

# 学位論文

間葉系幹細胞集塊 Clumps of MSCs/ECM  
complex (C-MSC)を用いた他家細胞移植骨  
再生療法の基礎研究

学位申請者 竹下 慶

広島大学大学院医歯薬保健学研究科  
応用生命科学部門 歯周病態学研究室

(主任指導教員：栗原 英見 教授)

2015年度

本論文の要旨は以下の学会において発表した。

第 35 回 日本炎症再生学会

(2014 年 7 月 沖縄)

第 53 回 広島大学歯学会

(2014 年 11 月 広島)

第 58 回 春季日本歯周病学会

(2015 年 5 月 千葉)

第 88 回 日本組織培養学会

(2015 年 5 月 広島)

## 謝 辞

本研究に際し、ご指導ならびに御校閲を賜りました本学大学院応用生命科学部門歯周病態学研究室 栗原 英見 教授に深甚なる感謝の意を表します。また、研究遂行ならびに本論文作成において、ご教示、ご鞭撻頂きました本学大学院基礎生命科学部門 加藤 功一 教授、硬組織代謝生物学研究室 吉子 裕二 教授、統合健康科学部門歯髄生物学講座 柴 秀樹 教授、応用生命科学部門歯科矯正学講座 谷本 幸太郎 教授、応用生命科学部門口腔外科学講座 武知 正晃 准教授に深厚なる謝意を表します。さらに本研究の遂行、および本論文の作成にあたり終始御指導、御助言を頂きました本学大学院応用生命科学部門歯周病態学研究室 加治屋 幹人 助教に深く感謝いたします。

また、本研究を進めるに際し多大なる御支持を頂きました本学大学院応用生命科学部門の皆様には厚く御礼申し上げます。

最後に、勉学、研究の機会を与えると共に、常に私を支えてくれた父・哲、母・暢子に心から感謝致します。

2016年1月

広島大学大学院 医歯薬保健学研究科  
応用生命科学部門 歯周病態学研究室

竹下 慶

## 目 次

第一章 緒 論	8
第二章 IFN- $\gamma$ 刺激したヒト C-MSc の免疫調節能の検討	
第一節 IFN- $\gamma$ 刺激したヒト C-MSc の免疫調節性酵素 IDO 発現の検討	
1. 概 要	13
2. 材料と方法	
1) ヒト骨髄間葉系幹細胞 (hMSCs) の培養法	13
2) 細胞集塊 C-MSc の作製法	14
3) Real-time PCR 法	14
4) Western blotting 法	15
5) IDO activity assay	16
6) 統計解析	16
3. 結 果	16
第二節 ヒト C-MSc $\gamma$ の T 細胞活性に対する影響の検討	
1. 概 要	17
2. 材料と方法	
1) PBMC と C-MSc $\gamma$ の共培養	17
2) 細胞増殖能の評価	18
3. 結 果	18
第三節 考 察	18

### 第三章 IFN- $\gamma$ 刺激したヒト C-MSC の骨関連タンパク mRNA 発現の検討

#### 第一節 ヒト C-MSC $\gamma$ の骨関連タンパク mRNA 発現の検討

1. 概要 . . . . . 20
2. 材料と方法
  - 1) C-MSC の作製法 . . . . . 20
  - 2) Real time PCR 法 . . . . . 20
3. 結果 . . . . . 21

#### 第二節 考察 . . . . . 21

### 第四章 ヒト C-MSC $\gamma$ 異種移植における骨再生効果の検討

#### 第一節 マウス頭蓋骨小規模欠損モデルにおけるヒト C-MSC $\gamma$ 移植

##### 骨再生効果の検討

1. 概要 . . . . . 22
2. 材料と方法
  - 1) ヒト C-MSC $\gamma$  の作製 . . . . . 22
  - 2) マウス頭蓋骨小規模欠損の作製とヒト C-MSC $\gamma$  移植 . . . . . 22
  - 3) 組織学的観察 . . . . . 23
3. 結果 . . . . . 23

## 第二節 マウス頭蓋骨大規模欠損モデルにおけるヒト C-MSCG 移植

### 骨再生効果の検討

1. 概 要 . . . . . 24
2. 材料と方法
  - 1) ヒト C-MSCG の作製 . . . . . 24
  - 2) マウス頭蓋骨大規模欠損の作製とヒト C-MSCG 移植 . . . . . 24
  - 3) micro CT 解析法 . . . . . 25
  - 4) 組織学的観察 . . . . . 25
3. 結 果 . . . . . 25

## 第三節 ヒト C-MSCG 異種移植における炎症性細胞浸潤および T 細胞分布の検討

1. 概 要 . . . . . 26
2. 材料と方法
  - 1) ヒト C-MSCG の作製 . . . . . 26
  - 2) マウス頭蓋骨小規模欠損の作製とヒト C-MSCG 異種移植 . . . . . 26
  - 3) 組織学的観察 . . . . . 26
  - 4) 免疫組織化学染色 . . . . . 27
3. 結 果 . . . . . 27

## 第四節 考 察 . . . . . 28

第五章 総括 . . . . . 30

第六章 参考文献 . . . . . 31

## 第一章 緒論

歯周炎は歯周病原細菌の感染とそれに対する宿主の免疫応答の結果、歯周組織の破壊が起こる炎症性の疾患である。歯周炎の進行は、歯を支える歯槽骨の吸収、歯周靭帯の損傷を引き起こし、放置すると歯の喪失に至り咀嚼機能低下、審美障害そして発音障害などの障害を招く。また、歯周炎は心疾患や脳血管疾患、糖尿病、関節リウマチ、早産／低体重児出産など様々な全身疾患の発症や進行に関わっている（Pihlstrom et al. 2005、Kuo et al. 2008、Bassani et al. 2007）。一般的な歯周治療としてブラッシングやスケーリング・ルートプレーニングによる細菌バイオフィルムの除去が行われる。軽度の歯周炎ではこれらの治療によって炎症を消褪させることはできる。しかし、組織破壊の進行した重度の歯周炎では喪失した歯槽骨や歯周靭帯の組織再生およびその機能を回復することは難しく、歯周炎の再発のリスクは残ったままとなる。すなわち、破壊された歯周組織に感染する嫌気性の歯周病原性細菌の排除は困難となり、慢性炎症が持続する。さらに一般的な歯周治療では欠損部に侵入した上皮によって歯周組織再生に必要な細胞が歯根面に遊走できない。以上のことから、歯周炎によって破壊された歯周組織の構造および機能を回復する歯周組織再生療法が必要である。

現在臨床応用されている歯周組織再生療法として、上皮の侵入を抑制することによって内在性の細胞の遊走を助け、再生の足場を提供する。この治療法には Guided Tissue Regeneration (GTR) 法 (Christgau et al. 2002、Stoller et al. 2001) や



エナメルタンパクを主成分とするブタ幼若歯胚抽出物を局所投与することによって内在性細胞を制御し組織再生を促すエムドゲイン法 (Kalpidis et al. 2002) が挙げられる。また、新しい再生療法として、サイトカインや細胞を用いた方法が開発されている。サイトカイン療法は単一の遺伝子組み換えヒト型タンパク質を使用することによって、科学的根拠が明確で品質が保証されており、術式が容易でプロトコール主導の治療を提供することを目指している。現在 basic-fibroblast growth factor (Takayama et al. 2002、Murakami et al 2003)、bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) (Selvig et al. 2002、Blumenthal et al. 2002、Wikesjö et al. 2003)、platelet-derived growth factor (Camero et al. 2003、Nevins et al. 2003)、brain-derived neurotrophic factor (Kurihara et al. 2003、Takeda et al. 2005) など多くのサイトカインの基礎・臨床研究が行われている。サイトカイン療法は、内在性細胞の制御によって再生を促すため、小・中規模の欠損に適している。しかし、広範囲で平坦な大規模歯周組織欠損に対しては十分な再生は期待できない。臨床では、1 壁性骨欠損や水平性骨吸収など、広範囲にわたる歯周組織破壊が多く認められる。そのため、大規模欠損における歯周組織再生療法の確立が必要である。大規模欠損の再生には、再生に関与する細胞を補充する細胞治療が適していると考えられる。

細胞治療の最大の特徴は、生体外で細胞を加工できることである。この特徴を利用すれば、歯周組織欠損の大きさや形態に合わせて細胞を供給することができる。歯周組織はセメント質、歯周靭帯、歯槽骨、歯肉結合組織といった軟組織と硬組織で構成されており、これらの複雑な組織を再生させるために多分化能を有する幹細胞が適していると考えられる。多分化能を持つ細胞として、胚

性幹細胞 (embryonic stem cells : ES 細胞) (Thomson et al. 1998)、組織幹細胞、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells : iPS 細胞) (Takahashi and Yamanaka 2006、Takahashi et al. 2007) が挙げられる。ES 細胞を作製するためにはヒトの卵子が必要であること、また ES 細胞および iPS 細胞は奇形種形成の危険性があり倫理面・安全性の問題から現時点で歯周組織再生に用いるのは困難である。組織幹細胞は腸、皮膚、骨髄、肝臓、大脳や膵臓などの組織、器官に存在し、通常の新陳代謝や創傷治癒において日常的に増殖・分化していると考えられている。特に間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells: MSCs) は骨、軟骨、筋組織、線維、腱、脂肪組織などの間葉組織や神経細胞に分化する (Pittenger et al. 1999) ことが報告されており、現時点において骨や歯周組織再生を目的とした細胞治療の細胞源として有用である。

これまでの基礎研究で、骨髄由来の MSCs をアテロコラーゲンゲルと混和してビーグル犬の実験的歯周組織欠損に自家移植したところ、MSCs 移植群は移植後 4 週目で対照のアテロコラーゲン群と比較してセメント質、歯槽骨再生が有意に促進した (Kawaguchi et al. 2004)。また、green fluorescent protein (GFP) を遺伝子導入した MSCs を移植したところ、移植後 4 週目において再生された歯周組織の構成細胞、すなわちセメント芽細胞、骨芽細胞、骨細胞、歯周靭帯中の線維芽細胞が GFP 陽性を示した。この結果から、移植部位局所で MSCs が増殖・分化することで歯周組織再生に関与することが示唆された (Hasegawa et al. 2006)。さらに、ビーグル犬を用いた実験的歯周炎モデルにおいて MSCs 移植を行った結果、移植後 2 週目の早期にセメント質と歯周靭帯の再生が起こり、歯槽骨の再生はその後に続けて起こる事が明らかとなった。さらに、より効率的

に骨再生を促すために、 $\beta$ リン酸三カルシウム ( $\beta$ -TCP) を併用して MSCs 移植したところ、移植後 4 週目から十分な新生骨の形成が得られたが、移植 8 週以降において、生体内で代謝されずに残存する  $\beta$ -TCP や骨や歯根のアンキローシスが散見された (Nagahara et al. 2015)。このことは、担体として用いる人工足場材料の解決すべき問題点である。つまり、人工の足場材料を用いない細胞移植治療法の開発がなされれば、より効果的な再生医療の実現につながると考えられる。

そこで、これまでに私たちの研究室では MSCs と自己産生された細胞外基質からなる細胞集塊、Clumps of MSCs/ECM complex (C-MS C)、を作製した。C-MS C は直径 1 mm 程度の細胞外基質に内包された細胞集塊であり、酵素処理によって細胞を培養皿から剥離する必要がなく、人工の足場材料を用いる必要もなく、その大きさと形状から良好な操作性を有し組織欠損部に直接移植することができる。さらに C-MS C は *ex vivo* で骨分化誘導をかけることが可能で、従来の MSCs 移植より効率的に骨再生を誘導できることを報告した (Kittaka et al. 2015)。

一方、高齢者や骨髄関連疾患を有する患者からは十分な MSCs を採取できないため、上述してきた再生医療を適用できない可能性がある。このような症例に対して MSCs を安価で確実に供給する他家細胞移植療法のために、MHC class マッチする幹細胞のバンキングが進められている。しかし、MHC class マッチしたとしてもマイナー抗原に起因する拒絶反応のリスクが残る。ここで注目すべきことに、MSCs は分化能を有するのみならず、種々のサイトカインを産生し免疫制御能を発揮するという報告が数多くなされている (Sharma RR et al. 2014、Wang et al. 2014)。特に IFN- $\gamma$  で刺激された MSCs は免疫調節性酵素インドール

