

氏名	國友 雅義
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5493号
学位授与の日付	平成29年3月24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	マウス骨髄由来間葉系幹細胞の免疫調節能と年齢
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、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試みられているものの、移植コストや幹細胞の質の維持等、解決すべき問題が存在するのが現状である。一方、間葉系幹細胞機能に影響を及ぼす因子の一つとして、宿主の年齢との関連性が示唆されているものの、その詳細はほとんど明らかにされていない。そこで、本研究では、週齢の異なるマウスの骨髄の形態計測学的検討に加え、骨髄由来間葉系幹細胞を抽出し、週齢の違いが、間葉系幹細胞の免疫調節能や幹細胞性にどのような影響を及ぼすか検討した。

### 【材料および方法】

1. 実験動物: 5週齢ならびに40週齢C57BL6/Jマウス(雌)大腿骨より骨髄由来間葉系幹細胞(BMSCs)を単離・培養し、実験に使用した。また、出血性大腸炎モデルは、8週齢マウスに2%デキストラン硫酸ナトリウム水溶液を経口摂取させることで誘導した。本研究は、岡山大学動物実験委員会承認(OKU-2015187)のもと実施した。

2. 大腿骨のマイクロCTならびに組織学的解析: それぞれの週齢のマウス大腿骨を採取し、マイクロCTにて骨量を、組織切片作製後、ヘマトキシリン・エオジン染色にて組織学的解析を行った。

3. BMSCsの単離・培養: それぞれの週齢のマウス大腿骨より、BMSCsを既報の方法(Friedenstein et al, 1974)によって単離、培養し、コロニー形成能を有する付着細胞群を獲得した。実験に必要な細胞数が得られるまで継代し、P2を以降の実験に使用した。

4. 細胞表面抗原解析による幹細胞性の評価: それぞれの週齢のBMSCsの表面抗原を解析することで幹細胞性を評価した。すなわち、BMSCs陽性抗原として、CD146, Sca-1, CD44を、陰性抗原として、CD34, CD14の発現をフローサイトメトリーにて解析した。

5. 多分化能の評価: それぞれの週齢のBMSCsの多分化能を、骨芽細胞分化誘導および脂肪細胞分化誘導にて検討した。骨芽細胞分化誘導培地にて28日間培養し、アリザリンレッド染色にてカルシウム塩の沈着、ならびにリアルタイムPCR法にて*alp*, *ocn*の遺伝子発現を評価した。同様に脂肪細胞分化誘導培地にて5日間培養し、オイルレッド染色にて脂肪滴形成、ならびに*lpl*, *ppary*の遺伝子発現をリアルタイムPCR法にて評価した。

7. 免疫調節能の評価(*in vitro*): BMSCsの免疫調節能を評価する為に、それぞれ

の週齢のBMSCsが産生する，抗炎症性サイトカイン (*il2, il10, tgfb1, hgf*) の遺伝子発現をリアルタイムRT-PCRを用いて比較した。また，免疫調節能の指標としてが重要であることが報告されているFasL, MCP-1の発現をフローサイトメトリー解析にて検討した。さらには，FasL, MCP-1が発現した結果生じる免疫調節能を*in vitro*で評価するために，BMSCsをT細胞と共培養し，T細胞のアポトーシス誘導をフローサイトメトリーで，T細胞遊走誘導をボイデンチャンバー法にて評価した。

8. 免疫調節能の評価 (*in vivo*) : それぞれの週齢のBMSCsの*in vivo*での免疫調節能を評価する為に，デキストラン硫酸ナトリウム誘導出血性大腸炎モデル(n=3)にBMSCsを全身投与し，体重変化，下痢の有無，炎症性細胞の腸管への浸潤を評価した。PBS投与群を疾患コントロール群 (n=3) とし，大腸炎非誘導群をコントロール群 (n=3) とした。

9. BMSCsの細胞老化の評価 : 週齢の変化に伴うBMSCsの細胞老化の有無について，老化関連βgal 染色，ならびに老化関連因子として知られるP16, P21の発現をウエスタンブロッティング法にて評価した。統計解析には，one-way ANOVA，ならびにunpaired-*t*検定を用いた。

## 【結果】

1. マイクロCTならびに組織学的評価より，40週齢大腿骨は，5週齢と比較して，骨梁ならびに骨塩量の著明な低下や脂肪組織の増加を認めた。

2. 40週齢BMSCsは，5週齢BMSCsと比較して，幹細胞陽性マーカーの発現が低いことが明らかになった。

3. 40週齢BMSCsは，5週齢BMSCsと比較して，*ocn*の発現とカルシウム塩沈着が低く，骨芽細胞分化能が低下していることが明らかになった。反対に，*ppary*の発現，脂肪滴の形成が高く，脂肪細胞分化能が上昇していることが明らかになった。

