

氏名	古味 佳子
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5317号
学位授与の日付	平成28年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	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性とそのメカニズム
論文審査委員	松本 卓也 教授 西田 崇 准教授 窪木 拓男 教授

学位論文内容の要旨

【背景】

骨髄由来間葉系幹細胞は、自己複製能や多分化能に加えて、免疫調節能を持つ細胞群である。これらの機能を応用した組織再生療法や全身性幹細胞移植療法の実用化が広く検討されているものの、移植コストや幹細胞の性質の維持等、解決すべき問題が多数存在するのが現状である。これらの幹細胞移植療法の問題点を改善する試みとして、宿主免疫応答の調節や移植幹細胞の質の向上の検討が報告されている。さらには、組織損傷部位に誘導・集積する事が報告されている宿主未分化間葉系幹細胞を応用することで、組織再生や疾患の改善に繋げようとする試みも始まりつつある。しかしながら、炎症性サイトカインが豊富な組織創傷治癒部位に集積した宿主幹細胞が、損傷組織中でどのような影響を受け、その結果、幹細胞の多分化能や免疫調節能が組織再生にどのように寄与するのかについては十分な理解が得られていない。そこで本研究では、創傷治癒部位における宿主間葉系幹細胞の集積、炎症性サイトカインが集積幹細胞に与える影響、宿主間葉系幹細胞が免疫寛容性に寄与するメカニズムを検討した。

【材料および方法】

- 1. マウス創傷治癒モデル：**全身麻酔下でC57BL6/Jマウスの大腿骨を露出させた後、直径1.0 mmのラウンドバーを用いて、大腿骨皮質骨腹側を穿孔した。穿孔後1, 3, 5, 7日に屠殺し、以降の実験に使用した。なお、本研究は、岡山大学動物実験委員会承認（OKU-2013397）のもと実地した。
- 2. 組織学的検討：**創傷治癒モデルの大腿骨を凍結包埋し、川本法に準じて切片を作製し、HE染色、免疫組織化学染色にて創傷治癒過程におけるCD146陽性細胞ならびに炎症生サイトカイン（TNF- α ）の組織学的検討を行った。
- 3. 細胞表面抗原解析およびアポトーシス検出：**創傷治癒モデル大腿骨骨髄の間葉系幹細胞表面抗原（CD146, CD90, Sca-1）およびT細胞アポトーシスをフローサイトメトリーにて解析した。

4. 炎症性サイトカインの遺伝子発現解析：創傷治癒過程の炎症性サイトカイン（Il-1b, Il-6, Ifn-g, Tnf-a）の遺伝子発現をリアルタイムRT-PCRを用いて検討した。
5. 細胞の分離・培養：C57BL6/Jマウス大腿骨からマウス骨髄由来間質細胞（mBMSCs）をFriedensteinらの方法によって単離，培養し以降の実験に使用した。
6. *In vitro*におけるTNF- α の細胞表面抗原発現に与える影響：TNF- α （ 10^{-20} ng/mL）のmBMSCsの細胞表面抗原（CD146）発現に与える影響をフローサイトメトリーにて検討した。
7. *In vitro*におけるTNF- α の細胞増殖能および走化性に与える影響：TNF- α のmBMSCsの細胞増殖能に与える影響をMTS試験にて，走化性に与える影響をスクラッチアッセイ法にてそれぞれ検討した。
8. *In vitro*におけるTNF- α の免疫抑制能に与える影響：TNF- α のmBMSCsの免疫抑制能に与える影響を検討するために，FasLの発現をフローサイトメトリーならびに免疫細胞化学染色にて解析した。さらに，T細胞と共培養し，T細胞のアポトーシス誘導ならびに制御性T細胞の分化誘導に与える影響をフローサイトメトリーにて検討した。
9. 統計解析：統計学的有意性は，one-way ANOVA, unpaired-*t* 検定にて評価した。

【結果と考察】

1. 創傷部位におけるCD146陽性細胞数の増加

マウス大腿骨穿孔後の大腿骨治癒過程におけるCD146陽性細胞の集積，CD146，CD90，Sca-1陽性かつ，Lineage陰性細胞の数は，穿孔後1日をピークに増加し，その後減少していたことが明らかとなった。

2. 創傷大腿骨のmBMSCsにおける幹細胞性の検討

創傷治癒過程の各タイムポイントから単離・培養したmBMSCsのCD146の発現は有意な差は認められず，細胞走化性は穿孔後3日をピークに移動細胞数が有意に上昇し，穿孔後7日では，穿孔前と同程度まで減少する事が明らかとなった。

3. 創傷大腿骨の骨髄細胞における炎症性サイトカインの発現解析

炎症性サイトカイン（Il-1b, Il-6, Ifn-g, Tnf-a）の遺伝子発現は穿孔後1日目に有意に上昇し，その後減少していることが明らかとなった。同様に，TNF- α の免疫組織化学染色においても穿孔後1日で炎症性サイトカインの増加している像が観察された。