アミン 2, 3 ジオキシゲナーゼ (IDO) を高発現し、活性化 T 細胞や樹状細胞の抑制、また制御性 T 細胞を誘導することが数多く報告されている (Krampera et al. 2006)。近年、上述の移植拒絶のリスクを減弱させるため IFN- $\gamma$  前処理することで MSCs の免疫調節能を向上させ、他家移植に利用する試みがなされている。

そこで本研究では、他家細胞移植歯周組織再生療法の確立のための基礎研究として、IFN- $\gamma$  前処理で免疫調節性酵素 IDO を高発現させたヒト C-MSC (C-MSC $\gamma$ ) を作製し、マウス頭蓋骨欠損に対する異種細胞移植による骨再生効果を検討した。

## 第二章 IFN- $\gamma$ 刺激したヒト C-MSc の免疫調節能の検討

### 第一節 IFN- $\gamma$ 刺激したヒト C-MSc の免疫調節性酵素 IDO 発現の検討

#### 1. 概要

これまでに平面培養された MSCs は、IFN- $\gamma$  刺激を受けることで IDO を高発現し、免疫調節性に作用することが多数報告されている。しかし C-MSc は三次元で球状という立体的な環境で培養されるため、細胞機能発現に影響を与える可能性が考えられる。そこで IFN- $\gamma$  刺激したヒト C-MSc の IDO 発現レベルを、Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) 法、Western blotting 法によって検討し、さらにその IDO 活性を計測した。

#### 2. 材料と方法

##### 1) ヒト骨髄間葉系幹細胞 (hMSCs) の培養法

細胞は理研(東京)から提供されたヒト腸骨由来の MSCs を使用した。培養は、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma, Steinheim, Germany) に 10% fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT)、100 U/ml penicillin (Sigma)、100  $\mu$ g/ml streptomycin (Sigma)、500 ng/ml amphotericin B (Invitrogen, Carlsbad, CA) を添加したものを使用し、10 cm シャーレ (Corning, Corning, NY) 上で、37°C、5%CO<sub>2</sub> 気相下で行い、培地交換は 3 日毎に行った。7 代継代したものを hMSCs として以下の実験に用いた。

## 2) 細胞集塊 C-MSC の作製法

MSCs に ECM を産生させ、MSCs/ECM 複合体を形成するために、24well プレートに  $2 \times 10^5$  cells /well となるように MSCs を播種し、標準培地 (Hi glucose DMEM+ 10% FBS) に 50  $\mu$ g/ml のアスコルビン酸を添加したもので 4 日間培養した。その後、ウェルから MSCs/ECM 複合体を鈍的に剥離し、さらに標準培地に球状になるまで 3 日間培養することで得られた MSCs/ECM 複合体を細胞集塊 C-MSC とした。

## 3) Real-time PCR 法

C-MSC を DMEM のみで 2 回洗浄した後、無血清培地に変更した。IFN- $\gamma$  (Peprotech、Rockey Hill、NJ : 10 ng/ml) を 3、6、12、24 時間もしくは IFN- $\gamma$  (0、10、50、100 ng/ml) を培養終了 24 時間前から刺激した。培養終了後、PBS で C-MSC を 2 回洗浄し、ホモジナイザー (トミー精工、東京) で粉砕 (28 kHz、5 秒間) 後、RNA iso plus (タカラバイオ、大津) を用いて総 RNA を抽出した。RNA 濃度は分光光度計 (260 nm、280 nm) で測定し算出した。cDNA は Rever Tra Ace (東洋紡、大阪) を用いて 1.0  $\mu$ g の総 RNA から逆転写・合成し、Real-time PCR システム STEP ONE PLUS-D 式 (アプライドバイオシステム、Foster CITY、CA) を用いてリアルタイムでモニタリングし、mRNA 発現を定量的に解析した。IDO の mRNA 発現は、housekeeping gene である Gyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の mRNA 発現に対する比で表した。反応には表 1 に示すプライマーを用いて、94°C、20 秒間、62°C で 1 分間の反応を 40 サイクル (PCR) で行った。

#### 4) Western blotting 法

C-MSC を DMEM のみで 2 回洗浄した後、無血清培地に変更した。IFN- $\gamma$  (0、10、50、100 ng/ml) を培養終了 24 時間前から刺激した。培養終了後、細胞を 1xPBS で 3 回洗浄した後 RIPA (Radio-Immunoprecipitation Assay) lysis buffer (Pierce、Waltham、MA) で、細胞溶解液の回収を行った。回収したサンプルはホモジナイザー (トミー精工、東京) で粉砕 (28kHz、5 秒間) した後、2-メルカプトエタノールと LDS (Lithium Dodecyl Sulfate) sample buffer (Invitrogen、Buffalo、NY) を加え、95°C、4 分間加熱処理を行った。その後 15% polyacrylamide gel を用いて電気泳動 (12V、90 分間) を行い、ゲルに展開したタンパク質をニトロセルロースメンブレン (Bio-Rad Laboratories、Hercules、CA) に転写した。転写後ニトロセルロースメンブレンを 5%スキムミルク (和光純薬工業、大阪) 含有 Tris-buffered saline (TBS) -Tween (TBS-t) で常温、1 時間ブロッキングした。次に can get signal solution 1 (東洋紡、大阪) で希釈した rabbit anti-humanIDO antibody (1:2500、Abcam、Boston、MA)、mouse anti-human  $\beta$ -actin antibody (1:10000、SIGMA) を 4°C で一昼夜反応させた。その後メンブレンを TBS-t で洗浄し、horse-radish peroxidase (HRP) -conjugated secondary antibody (Anti-mouse IgG、HRP-linked Antibody、Peprotech) 含有 can get signal solution2 (東洋紡) を加え常温で 1 時間反応させた。反応後、メンブレンを TBS-t で洗浄し、ECL (Enhanced Chemiluminescence) (Bio-Rad Laboratories) を用いて化学発光させ、フィルムを感光させた。

### 5) IDO activity assay

C-MSC を DMEM のみで 2 回洗浄した後、無血清培地に変更した。IFN- $\gamma$  (0、10、50、100 ng/ml) を培養終了 24 時間前から刺激した。培養上清を回収しキヌレニンの産生量を調べることで、IDO の活性を計測した。すなわち、回収した培養上清 100  $\mu$ l に 50  $\mu$ l の 30% TCA (Trichloroacetic acid) (Sigma) を加え、室温、10,000  $\times$  g で 5 分間遠心分離を行った。その後、上澄み液を 75  $\mu$ l 回収し、これに等量のエールリッヒ試薬 (0.8% p-ジメチルベンズアルデヒド (Sigma) 含有酢酸溶液) を加え室温に静置した後に、波長 450nm の吸光度を測定した。キヌレニンの定量は、Sigma 社から購入したキヌレニン (0-150  $\mu$ M) を用いて検量線を作成し算出した。

### 6) 統計解析

Student の t 検定を用いて対照群との比較検定を行った。

## 3. 結果

Real-time PCR 解析では、IFN- $\gamma$  (10 ng/ml) で刺激した C-MSC の IDO mRNA 発現レベルは、時間依存的に上昇していた (図 1A.)。また、IFN- $\gamma$  (10、50、100 ng/ml) で 24 時間刺激した C-MSC の IDO mRNA 発現レベルは、無刺激群と比較して濃度依存的に上昇していた (図 1B.)。同様に、IFN- $\gamma$  刺激が C-MSC の IDO タンパク発現を明らかに増加させた (図 2A.)。さらに IFN- $\gamma$  刺激した C-MSC の培養上清中に、IDO の代謝産物であるキヌレニン量が増加していた (図 2B.)。



## 第二節 ヒト C-MSC $\gamma$ の T 細胞活性に対する影響の検討

### 1. 概要

IFN- $\gamma$  刺激したヒト C-MSC (C-MSC $\gamma$ ) が IDO を介して免疫調節能を発揮するかを調べるために、ヒト C-MSC $\gamma$  とヒト末梢血単核細胞 (PBMC) を共培養し、T 細胞の活性制御を検討した。

### 2. 材料と方法

#### 1) PBMC と C-MSC $\gamma$ の共培養

共培養にはポアサイズ 0.5  $\mu\text{m}$  の Transwell<sup>®</sup> (Corning) を用いた。健常人から採取した末梢血を同等量の Hsitolopaque<sup>®</sup> 1077 (Sigma, St. Louis, USA) と混和し、室温、1,500rpm、30 分間遠心分離し、滅菌パスツールピペットで単核細胞層を採取した。得られた単核細胞層と等量の RPMI 1640 (和光純薬工業、大阪) を混和し、室温、1,500rpm、10 分間で遠心分離し、細胞をペレット化させることで PBMC を得た。RPMI1640 で  $1 \times 10^6$  cells /well となるように調整された PBMC を、マウス抗ヒト CD3 抗体 (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ : BD Pharmingen<sup>™</sup>) でコートした Transwell<sup>®</sup> の下皿に播種し、さらにマウス抗ヒト CD28 抗体 (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ : BD Pharmingen<sup>™</sup>) を加えることで CD3/CD28 増殖刺激を行った。上皿には、IFN- $\gamma$  (0、10、50、100 ng/ml) で 24 時間前処理した C-MSC (以下各濃度で前処理されたものを C-MSC $\gamma$  (10、50、100) と表記) を置き 72 時間共培養を行った (図 3)。また IDO のインヒビターとして 1-methyltryptophan (1-MT) (Sigma Aldrich<sup>®</sup>) を 100  $\mu\text{M}$  で加えた。

## 2) 細胞増殖能の評価

C- $MSC\gamma$  と共培養後、下皿の CD3/CD28 増殖刺激をされた PBMC に BrdU (10  $\mu$ M) (Roche, Basel, Switzerland ; Cell proliferation ELISA, BrdU) を添加し更に 24 時間培養した。培養終了後、細胞の固定、DNA の変性を行い、抗 BrdU 抗体を加え、発色基質液を作用させ、370 nm の波長の吸光度を測定することで、DNA 合成量を定量化した。

## 3. 結果

CD3/CD28 抗体で刺激された PBMC の BrdU 取り込み量は、C- $MSC\gamma$  (50, 100) 共培養群において、有意に抑制された。さらに IDO インヒビターである 1-MT 添加が、その C- $MSC\gamma$  (50, 100) 共培養群による PBMC 増殖抑制効果を阻害した。通常の C- $MSC$  共培養群は、PBMC の BrdU 取り込み量に影響を与えなかった (図 4)。

## 第三節 考察

これまでに IFN- $\gamma$  刺激された平面培養 MSCs (MSCs- $\gamma$ ) が免疫調節性酵素 IDO を発現することが報告されている (Krampera. et al. 2006)。IDO はトリプトファンをキヌレニンに代謝する限速酵素であり、T 細胞の活性化に不可欠である必須アミノ酸のトリプトファンを枯渇させることによって、T 細胞の活性を抑制する (Maes et al. 2012)。本研究では、MSCs と自身が産生した細胞外基質からなる細胞集塊である C- $MSC$  における、IFN- $\gamma$  刺激時の IDO 発現について mRNA レベ

ル、タンパクレベル、IDO の活性を確認することで検討した。mRNA 発現レベル、タンパク発現レベルにおいても、IDO は無刺激群と比較し IFN- $\gamma$  刺激群で高発現していた。さらに Transwell<sup>®</sup>を用いた共培養の結果、IFN- $\gamma$  刺激した C-MSC、すなわち C-MSC $\gamma$  が CD3/CD28 刺激による T 細胞増殖活性を、IDO を介して抑制する可能性が示唆された。このことは、IFN- $\gamma$  刺激 MSCs (MSCs- $\gamma$ ) が IDO を介して T 細胞の活性化を抑制するという報告と一致する。一方、本研究では C-MSC の形態の点から PBMC との接触共培養は行わなかった。しかし、MSCs- $\gamma$  は IDO 以外に PD-L1 (Augello et al. 2005、Sheng et al. 2008、Luz-Crawford et al. 2012) を介したダイレクトコンタクトによって T 細胞活性抑制を行うことが知られている。C-MSC $\gamma$  も実際の移植組織中でダイレクトコンタクトによる T 細胞抑制を行う可能性がある。一方、通常状態の MSCs もある程度の免疫制御能を発揮するという報告がある (Le Blanc et al. 2007) が、それと異なり、本研究では C-MSC が T 細胞の活性を抑制することは無かった。このことは C-MSC は MSCs と異なった細胞機能を有する可能性を示唆した。