4. 40週齢BMSCsは，5週齢BMSCsと比較して，*tgfb1*の遺伝子発現が低く，また，FasL, MCP-1の発現も低いことが明らかになった。さらには，*in vitro*において，T細胞のアポトーシス誘導や，T細胞遊走誘導能が低下していることが明らかになった。

5. デキストラン硫酸ナトリウム誘導出血性大腸炎モデルに対する全身性移植療法では，40週齢BMSCsは，5週齢BMSCsと比較して，体重減少抑制効果，大腸短縮化抑制効果，炎症性細胞の腸管への浸潤抑制効果について効果が認められなかった。

6. 40週齢BMSCsは，5週齢BMSCsと比較して，老化関連βgal陽性細胞の割合が高く，P16, P21の発現も高いことが明らかになった。

## 【考察とまとめ】

本研究では，宿主の年齢の違いが，間葉系幹細胞の幹細胞性や免疫調節能にどのような影響を及ぼすのかを明らかにすることを目的とし，週齢の異なるマウス BMSCs を比較した。その結果，週齢の高いマウス由来 BMSCs では，①骨芽細胞分化が低下していること，②脂肪細胞分化が上昇していること，③免疫調節能が低下していることが明らかとなった。このことから，骨組織再生を目的とした組織再生療法や，全身性免疫疾患に対する移植療法においては，宿主年齢の高い BMSCs は，期待される治療効果が得られない可能性が示唆された。宿主の年齢がどのようなメカニズムで幹細胞機能に影響を与えるのか，今後の更なる検討が必要である。

## 論文審査結果の要旨

現行の骨髄由来間葉系幹細胞を利用した組織再生療法や免疫寛容性獲得療法は、劇的な効果をもたらす例がある一方で、移植幹細胞の死滅や肺塞栓症などの有害事象、さらには安定した組織再生効果が得られないなどの問題を生じることがある。それらの一因として、移植幹細胞の機能低下による治療効果の減退が考えられている。本学位申請者は、幹細胞機能に影響を与える因子として考えられている宿主の年齢に着目し、週齢の異なるマウス骨髄由来間葉系幹細胞（以下**mBMSCs**）の多分化能、免疫調節能の変化を検討、報告した。以下にその内容を示す。

1. 週齢の異なる（5週齢および40週齢）C57BL6/j マウス大腿骨を採取し、マイクロCT解析を行った。その結果、40週齢大腿骨は、5週齢と比較して、骨髄腔内における海綿骨梁、骨密度が有意に低く、海綿骨梁間距離が長いことがわかった。また、組織切片を作製し、HE染色による解析を行うと、40週齢大腿骨は、5週齢と比較して、骨髄中に脂肪組織の分布が広く観察された。このことから、同じ**mBMSCs**でも、宿主の週齢によりその採取環境が大きく異なることが明らかになった。
2. 40週齢**mBMSCs**は、5週齢と比較して、幹細胞陽性抗原であるCD146、SCA-1、CD44の発現が低く、幹細胞性が低下している可能性が示唆された。
3. 40週齢**mBMSCs**は、5週齢と比較して、骨芽細胞分化の指標となるオステオカルシンの発現が低く、アリザリンレッド染色による石灰化物の沈着も少ないことが分かった。一方、脂肪細胞分化では、PPAR $\gamma$ の遺伝子発現が高く、オイルレッド染色による脂肪滴の形成も多く観察された。
4. 40週齢**mBMSCs**は、5週齢と比較して、TGF $\beta$ -1の遺伝子発現、FASL、MCP-1の表面抗原発現が低いことが分かった。*In vitro*におけるT細胞共培養試験においても、40週齢**mBMSCs**は、5週齢と比較して、T細胞のアポトーシス誘導、遊走誘導作用が低いことが明らかになった。
5. 大腸炎モデルに対する治療効果では、40週齢**mBMSCs**投与群は、5週齢投与群と比較して、体重減少抑制、大腸の短縮化抑制効果が見られず、また、大腸の組織学的解析においても上皮の破壊や炎症性細胞の浸潤が対照群同様多く観察されたことから、治療効果が低いことが明らかになった。

以上より、週齢の高いドナーの**mBMSCs**は、分化培地で培養した際の骨芽細胞分化能が低下し、さらには免疫調節能も低下している可能性が示唆された。本論文は、間葉系幹細胞を応用した組織再生療法や免疫寛容性獲得療法を実施する際には、幹細胞ドナーの年齢を十分に考慮する必要があるという、新たな知見をもたらすに至っている。したがって、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。