠損作製前と作製後1日の大腿骨骨髓を採取し、cDNAマイクロアレイ法にて遺伝子発現の差を検討した結果、多くの遺伝子発現の上昇が確認された(結果3)。



結果3 骨欠損1日後の遺伝子発現

発現が上昇した因子群の多くはコラーゲンであり、創傷治癒部位での線維の増加が考えられるが、その他に炎症性サイトカインである TNF α , IFN γ , IL-1 β , IL-6 等や近年、炎症部位での発現上昇が報告されている HMGB-1 の発現が検出された。これら炎症性サイトカインの発現上昇をリアルタイム PCR で確認した結果、やはり、骨欠損作製後1日で有意に上昇していることが明らかとなった。中でも、TNF α の発現が他の遺伝子よりも上昇してい

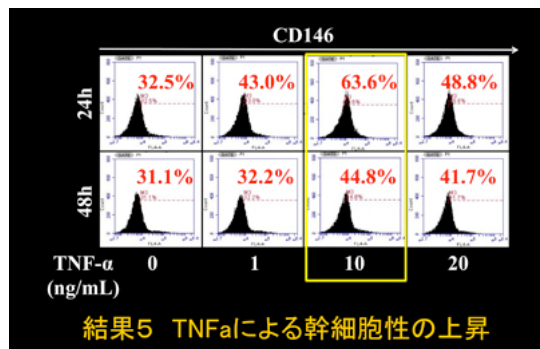


結果4 創傷治癒過程と炎症性サイトカイン

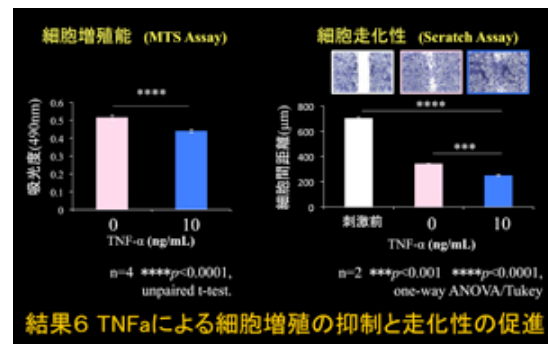
たため、蛍光免疫染色にて組織学的に検討し、同様の結果となった(結果4)。

(2) 幹細胞集積候補因子が集積した宿主間葉系幹細胞の機能にどのような影響を与えるのかを検討する。

①発現の上昇が最も大きかった TNF α にてマウス骨髓由来間質細胞への影響を検討したところ、10ng/ml, 24時間の刺激で幹細胞マーカーである CD146 の発現が、刺激しない場合と比較して約2倍に上昇していた(結果5)。

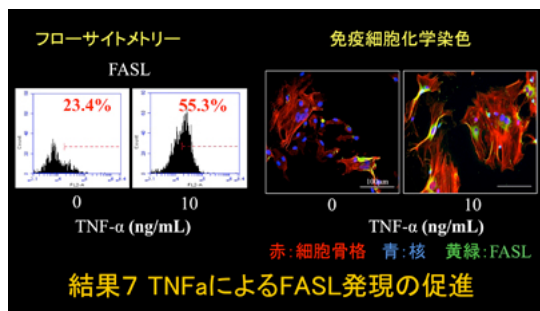


さらに、TNF α による細胞機能への影響を検討するために、細胞増殖能への影響ならびに、細胞走化性への影響を検討したところ、TNF α 刺激によって、細胞増殖は有意に抑制され、反対に、細胞走化性は促進されていることが明らかとなった(結果6)。



結果6 TNF α による細胞増殖の抑制と走化性の促進

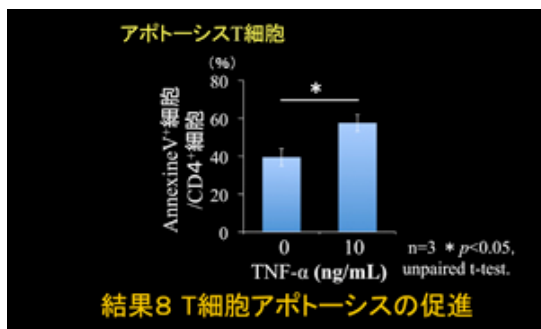
次に、TNF α による幹細胞の免疫調節能への影響を検討したところ、TNF α 刺激によって、幹細胞移植の免疫寛容獲得に発現が重要であると報告されている FASL (Akiyama et al., Cell Stem Cell, 2012) の発現が有意に上昇していることが明らかとなった(結果7)。