### 第三章 IFN- $\gamma$ 刺激したヒト C-MSC の骨関連タンパク mRNA 発現の検討

#### 第一節 ヒト C-MSC $\gamma$ の骨関連タンパク mRNA 発現の検討

##### 1. 概要

他家歯周組織再生医療のために、IFN- $\gamma$  刺激が C-MSC の硬組織形成能にどのような影響を与えるかを知る必要がある。そこでヒト C-MSC $\gamma$  の骨関連タンパク発現を検討した。

##### 2. 材料と方法

###### 1) C-MSC の作成法

C-MSC は第二章第一節に記載した方法で作製した。

###### 2) Real-time PCR 法

C-MSC を DMEM のみで 2 回洗浄した後、無血清培地に変更し、IFN- $\gamma$  (0、10、50、100 ng/ml) で培養終了 24 時間前から刺激した。第 2 章 1 節 4) で記載した方法で Osteopontin (OPN)、Osteocalcin (OCN)、Alkaline Phosphatase (ALP)、BMP-2 の mRNA 発現を解析した。mRNA 発現は housekeeping gene である Glycer-aldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の mRNA 発現に対する比で表した。PCR には表 1 に示すプライマーを用いて、94°C、20 秒間、62°C で 1 分間の反応を 40 サイクル (PCR) で行った。

### 3. 結果

IFN- $\gamma$  (0、10、50、100 ng/ml) で24時間刺激した C-MSC の OPN mRNA 発現レベルは、無刺激群と比較し濃度依存的に減少していた (図 5A.)。また OCN mRNA 発現レベルは、無刺激群と比較して、高濃度である IFN- $\gamma$  (100 ng/ml) 刺激時のみにおいて減少していた (図 5B.)。一方、ALP、BMP-2 mRNA 発現レベルは無刺激群と比較して有意な差は認められなかった (図 5C.および図 5D.)。

### 第二節 考察

本実験では、IFN- $\gamma$  刺激が骨関連タンパク質 mRNA 発現レベルにおよぼす影響を検討した。これまでに MSCs を高濃度 IFN- $\gamma$  (50 ng/ml 以上) で刺激することで、細胞死を誘導する Fas の分子発現を上昇させ、細胞死を抑制する TNFR2 や XIAP などの発現を減少させることが報告されている (Liu et al. 2011)。また骨形成に関しては、その促進因子である Runx2 を減少させ、阻害因子である Smad 6 を増加させることで、MSCs の石灰化能を減弱させるという事実がある (Liu et al. 2011)。本研究では、骨関連タンパク質 mRNA として、骨芽細胞分化前期・中期マーカーである ALP、OPN、BMP-2 を、分化後期マーカーとして OCN を調べた。その結果から、Liu らの報告と類似して、高濃度 IFN- $\gamma$  (100 ng/ml) で刺激した場合において、骨芽細胞分化後期マーカーである OCN mRNA が有意に減少することが確認された。第一節の検討結果から C-MSC $\gamma$  (100) は免疫調節能を有しているが、石灰化能の低下も生じるため、他家歯周組織再生療法においては有用でない可能性もある。

## 第四章 ヒト C-MSC $\gamma$ 異種移植における骨再生効果の検討

### 第一節 マウス頭蓋骨小規模欠損モデルにおけるヒト C-MSC $\gamma$ 移植骨再生効果の検討

#### 1. 概要

これまでに *in vitro* にて、C-MSC $\gamma$  が IDO を高発現し T 細胞の増殖を抑制することを示した。そこでマウス頭蓋骨欠損モデルにおけるヒト C-MSC $\gamma$  移植による骨再生促進能を、組織学的手法を用いて評価した。

#### 2. 材料と方法

##### 1) ヒト C-MSC $\gamma$ の作製

第一章と同様の方法で C-MSC を作製（第一章の項参照）し、IFN- $\gamma$  にて 24 時間刺激したものを移植体とした（C-MSC $\gamma$  移植群）。

##### 2) マウス頭蓋骨小規模欠損の作製とヒト C-MSC $\gamma$ 移植

実験には、雄の C57/BL6 マウス（6 週齢、14-19 g、広島実験動物研究所、広島）を 20 匹用いた。動物実験は広島大学自然科学研究支援開発センター生命科学研究所支援分野・ライフサイエンス教育研究支援部動物実験施設に基づいて行った。移植は、ネンブタール®（3 mg/100 g body weight）の腹腔内投与による全身麻酔下で行った。頭頂部に 2%キシロカインにて局所麻酔を施した後に、12 番のメスで皮膚を切開し、骨膜ごと剥離し、頭蓋骨を明示した。ラウンドバーにて注

水下で骨を切削し、直径 1.6 mm の骨欠損を作製、移植床とした (図 6A.)。骨欠損に対して C-MSC $\gamma$  を一つ (C-MSC $\gamma$  移植群)、あるいは前処理をしていない C-MSC (C-MSC 移植群) を移植し (図 6B.)、4-0 絹糸で縫合した。なお、骨欠損に何も移植しなかった群を Mock 群とした。

### 3) 組織学的観察

細胞移植後 4 週でマウスを屠殺。頭蓋骨を回収後 4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、10%エチレンジアミン四酢酸で 2 週間脱灰後、パラフィンに包埋し前頭断方面で厚さ 5  $\mu\text{m}$  の切片を作製した。パラフィン切片を脱パラフィン後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施した。光学顕微鏡 (ECLIPSE E600W、日本光学、東京) で観察し、同時にデジタル画像をコンピューター (DS-L3、NIKON) に取り込んだ。

## 3. 結果

Mock 群および C-MSC 移植群の再生骨は骨切除部表面の狭い範囲に限局していた (図 7A.および図 7B.)。一方、C-MSC $\gamma$  (10、50) 移植群では明らかな骨再生が観察され、さらに欠損残存部位には豊富な結合組織形成が認められた (図 7C.および図 7D.)。C-MSC $\gamma$  (100) では、Mock 群および C-MSC 移植群と同様に骨の再生は骨切除部表面の狭い範囲に限局していた (図 7E.)。

## 第二節 マウス頭蓋骨大規模欠損モデルにおけるヒト C-MSCy 移植骨再生効果の検討

### 1. 概要

第四章一節での結果から小規模欠損に対する異種 C-MSCy の移植による骨再生促進効果が示唆された。第二節では骨再生がより大きな骨欠損をマウス頭蓋骨に作製し、異種 C-MSCy 移植による骨再生促進効果を、組織学的手法を用いて評価した。

### 2. 材料と方法

#### 1) ヒト C-MSCy の作製

第一章と同様の方法で C-MSC を作製（第一章の項参照）し、IFN- $\gamma$  で 24 時間刺激したものを移植体とした（C-MSCy 群）。

#### 2) マウス頭蓋骨大規模欠損の作製とヒト C-MSCy 移植

第一節と同様の方法でマウス頭蓋骨を明示した。トレフィンバーにて注水下で直径 4.0 mm の骨欠損を作製、移植床とした（図 8A.）。骨欠損に対して C-MSCy を 16 個（C-MSCy 移植群）、あるいは前処理をしていない C-MSC を移植（C-MSC 移植群）し（図 8B.）、4-0 絹糸で縫合した。なお、骨欠損に何も移植しなかった群を Mock 群とした。



### 3) micro CT 解析法

細胞移植後 12 週でマウスを屠殺。マウス頭蓋骨を回収し、マイクロ CT (Skyscan 1176、Bruker、Kontich、Belgium) で撮影し、CT 解析ソフトで解析した。作製したマイクロ CT 像から骨欠損の面積と再生骨の面積を計測し、骨再生量を骨欠損面積に対する再生骨の面積の割合で表した。組織計測は画像解析ソフト image J (NIH、Bethesda、MD) を用いて行った。

### 4) 組織学的観察

第一節と同様の方法でパラフィン切片を作製し HE 染色を施した後に観察し、同時にデジタル画像をコンピューター (DS-L3、NIKON) に取り込んだ。

## 3. 結果

細胞移植後 12 週の HE 染色像 (図 10) から、Mock 群および C-MSC 移植群の再生骨は骨切除部表面の狭い範囲に限局していた (図 10A. および図 10B.) に対し、C-MSC $\gamma$  (10、50) 移植群において広い範囲での骨再生が観察された (図 10C. および図 10D.)。さらに C-MSC $\gamma$  (50) 移植群では欠損残存部位に豊富な結合組織も認められた (図 10D.)。また三次元の CT 画像解析においても、HE 染色像と同様に C-MSC $\gamma$  (10、50) 移植群は Mock 群および C-MSC 移植群 (図 9A. および図 9B.) と比較し広い範囲で骨再生が認められた (図 9C. および図 9D.)。また再生した骨面積においても C-MSC $\gamma$  (10、50) 移植群は C-MSC 移植群と比較して約 2 倍量の値を示した (図 9F.)。一方、C-MSC $\gamma$  (100) 移植群では Mock

群およびC-MSC移植群と同様に再生骨は既存骨表面の狭い範囲に限局していた  
(図 9. E)。

### 第三節 ヒト C-MSC $\gamma$ 移植における炎症性細胞浸潤および T 細胞分布の検討

#### 1. 概要

第四章第一節、二節にて、異種 C-MSC $\gamma$  移植は骨再生促進効果を示した。そのメカニズムを検討するために、移植早期における炎症性細胞浸潤および T 細胞の分布を HE 染色および、抗マウス CD3 抗体を用いた免疫染色によって観察した。

#### 2. 材料と方法

##### 1) ヒト C-MSC $\gamma$ の作製

第四章第一節と同様の方法で C-MSC $\gamma$  を作製し移植体とした。

##### 2) マウス頭蓋骨小規模欠損の作製とヒト C-MSC $\gamma$ 異種移植

第四章第一節と同様の方法で 1.6 mm 径の骨欠損を作製し、Mock 群、C-MSC 移植群、C-MSC $\gamma$  (10、50、100) 移植群を用意した。

##### 3) 組織学的観察

細胞移植後一週で HE 染色を施し、組織学的観察を行った (第一節 2-3) 組織学的観察 の項参照)。

#### 4) 免疫組織化学染色

免疫組織化学染色は、パラフィン切片を 60°C、30 分間インキュベートすることで抗原を賦活化させ、脱パラフィン後 0.1% Triton X 100 (Sigma) 処理を 10 分間行い、切片を PBS で洗浄後、1%ウシ血清アルブミン溶液を用いてブロッキングし、PBS で洗浄後、一次抗体を切片に反応させた。一次抗体として、抗 CD3 ウサギポリクローナル抗体 (abcam<sup>®</sup>、0.2 mg/ml) を 4°C で 8 時間反応させた。反応終了後、切片を PBS で洗浄し、二次抗体として Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 conjugated 抗ウサギ IgG 抗体 (Invitrogen、1:100) を室温で 4 時間反応させた。反応終了後、切片を PBS で洗浄し、DAPI fluoromount-G<sup>®</sup> (southern Biotech、CA) で封入した。骨欠損部位中の CD3 陽性細胞は、Zeiss LSM 510 laser scanning confocal microscope (Zeiss Microimaging、Inc.) を用いて観察した。

### 3. 結果

移植一週間後の HE 染色像から、C-MSC 移植群では Mock 群と比較し、C-MSC を移植したと考えられる部位に大量の炎症性細胞が浸潤した (図 12)。一方、C-MSC $\gamma$  (10、50、100) 移植群では、そのような炎症性細胞浸潤はわずかであった (図 13、14、15)。さらに、C-MSC $\gamma$  移植群 (図 13、14、15) において Mock 群 (図 11) および C-MSC 移植群 (図 12) と比較し著明な骨膜の再生が認められた。

CD3 の免疫染色像では Mock 群 (図 16) と比較して、C-MSC 移植群では移植をしたと考えられる部位へ多量の CD3 陽性細胞の浸潤を認めた (図 17)。一方、C-MSC $\gamma$  (10、100) 移植群においては CD3 陽性細胞の浸潤はわずかであり (図