4. 非創傷大腿骨から採取，培養したmBMSCsの幹細胞性に及ぼすTNF- α 刺激の影響

mBMSCsをTNF- α （10 ng/mL）にて24時間刺激するとCD146の発現が上昇した。また，TNF- α 刺激したmBMSCsは無刺激と比較して，有意に細胞増殖が抑制されており，細胞走化性が有意に高いことが明らかとなった。さらに，TNF- α 刺激群は無刺激群と比較してFasLの発現上昇が認められ，TNF- α 刺激したmBMSCsとT細胞を共培養するとT細胞アポトーシスならびに制御性T細胞の分化誘導が促進される事が明らかとなった。

5. 創傷大腿骨骨髄におけるFasL陽性mBMSCs数とT細胞アポトーシスの変化

創傷大腿骨骨髄におけるFasL陽性幹細胞は穿孔後1日目をピークとして有意に増加し，それに伴ってアポトーシスT細胞の増加，T細胞数が減少することが明らかとなった。

創傷治癒部位における炎症性サイトカインは組織損傷後に増加し，同時に宿主間葉系幹細胞が集積する事が確認された。*In vitro*におけるTNF- α が，mBMSCsの増殖能を抑制し，

走化性を促進することから、炎症性サイトカインによって損傷部位周囲の宿主間葉系幹細胞の集積が誘導された可能性が考えられる。そして、FasLの発現を促進することで宿主T細胞のアポトーシスを誘導し、炎症を調節している可能性が示唆された。しかしながら、創傷治癒部位での抗炎症作用がどのように組織再生の効率化につながるか、集積間葉系幹細胞がT細胞のアポトーシスを誘導した後、どのような運命をたどるのか等、今後の十分な検討が必要であると考えられる。

【結論】

マウス大腿骨創傷治癒過程において、穿孔1日後に宿主間葉系幹細胞が集積することが確認された。炎症性サイトカインのひとつであるTNF- α は、*in vitro*においてmBMSCsのCD146とFasLの発現を上昇させることが明らかとなった。また、創傷治癒過程においては穿孔1日後にFasL陽性細胞数の増加を認め、3日後にT細胞アポトーシスの誘導が促進されたことから、集積間葉系幹細胞による創傷治癒部位の免疫調節作用発現の可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

本論文は、マウス大腿骨穿孔モデルを用いて、創傷治癒部位に集積する宿主間葉系幹細胞の役割と創傷治癒過程で産生される炎症性サイトカインが集積間葉系幹細胞に与える影響を明らかにした研究であり、宿主間葉系幹細胞の機能である免疫調節機構の分子メカニズムの一端を解明した極めて新規性の高い論文である。これまで幹細胞研究は、その多分化能を応用した組織再生療法に焦点が当てられてきたが、近年、幹細胞に宿主免疫を調節する機能があることが明らかになりつつあり、この幹細胞の新機能の解明に幹細胞研究の焦点が移りつつある。しかしながら、炎症性サイトカインの豊富な創傷治癒部位に集積した宿主幹細胞が、どのような影響を受け、宿主免疫の抑制にどのように寄与するのかについては十分な理解が未だ得られていない。本論文は、この問題点を解明すべく、炎症性サイトカインの代表であるTNF- α と宿主間葉系幹細胞の関係を詳細に検討し、創傷治癒過程における免疫調節のメカニズムについて新たな知見を報告している。以下にその知見を示す。

マウス創傷治癒モデルとして、全身麻酔下でC57BL6/Jマウスの大腿骨をラウンドバーにて穿孔し、穿孔後1, 3, 5, 7日で安楽死させ、組織を採取した。未穿孔群をコントロール群として比較した。

1. 創傷治癒部位における炎症性サイトカイン (TNF- α) は組織損傷後1日で増加し、TNF- α によって、CD146陽性宿主間葉系幹細胞が集積する事を免疫組織染色ならびにフローサイトメトリー解析で明らかにした。さらに、IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α の炎症性サイトカインの遺伝子発現レベルをリアルタイムRT-PCR法にて解析し、穿孔後1日で上昇している事を明らかにした。
2. *In vitro*において、TNF- α 刺激 (10 ng/mL, 24時間) はマウス骨髄間質細胞 (mBMS Cs) の増殖能 (MTS法にて評価) を抑制し、移動能 (スクラッチアッセイ法にて評価) を促進した。さらに、TNF- α で刺激されたmBMSCsでは免疫抑制作用に重要なFasLの発現が促進 (フローサイトメトリーにて評価) され、その結果として共培養したT細胞のアポトーシスを誘導することを明らかにした。
3. マウス創傷治癒モデルでは、穿孔後1日でFasL陽性宿主幹細胞が増加し、穿孔後3日ではCD3陽性T細胞数の減少及びアポトーシスT細胞の増加 (フローサイトメトリーにて評価) が確認された。

以上の結果から、創傷治癒部に集積した宿主間葉系幹細胞は炎症性サイトカイン (TNF- α) の影響により FasL 発現を上昇させ、隣接する CD3 陽性 T 細胞のアポトーシスを誘導することで宿主免疫の抑制作用を増強することが示唆された。本論文は創傷治癒部に集積した宿主幹細胞の免疫調節作用におけるメカニズムに新たな知見をもたらしており、審査委員会は本論文を博士 (歯学) の学位論文として十分な価値があることを認める。