結果7 TNF α によるFASL発現の促進

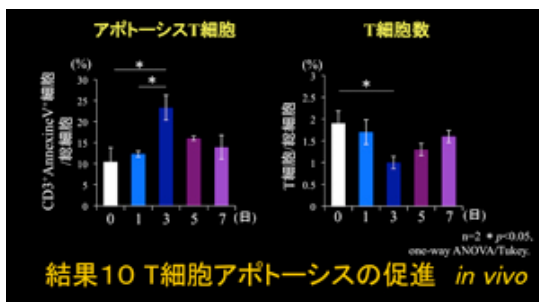
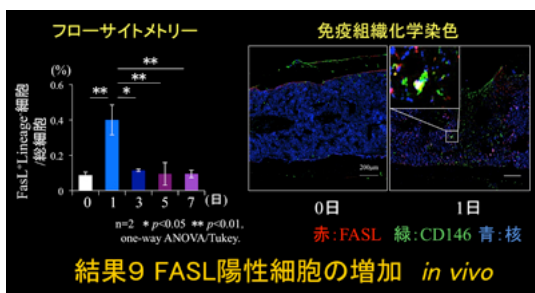
加えて、FASL 発現の上昇に伴い、*in vitro*

における T 細胞との共培養で、T 細胞のアポ



トーシス誘導を促進する結果となり、免疫調節能の上昇が確認された (結果 8)。

In vitro における T 細胞アポトーシスの促進が、実際に、再生の場である創傷治癒過程において発生しているかどうかを検証する為に、組織学的検討を行った結果、骨欠損作製後 1 日目に FASL 陽性細胞数が増加し、蛍光免疫染色においても、FASL 陽性、CD146 陽性細胞が観察された (結果 9)。さらには、再生の場においても T 細胞の細胞死が誘導され、局所での免疫寛容獲得が促進されている可能性が示唆された (結果 10)。



以上の結果より、組織再生の場において、炎症性サイトカインのひとつである TNF α が、宿主間葉系幹細胞の再生の場への集積を促し、局所での免疫寛容獲得の為に、免疫調節能を制御しているメカニズムの可能性が示唆された。しかしながら、今回の結果がこの後に続く組織再生にどのように有利に働くのかの検討には至っておらず、今後のさらなる検討が必要である。

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 2 件)

①古味佳子 マウス長管骨創傷治癒過程における宿主骨髄由来間葉系幹細胞がもたらす免疫寛容とそのメカニズム 岡山歯学会雑誌, 35, 1-15, 2016

②秋山謙太郎 古味佳子 窪木拓男 間葉系幹細胞の新しい機能-免疫細胞としての間葉系幹細胞 日本補綴歯科学会雑誌, 8(4), 2016

[学会発表] (計 3 件)

①古味佳子, 秋山謙太郎, 吉岡裕也, 國友雅義, 小盛大志, 國友由理, 大野充昭, 前川賢治, 窪木拓男 創傷治癒過程における宿主骨髄由来間葉系幹細胞がもたらす免疫寛容性とそのメカニズム. 日本補綴歯科学会学術大会 2016 年 7 月 6 日 金沢 (石川)

②秋山謙太郎 間葉系幹細胞免疫と骨代謝 日本整形外科学会基礎学術集会 2016 年 10 月 13 日 福岡国際会議場 (福岡市)

③秋山謙太郎, 古味佳子, 吉岡裕也, 國友雅義, 大野充昭, 窪木拓男マウス長管骨損傷モデルにおける炎症性サイトカインと宿主骨髄由来間葉系幹細胞への影響 日本骨免疫学会 2016 年 7 月 7 日 沖縄 (沖縄)

[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

秋山 謙太郎 (AKIYAMA KENTARO)

岡山大学病院・クラウンブリッジ補綴科・講師

研究者番号: 70423291

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し

(4) 研究協力者

窪木 拓男 (KUBOKI TAKUO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00225195

大野 充昭 (ONO MITSUAKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60613156

大島 正充 (OSHIMA MASAMITSU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：00548307