18、20)、さらに C-MSCy (50) 移植群では CD3 陽性細胞の浸潤はほとんどなかった (図 19)。

#### 第四節 考察

本研究では、異種 C-MSCy 移植による骨再生促進効果を検討するために、マウス頭蓋骨小規模欠損および大規模欠損モデルを用いた。組織計測およびマイクロ CT の結果から、C-MSCy (10、50) 移植群は、C-MSC 移植群、Mock 群と比べて高い骨再生促進能を有することが示された。また C-MSCy (10、50) 移植群では作成した骨欠損部の骨形成に至らない部位においても豊富な結合組織像が観察された。さらに移植早期における観察結果において、異種 C-MSC 移植が炎症性細胞浸潤や T 細胞浸潤を誘導したのに対し、異種 C-MSCy 移植群ではそのような反応は認められなかった。これらのことからヒト C-MSC 移植はマウスの免疫システムを活性化し、組織修復が誘導できなかったのに対し、異種 C-MSCy 移植は、免疫応答や炎症反応を制御することで、確実な骨再生促進能を発揮できたと考えられる。

C-MSCy による移植部位における免疫制御は、IFN- $\gamma$  前処理によって高発現したIDO によるものと考えられる。この IDO は免疫調節能のみならず、組織修復の過程において重要な役割を担う M2 マクロファージを誘導することも知られている (Kim et al. 2009)。実際に、本研究において IDO を高発現した C-MSCy の移植が、移植後 1 週という治癒過程の早期において明らかな骨膜の再生を誘導した。これは C-MSC の移植では認められなかった現象であり、C-MSCy 特有

の反応であると考えられる。すなわち、IDO が修復性 M2 マクロファージを誘導することによって、組織再生促進に有効に働いたと考えられる。今後、このような組織修復のプロセスを調べることで、その詳細なメカニズムを明らかにすることが必要である。また C-MSCy 移植では T 細胞の活性を抑制し、異種移植拒絶反応を抑制したため、骨再生が効果的に行われた可能性が示唆された。

異種 C-MSCy 移植は直径 1.6 mm の小規模欠損は確実に再生させたのに対し、直径 4 mm の欠損は、約半分の再生にとどまり C-MSCy 移植でも直径 4 mm 欠損が経時的なクリティカルと考えられる。観察期間は 12 週としたが、マイクロ CT を用いた継時的観察の結果、移植後 8 週頃から欠損を約半分覆う骨再生を認めており（データ示さず）、すでに C-MSCy による骨再生は停止していたものと考えられる。このことは、IFN- $\gamma$  前処理が C-MSC の石灰化能を低下させてしまい、骨の大規模欠損では十分な骨再生を誘導できないことを示唆する。実際に、高濃度の IFN- $\gamma$  刺激（50 ng/ml 以上）が MSCs の石灰化能を低下させるという報告がある（Liu et al. 2011）。臨床応用を想定した場合、石灰化能を施した C-MSC の併用や、もしくは C-MSCy の免疫制御能を保持させつつ、石灰化誘導をさせたものを樹立する処理法が必要になる。

## 第五章 総括

他家細胞移植療法の確立を目指し、*ex vivo*にて IFN- $\gamma$  前処理することで免疫調節性酵素 IDO を高発現する C-MSCy を樹立し、その異種移植骨再生効果を検討した。すなわち、*in vitro*において、C-MSCy の IDO 発現量、T 細胞増殖抑制能、石灰化能を検討し、マウス頭蓋骨欠損モデルに対する異種 C-MSCy 移植の骨再生能・免疫制御能を調べ、以下の結果を得た。

- 1) C-MSCy は IDO を mRNA レベル、タンパクレベルで高発現しており、高い IDO 活性を有することが示された。
- 2) C-MSCy と CD3/CD28 増殖刺激した PBMC を、非接触共培養することによって、C-MSCy が T 細胞の活性を非接触的に抑制することが示された。
- 3) C-MSCy は高濃度 IFN- $\gamma$  刺激 (100 ng/ml) 時において骨関連タンパク発現が減少することが示唆された。
- 4) 異種 C-MSCy (10、50) 移植はマウス頭蓋骨における骨欠損を効果的に再生した。骨欠損内部の広い範囲で骨再生を促進しており、豊富な結合組織の再生も認めた。
- 5) 異種 C-MSCy 移植は、移植早期で骨膜を再生し、T 細胞の浸潤を抑制していた。

以上のことから、*ex vivo* で IFN- $\gamma$  前処理することで得られる異種 C-MSCy 移植は、骨再生を目的とした他家移植細胞治療に有用であることが示唆された。

## 第六章 参考文献

Augello A, Tasso R., Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, Pennesi G. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *European Journal of Immunology*, 35(5), 1482–1490.(2005)

Bassani, D. G., Olinto, M. T. & Kreiger, N. Periodontal disease and perinatal outcomes: a case-control study. *J Clin Periodontol* 34, 31-39, doi:10.1111/j.1600-051X.2006.01012.x (2007).

Blumenthal NM, Koh-Kunst G, Alves ME, Miranda D, Sorensen RG, Wozney JM, Wikesjo. Effect of surgical implantation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a bioabsorbable collagen sponge or calcium phosphate putty carrier in intrabony periodontal defects in the baboon. *J Periodontol* 73, 1494-1506, doi:10.1902/jop.2002.73.12.1494 (2002).

Camelo, M., Nevins, M. L., Schenk, R. K., Lynch, S. E. & Nevins, M. Periodontal regeneration in human Class II furcations using purified recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) with bone allograft. *Int J Periodontics Restorative Dent* 23, 213-225 (2003).

Celil, A. B. & Campbell, P. G. BMP-2 and insulin-like growth factor-I mediate Osterix (Osx) expression in human mesenchymal stem cells via the MAPK and protein kinase D signaling pathways. *J Biol Chem* 280, 31353-31359, doi:10.1074/jbc.M503845200 (2005).

Cha, C., Liechty, W. B., Khademhosseini, A. & Peppas, N. A. Designing biomaterials to direct stem cell fate. *ACS Nano* 6, 9353-9358, doi:10.1021/nn304773b (2012).

Christgau M, Bader N, Felden A, Gradi J, Wenzel A, Schmalz. Guided tissue regeneration in intrabony defects using an experimental bioresorbable polydioxanon (PDS) membrane. A 24-month split-mouth study. *J Clin Periodontol* 29, 710-723 (2002).

Duijvestein, M et al. Pretreatment with Interferon- $\gamma$  Enhances the Therapeutic Activity of Mesenchymal

Stromal Cells in Animal Models of Colitis 29(10): 1549-58 (2011)

Guo, Z. K., Liu, X. D., Hou, C. M., Li, X. S. & Mao, N. Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Differentiate into Neuron-Like Cells In Vitro. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 9, 91-92 (2001).

Hasegawa N, Kawaguchi H, Hirachi A, Takeda K, Mizuno N, Nishimura M, Koike C, Tsuji K, Iba H, Kato Y, Kurihara H. Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects. *J Periodontol* 77, 1003-1007, doi:10.1902/jop.2006.050341 (2006).

Heino, T. J., Hentunen, T. A. & Väänänen, H. K. Conditioned medium from osteocytes stimulates the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and their differentiation into osteoblasts. *Exp Cell Res* 294, 458-468, doi:10.1016/j.yexcr.2003.11.016 (2004).

Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I. & Bruder, S. P. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 64, 295-312 (1997).

Kalpidis, C. D. & Ruben, M. P. Treatment of intrabony periodontal defects with enamel matrix derivative: a literature review. *J Periodontol* 73, 1360-1376, doi:10.1902/jop.2002.73.11.1360 (2002).

Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N, Iwata T, Hamaguchi H, Shiba H, Takata T, Kato Y, Kurihara H. Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol* 75, 1281-1287, doi:10.1902/jop.2004.75.9.1281 (2004).

Kim J, Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: A novel type of alternatively activated macrophages *Experimental Hematology* 2009;37:1445–1453

Komori, T. Osteocyte development and death. *Kidney metabolic bone diseases* 21, 199-204 (2008).

Krampera M, Cosmi L, Angeli R, et al. Role for interferongamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 24 ( 2 ) :386-398, 2006



Kuo, L. C., Polson, A. M. & Kang, T. Associations between periodontal diseases and systemic diseases: a review of the inter-relationships and interactions with diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases and osteoporosis. *Public Health* 122, 417-433, doi:10.1016/j.puhe.2007.07.004 (2008).

Kurihara, H., Shinohara, H., Yoshino, H., Takeda, K. & Shiba, H. Neurotrophins in cultured cells from periodontal tissues. *J Periodontol* 74, 76-84, doi:10.1902/jop.2003.74.1.76 (2003).

Le Blanc K, Ringden O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med* (2007) Nov;262(5):509-2

Liu Y, Wang L, Kikuri T, Akiyama K, Chen C, Xu X, Yang R, Chen C, Wang S, Shi S. Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  *Nature medicine*. (2011) Nov 20;17(12):1594-601

Luz-Crawford P. Mesenchymal stem cells repress Th17 molecular program through the PD-1 pathway. *PLoS One*, 7(9), e45272 (2012)

Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 4, 415-428 (1998).

Maes M, Rief W. Diagnostic classifications in depression and somatization should include biomarkers, such as disorders in the tryptophan catabolite (TRYCAT) pathway. *Psychiatry Res* 196(2-3):243-9

Matsuguchi T. JNK signaling in osteoblast differentiation. *Seikagaku* 81, 703-707 (2009).

Murakami S, Takayama S, Kitamura M, Shimabukuro Y, Yanagi K, Ikezawa K, Saho T, Nozaki T, Okada H. Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs. *J Periodontal Res* 38, 97-103 (2003).

Nagahara T, Yoshimatsu S, Shiba H, Kawaguchi H, Takeda K, Iwata T, Mizuno N, Fujita T, Kurihara H. Introduction of a mixture of  $\beta$ -tricalcium phosphate into a complex of bone marrow mesenchymal stem

cells and type I collagen can augment the volume of alveolar bone without impairing cementum regeneration. *J Periodontol Res* , 86(3):456-64 (2015).

Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26, 101-106, doi:10.1038/nbt1374 (2008).

Nevins, M., Camelo, M., Nevins, M. L., Schenk, R. K. & Lynch, S. E. Periodontal regeneration in humans using recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) and allogenic bone. *J Periodontol* 74, 1282-1292, doi:10.1902/jop.2003.74.9.1282 (2003).

Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S. & Johnson, N. W. Periodontal diseases. *Lancet* 366, 1809-1820, doi:10.1016/S0140-6736(05)67728-8 (2005).

Pittenger MF, Mackey AM, Beck SC, Jaiswai RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147 (1999).

Ren G, Zhang L, Zhao X. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. 2 ( 2 ) :141-150, 2008.

Salasznyk, R. M., Williams, W. A., Boskey, A., Batorsky, A. & Plopper, G. E. Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *J Biomed Biotechnol* 2004, 24-34, doi:10.1155/S1110724304306017 (2004).

Selvig, K. A., Sorensen, R. G., Wozney, J. M. & Wikesjö, U. M. Bone repair following recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulated periodontal regeneration. *J Periodontol* 73, 1020-1029, doi:10.1902/jop.2002.73.9.1020 (2002).

Sharma RR, Pollock K, Hubel A, McKenna D. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical

applications and manufacturing practices. *Transfusion* (2014) 54(5):1418–37.10.1111

Sheng HA. Critical role of IFN-gamma in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Research*, 18(8), 846– 857. (2008)

Stoller, N. H., Johnson, L. R. & Garrett, S. Periodontal regeneration of a class II furcation defect utilizing a bioabsorbable barrier in a human. A case study with histology. *J Periodontol* 72, 238-242, doi:10.1902/jop.2001.72.2.238 (2001).

Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676, doi:10.1016/j.cell.2006.07.024 (2006).

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872, doi:10.1016/j.cell.2007.11.019 (2007).

Takayama, S., Yoshida, J., Hirano, H., Okada, H. & Murakami, S. Effects of basic fibroblast growth factor on human gingival epithelial cells. *J Periodontol* 73, 1467-1473, doi:10.1902/jop.2002.73.12.1467 (2002).

Takeda K, Shiba H, Mizuno N, Hasegawa N, Mouri Y, Hirachi A, Yoshino H, Kawaguchi H, Kurihara H. Brain-derived neurotrophic factor enhances periodontal tissue regeneration. *Tissue Eng* 11, 1618-1629, doi:10.1089/ten.2005.11.1618 (2005).

Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ & Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105, 93-98 (2002).

Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol* (2014) 15(11):1009–16.10.1038

Wikesjö UM, Xiropaidis AV, Thomson RC, Cook AD, Selvig KA, Hardwick WR. Periodontal repair in

dogs: rhBMP-2 significantly enhances bone formation under provisions for guided tissue regeneration. *J*

*Clin Periodontol* 30, 705-714 (2003).

Zhang, Y., Khan, D., Delling, J. & Tobiasch, E. Mechanisms underlying the osteo- and

adipo-differentiation of human mesenchymal stem cells. *ScientificWorldJournal* 2012, 793823,

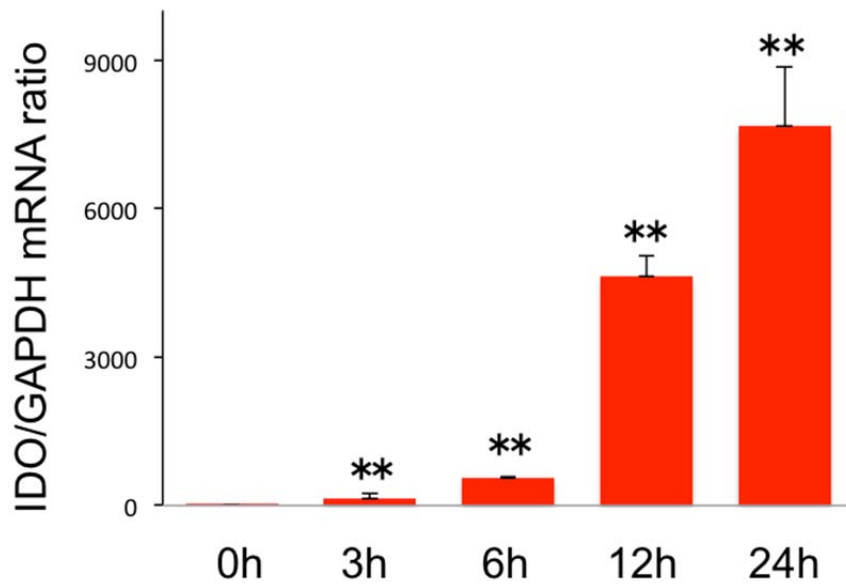
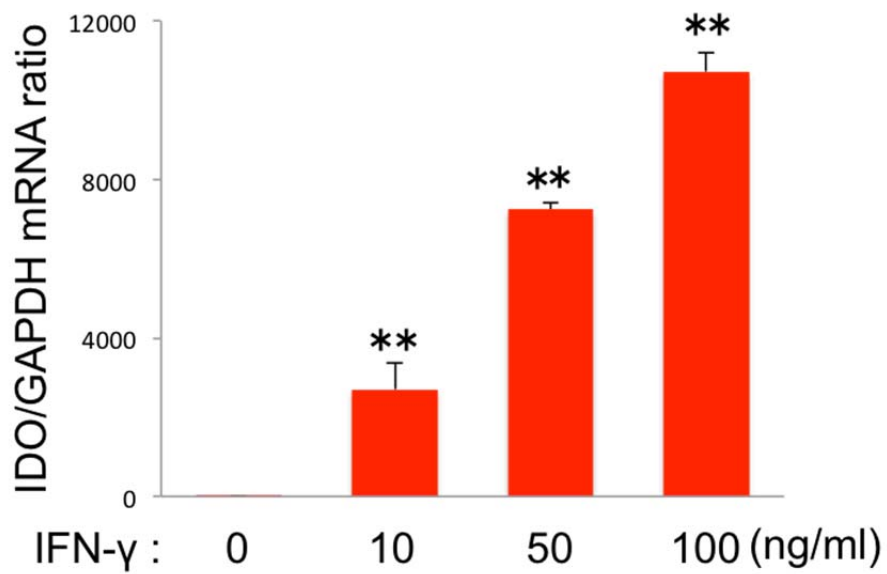
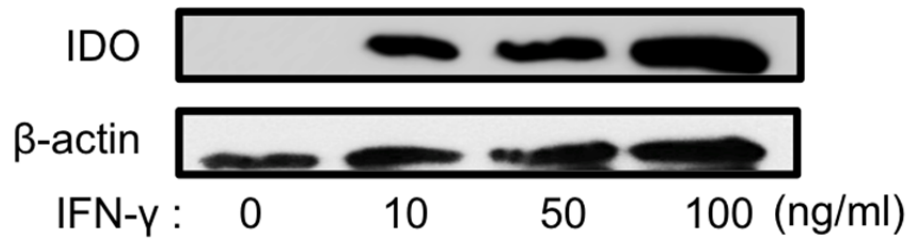
**A****B**

図 1. IFN- $\gamma$  刺激が C-MSC の IDO mRNA 発現に及ぼす影響

A) IFN- $\gamma$  (10 ng/ml) 刺激 0、3、6、12、24h 後の C-MSC の IDO mRNA 量を Real-time PCR 法によって測定した。GAPDH に対する発現の比で表した。

B) IFN- $\gamma$  (0、10、50、100 ng/ml) 刺激 24h 後の C-MSC の IDO mRNA 量を Real-time PCR 法によって測定した。GAPDH に対する発現の比で表した。\*\* :  $p < 0.01$ 。

**A**



**B**

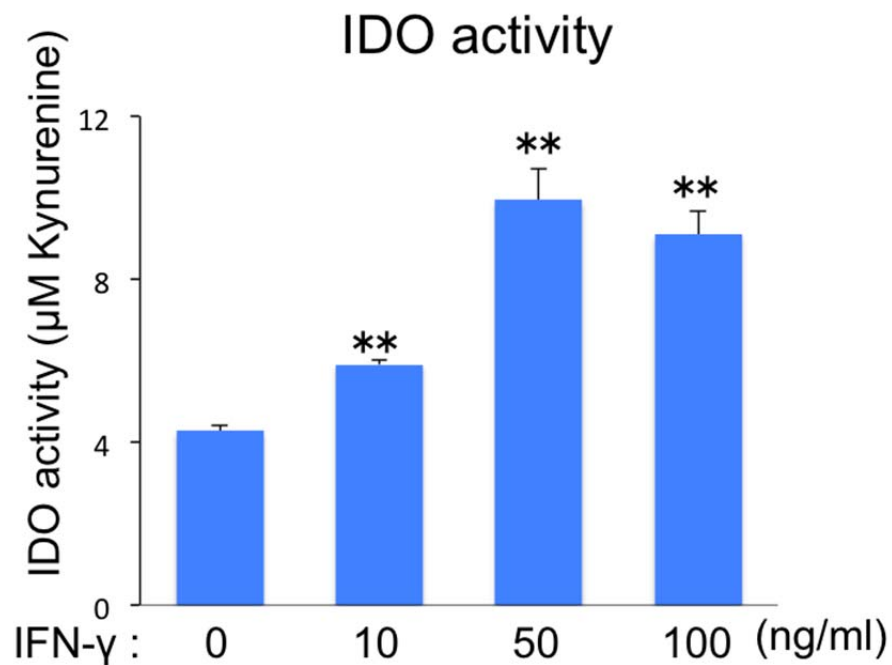


図2. IFN- $\gamma$  刺激が C-MSC の IDO 発現に及ぼす影響

IFN- $\gamma$  (0、10、50、100 ng/ml) 刺激 24 時間後に

A) C-MSC の細胞溶解液を回収し、Western Blotting 法によって IDO タンパク発現量を検討した。

B) 培養上清を回収し、キヌレニン量を測定することで IDO 活性を検討した。

\*\* :  $p < 0.01$  。

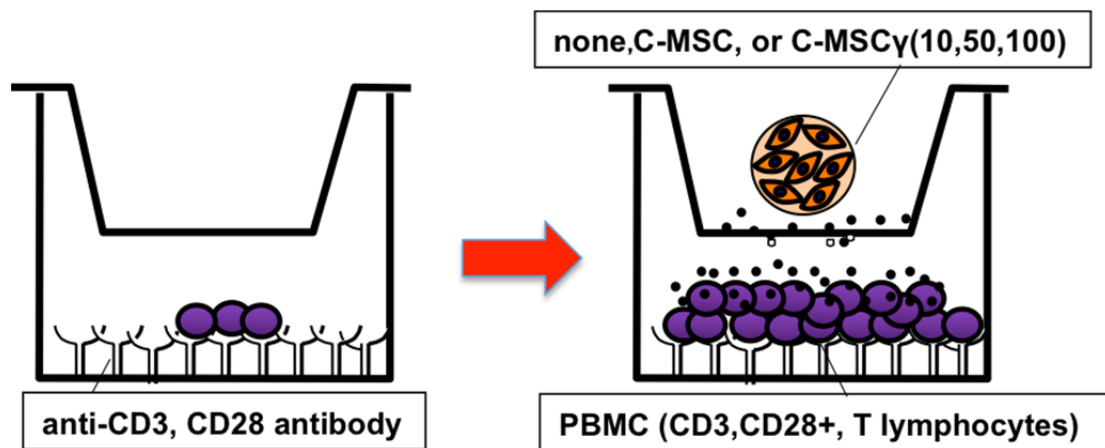


図 3. PBMC と C-MSC $\gamma$  の共培養

Transwell®を用いてC-MSC $\gamma$ とCD3/CD28増殖刺激されたPBMCを共培養した。抗CD3抗体でコートされた下皿にPBMCを、上皿にC-MSC $\gamma$ を培養し、メンブレンフィルター（pore size; 0.5  $\mu$ m）を介した共培養を72時間行った。

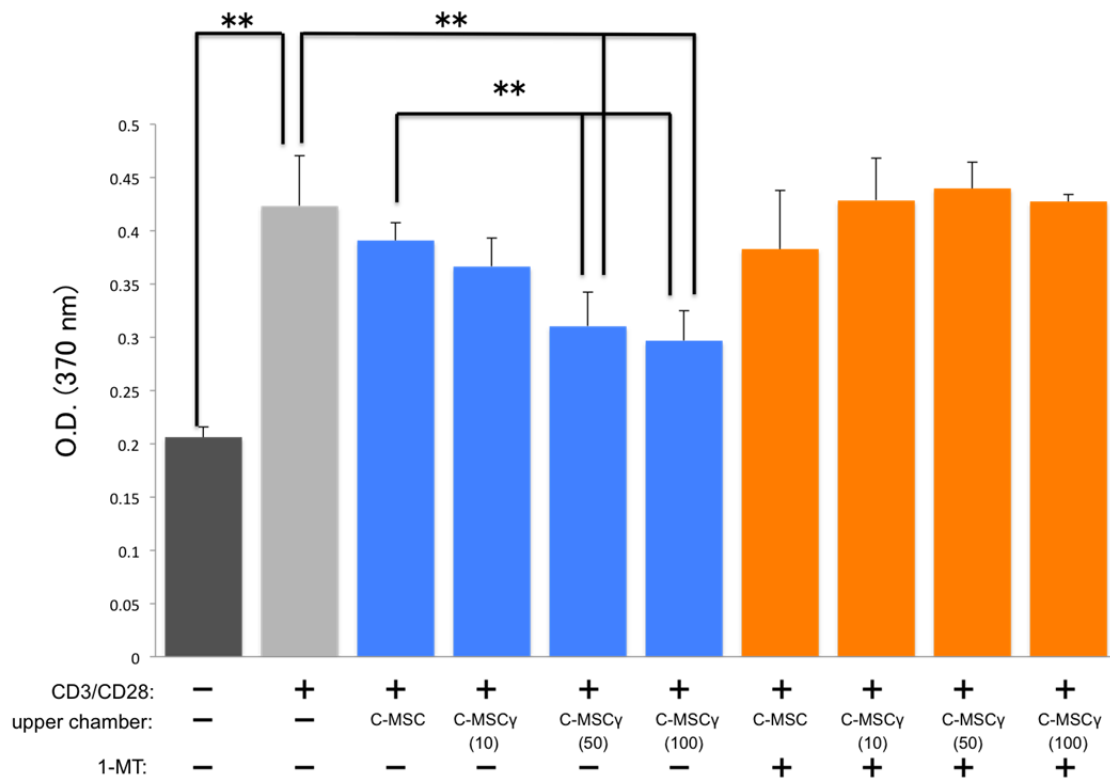


図 4. CD3/CD28 増殖刺激された PBMC への C-MSC $\gamma$  による細胞増殖に対する影響

C-MSC $\gamma$  と共培養後、下皿の CD3/CD28 増殖刺激をした PBMC に BrdU (10  $\mu$ M) を添加し更に 24 時間培養した。培養終了後、細胞の固定、DNA の変性を行い、抗 BrdU 抗体を加え、発色基質液を作用させ、370 nm の波長の吸光度を測定することで、DNA 合成量を定量化した。また IDO のインヒビターとして 1-MT (100  $\mu$ M) を加えた。\*\* :  $p < 0.01$  。



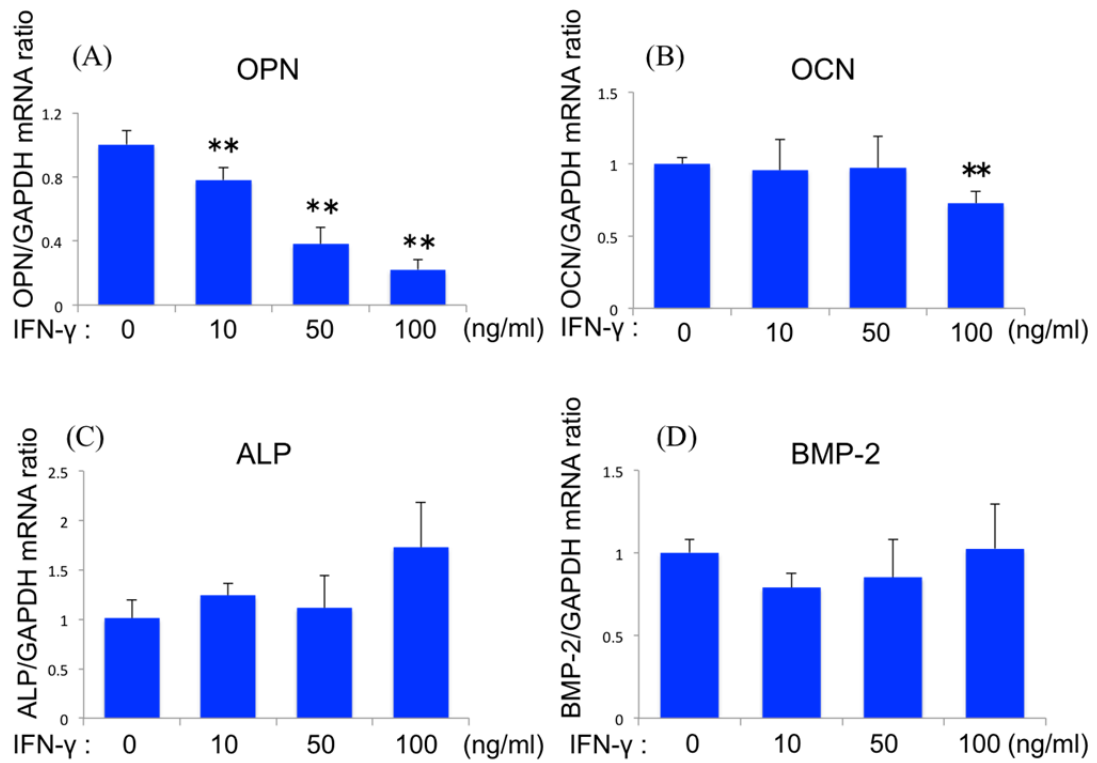


図 5. IFN- $\gamma$  刺激が C-MSC の骨関連タンパク mRNA 発現に及ぼす影響

IFN- $\gamma$  (0、10、50、100 ng/ml) 24 時間後に、総 RNA を回収し、OPN (A)、OCN (B)、ALP (C)、BMP-2 (D) の mRNA 発現量を real-time PCR 法によって測定した。GAPDH の発現に対する比で表した。\*\* :  $p < 0.01$

Gene	Sequence (5' -3')
GAPDH	F: GTCAAGGCTGAGAACGGGAA R: GCTTCACCACCTTCTTGATG
OPN	F: GATGGCCGAGGTGATAGTGT R: CCATTCAACTCCTCGCTTTC
OCN	F: GCAGCGAGGTAGTGAAGAGAC R: GGTCAGCCAACTCGTCACAG
ALPase	F: GTACTGGCGAGACCAAGCG R: GGCCCAGCGCAGGATGGAGG
BMP-2	F: CCGCTGTCTTCTAGCGTTGC R: CCTGAAGCTCTGCTGAGGTG
IDO	F: CAAAGGTCATGGAGATGTCC R: CCACCAATAGAGAGACCAGG

表 1 Real-time PCR に用いたプライマーの塩基配列

F:forward R:reverse

**A**



**B**



**図 6. マウス頭蓋骨小規模骨欠損の作製と移植体の移植**

A) マウス頭蓋骨に直径 1.6 mm のラウンドバーにて作製した 2 つの骨欠損

B) 一つの骨欠損に対して一つの移植体を填入した。

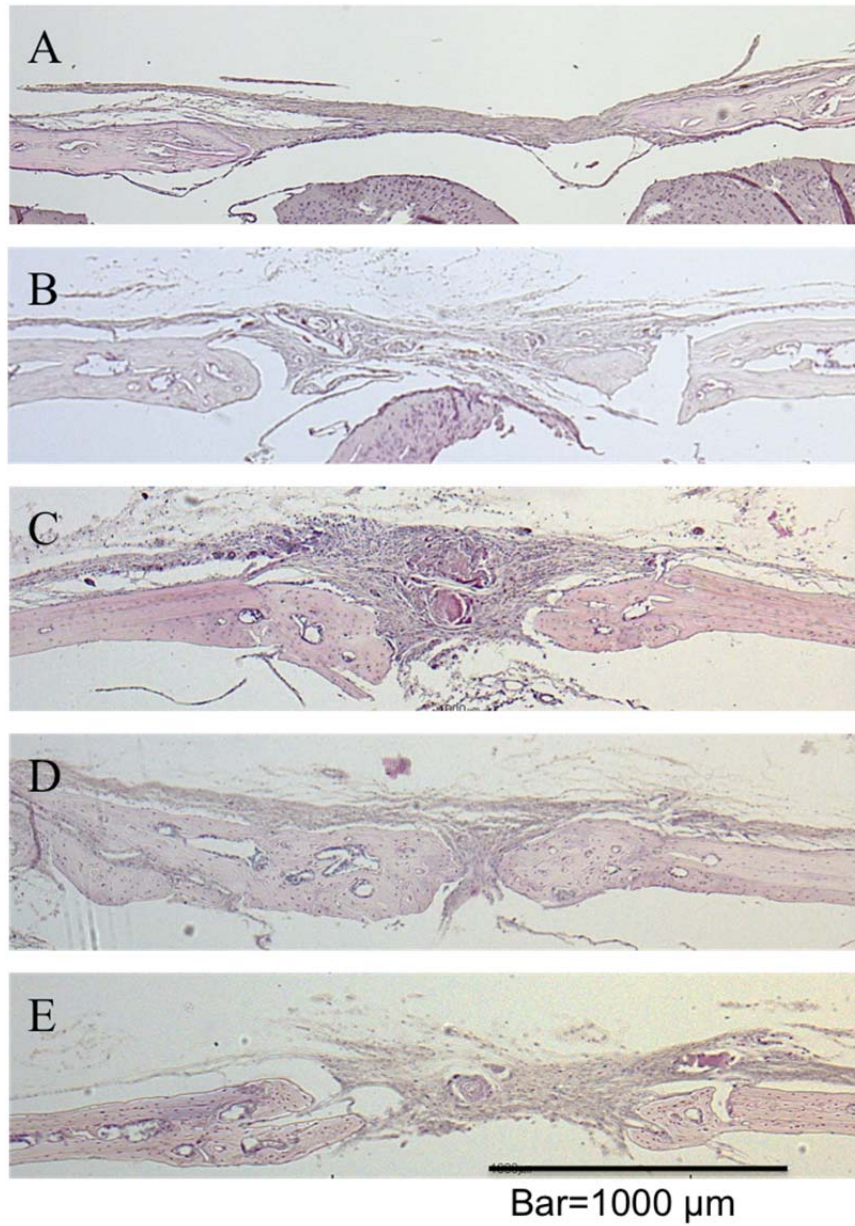


図 7. 移植後 4 週のマウス頭蓋骨小規模欠損部の HE 染色像(× 40)

- A) Mock 群
- B) C-MSC 移植群
- C) C-MSC $\gamma$  (10) 移植群
- D) C-MSC $\gamma$  (50) 移植群
- E) C-MSC $\gamma$  (100) 移植群



図 8. マウス頭蓋骨大規模骨欠損の作製と移植体の移植

A) マウス頭蓋骨に直径 4.0 mm のトレフィンバーにて作製した骨欠損

B) 骨欠損に対して 16 個の移植体を填入した。

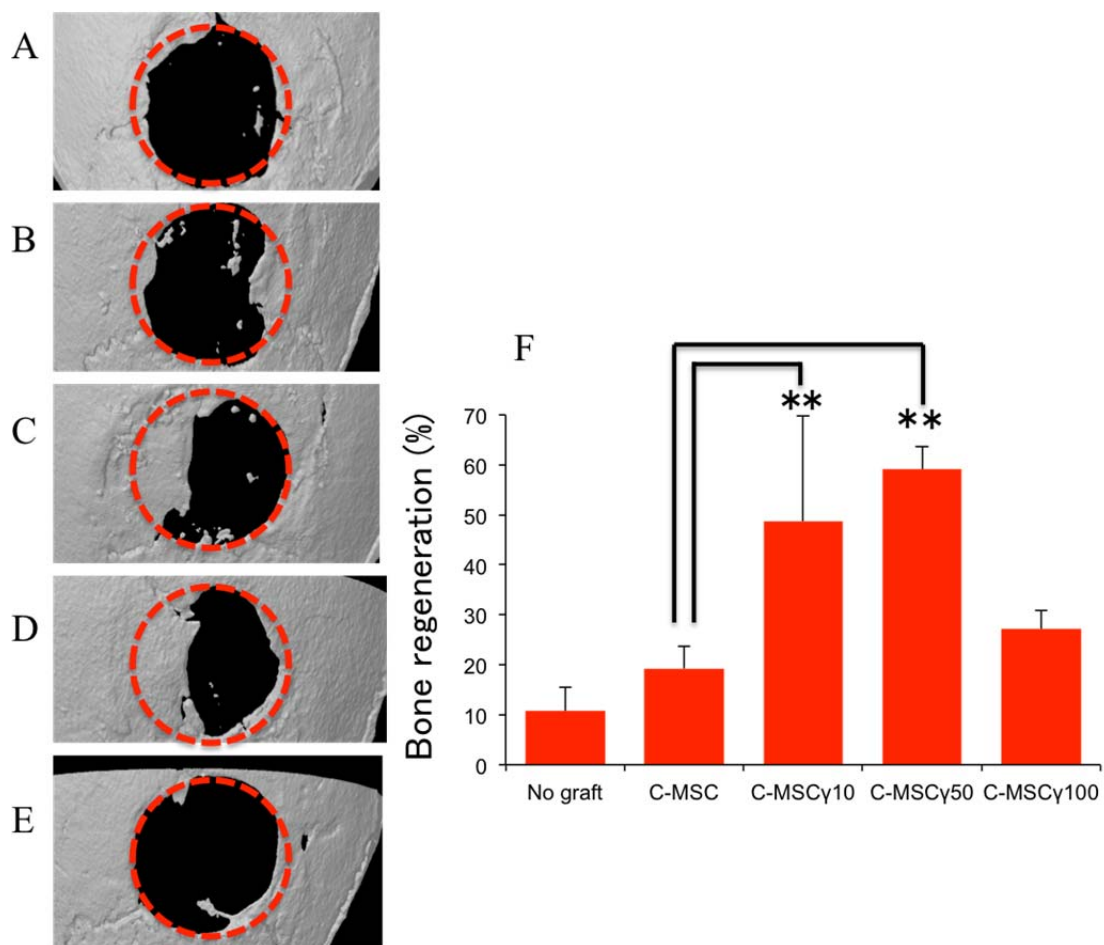


図9. 移植後12週のマウス頭蓋骨再生量のマイクロCT解析

マイクロCTのデータを構築した三次元画像。

- A) Mock 群
- B) C-MSC 移植群
- C) C-MSC $\gamma$  (10) 移植群
- D) C-MSC $\gamma$  (50) 移植群
- E) C-MSC $\gamma$  (100) 移植群
- F) 移植後4週の再生した骨面積。棒グラフは平均値と標準偏差を表す。いずれも N=4。 \*\* :  $p < 0.01$ 。

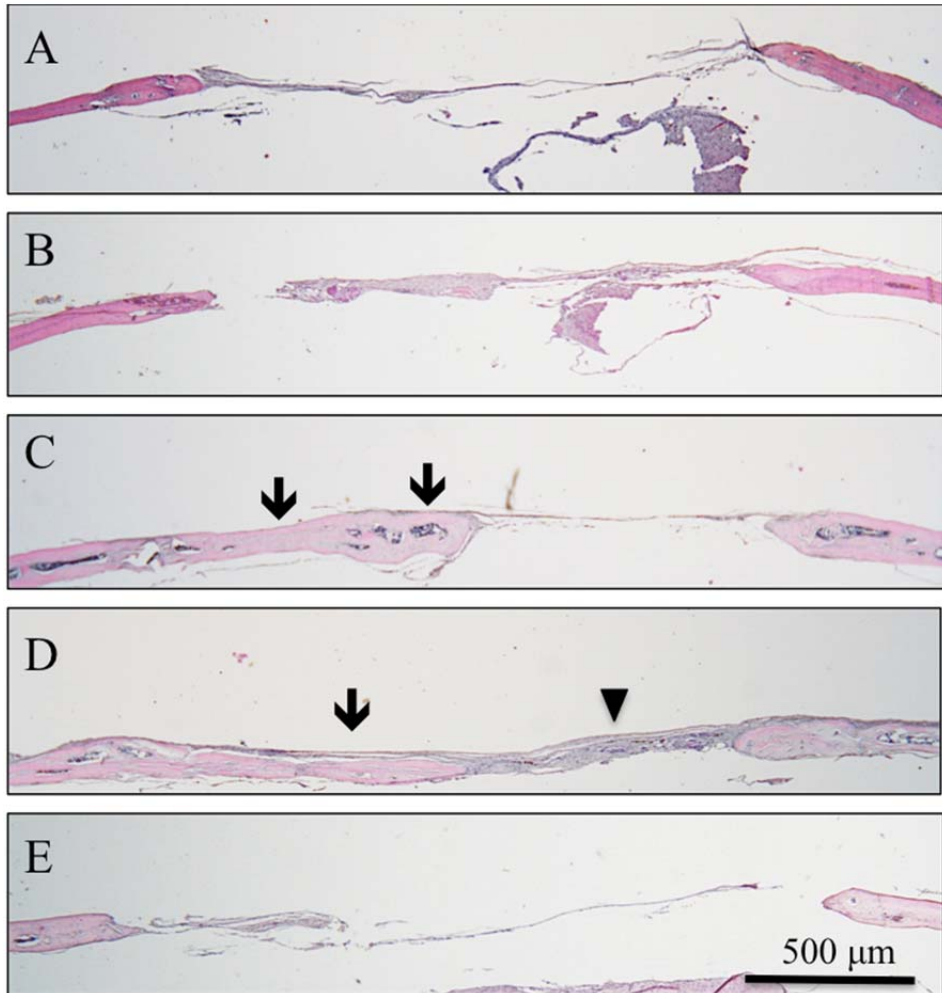


図 10. 移植後 12 週のマウス頭蓋骨大規模骨欠損部の

HE 染色像(× 20)

- A) Mock 群
- B) C-MSC 移植群
- C) C-MSC $\gamma$  (10) 移植群
- D) C-MSC $\gamma$  (50) 移植群
- E) C-MSC $\gamma$  (100) 移植群

矢印は再生骨、三角は結合組織示す。

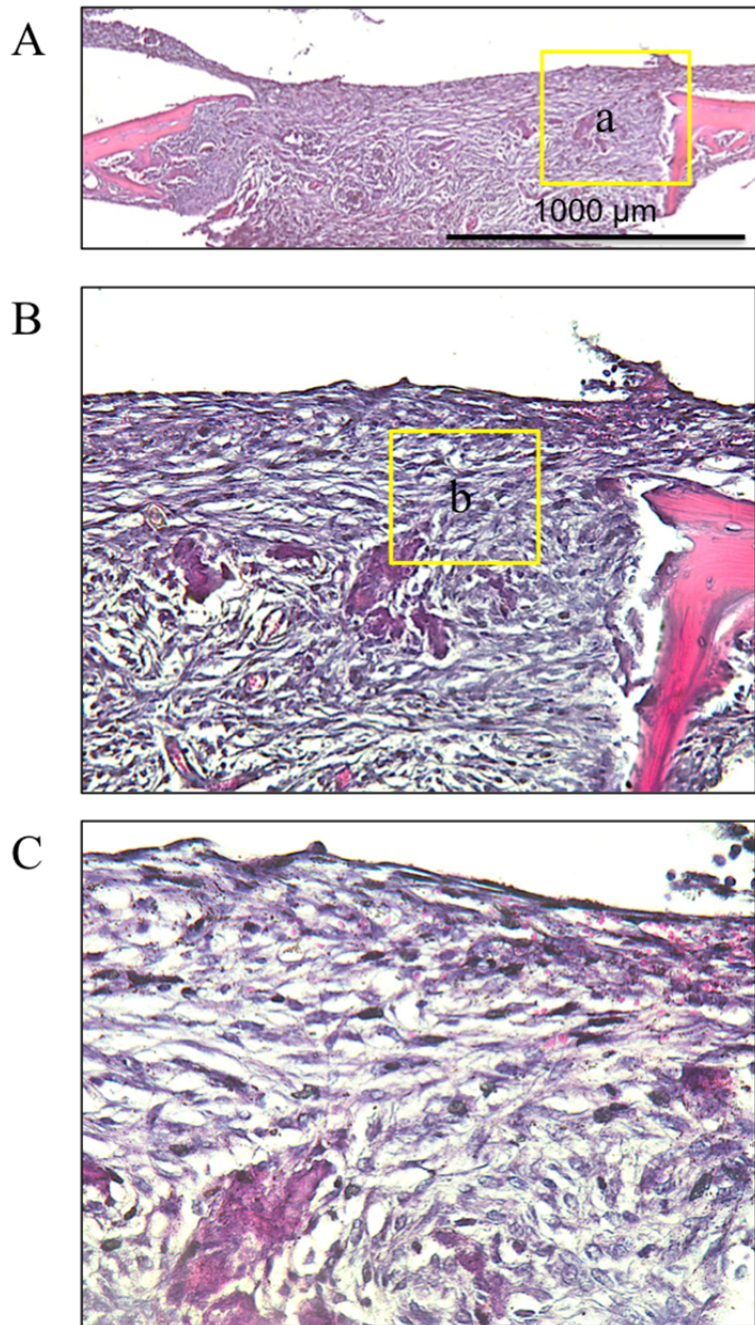


図 11. 移植後 1 週のマウス頭蓋骨欠損部の  
HE 染色像:Mock 群

A) HE 染色の弱拡大像 (×40)

B) a の拡大像 (×200)

C) b の拡大像 (×400)



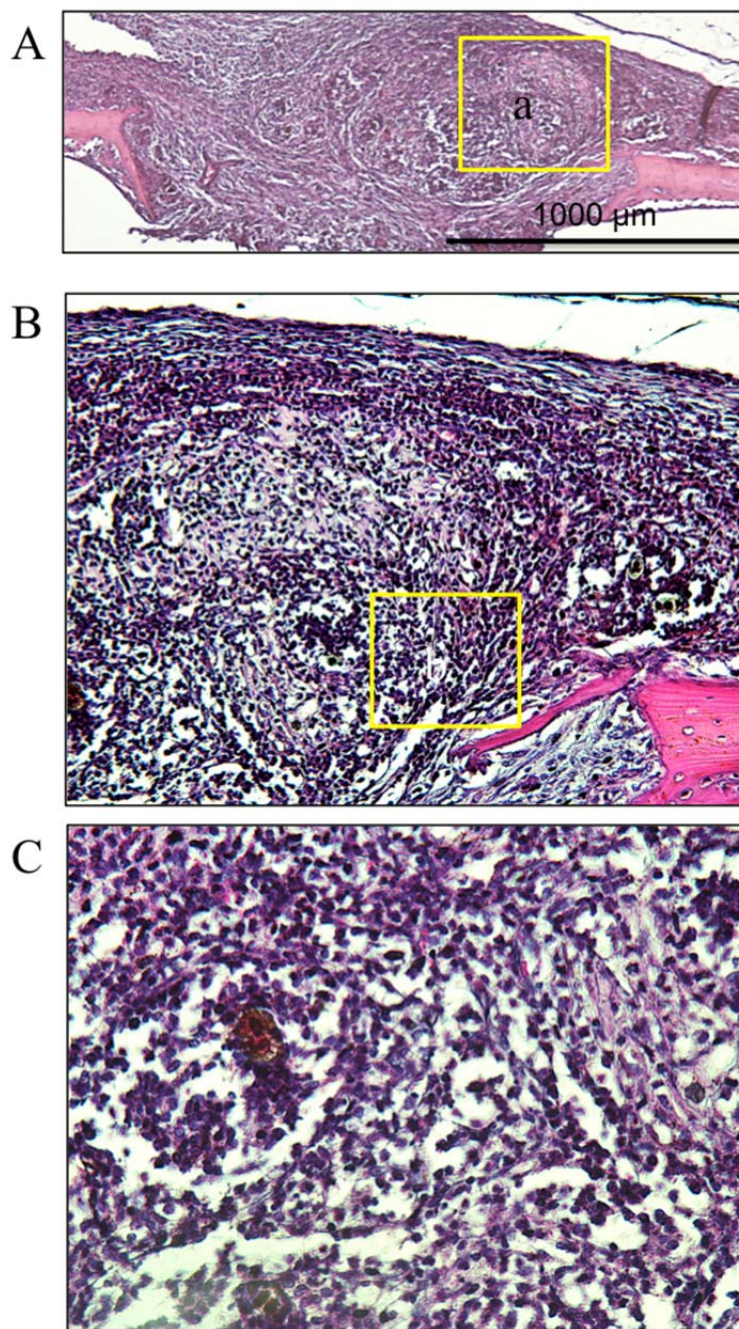


図 12. 移植後 1 週のマウス頭蓋骨欠損部の  
HE 染色像: C-MSc 移植群

A) HE 染色の弱拡大像 (×40)

B) a の拡大像 (×200)

C) b の拡大像 (×400)

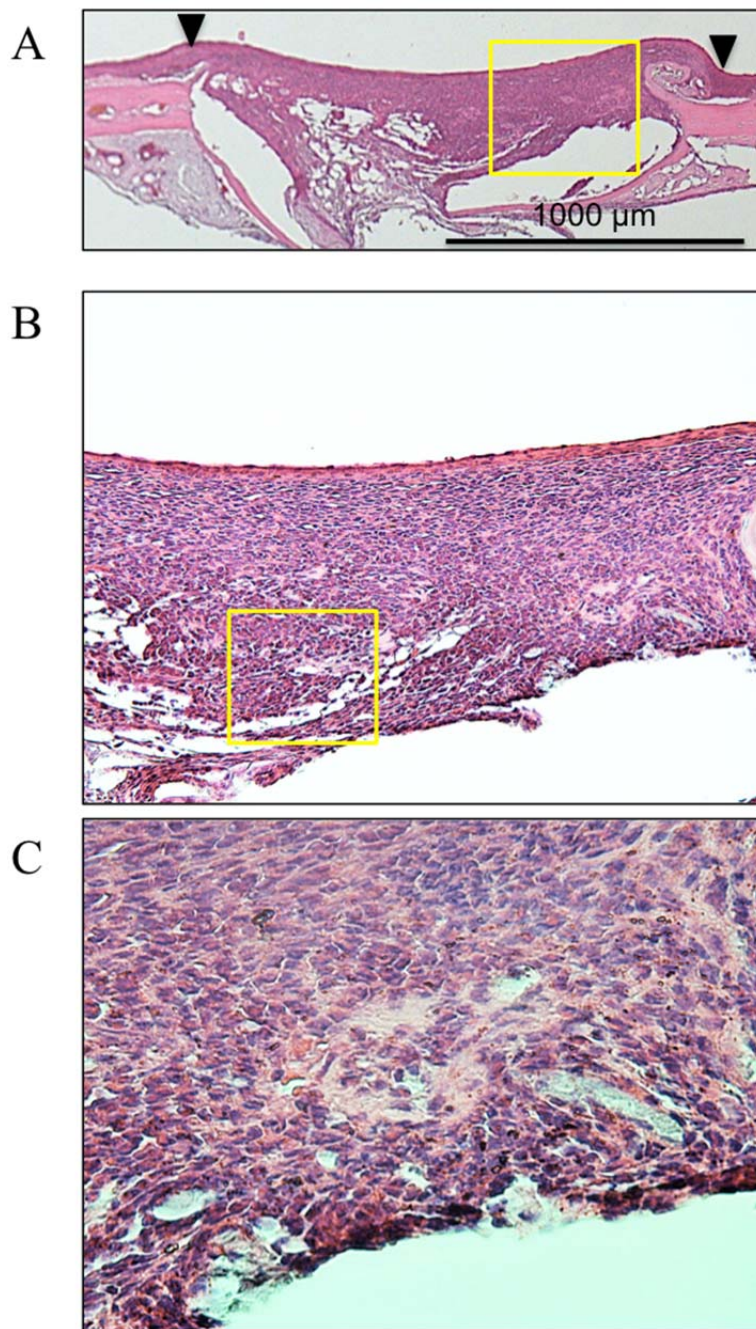


図 13. 移植後 1 週のマウス頭蓋骨欠損部の

HE 染色像: C-MSCy (10) 移植群

A) HE 染色の弱拡大像 (×40)

B) a の拡大像 (×200)

C) b の拡大像 (×400)

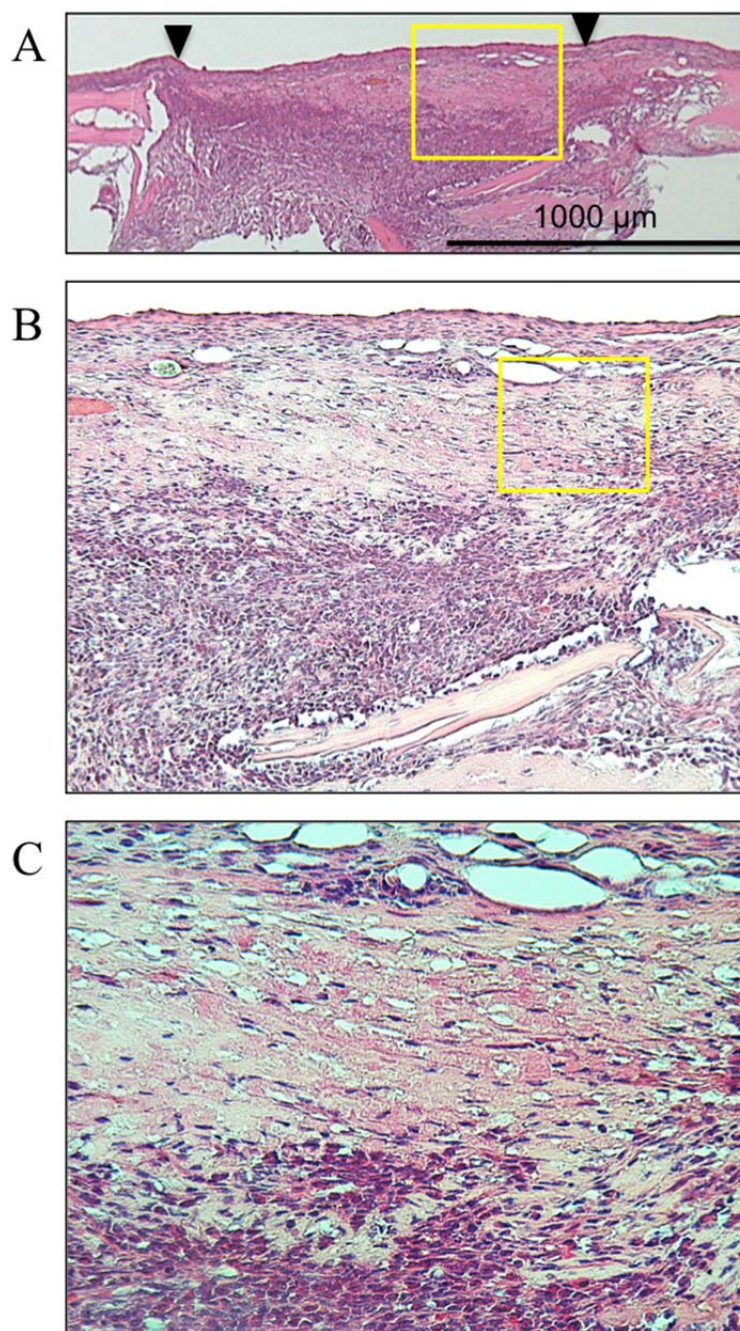


図 14. 移植後 1 週のマウス頭蓋骨欠損部の

HE 染色像: C-MSCy (50) 移植群

A) HE 染色の弱拡大像 (×40)

B) a の拡大像 (×200)

C) b の拡大像 (×400)

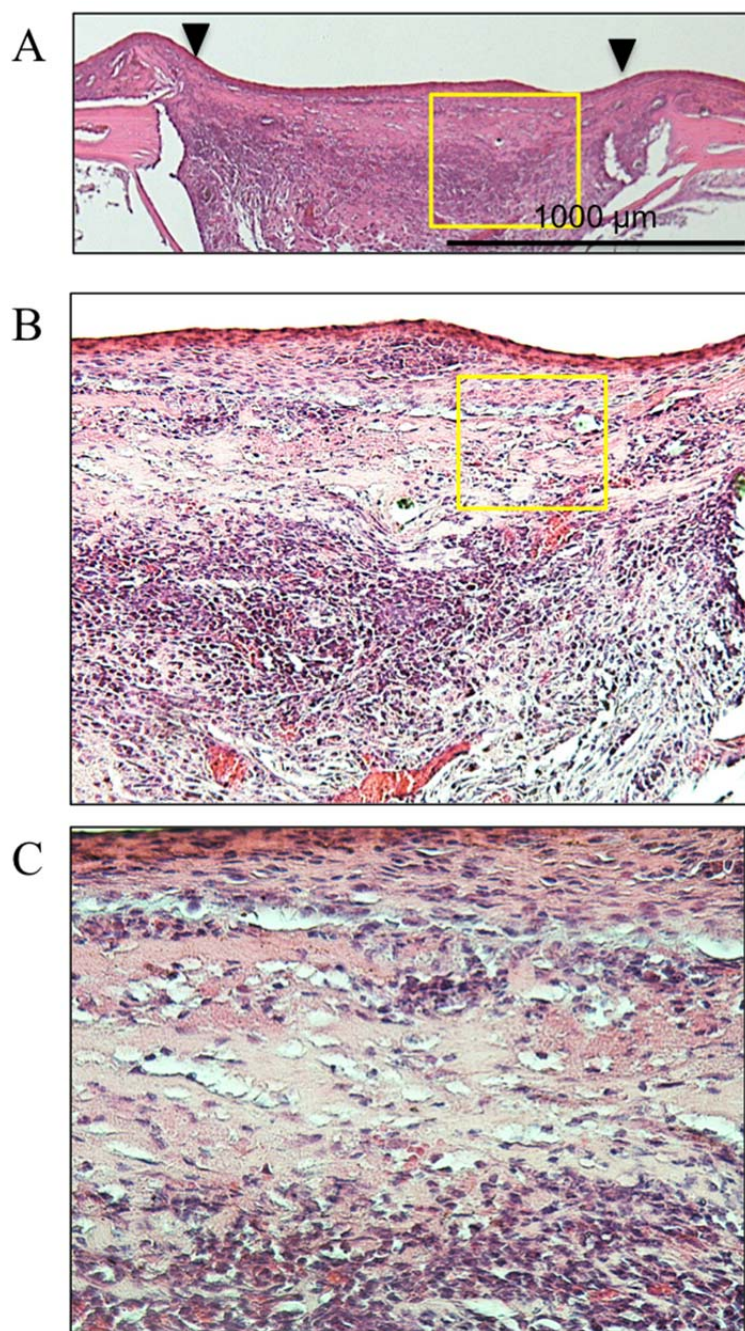


図 15. 移植後 1 週のマウス頭蓋骨欠損部の

HE 染色像: C-MSCy (100) 移植群

A) HE 染色の弱拡大像 (×40)

B) a の拡大像 (×200)

C) b の拡大像 (×400)

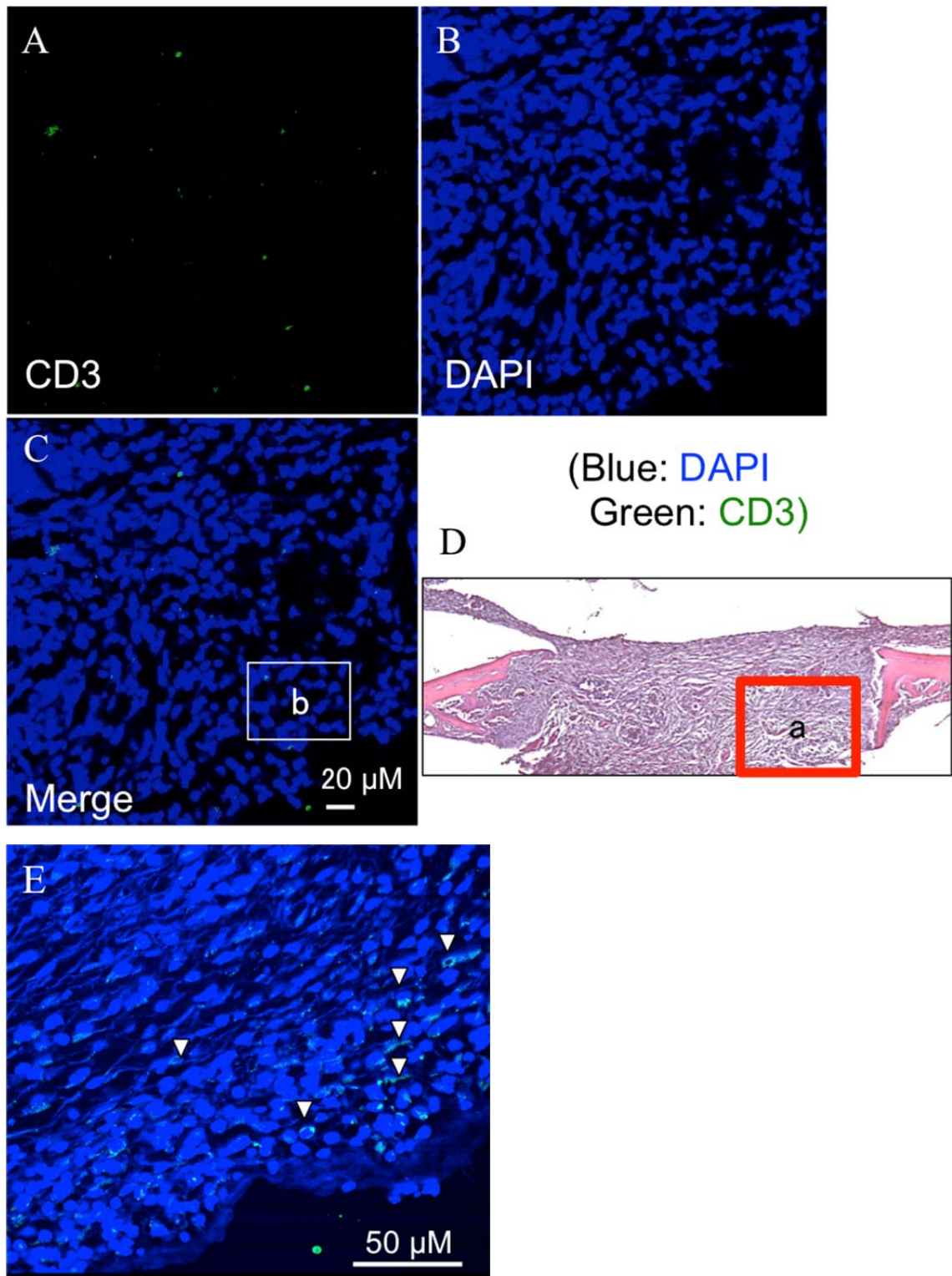


図 16. 移植後 1 週のマウス頭蓋骨欠損部の免疫染色像:  
**Mock 群 a** の免疫染色像; A) Green: CD3 B) Blue: 核 C) Merge  
 D) HE 染色像 E) b の強拡大像。三角は CD3 陽性細胞を示す。

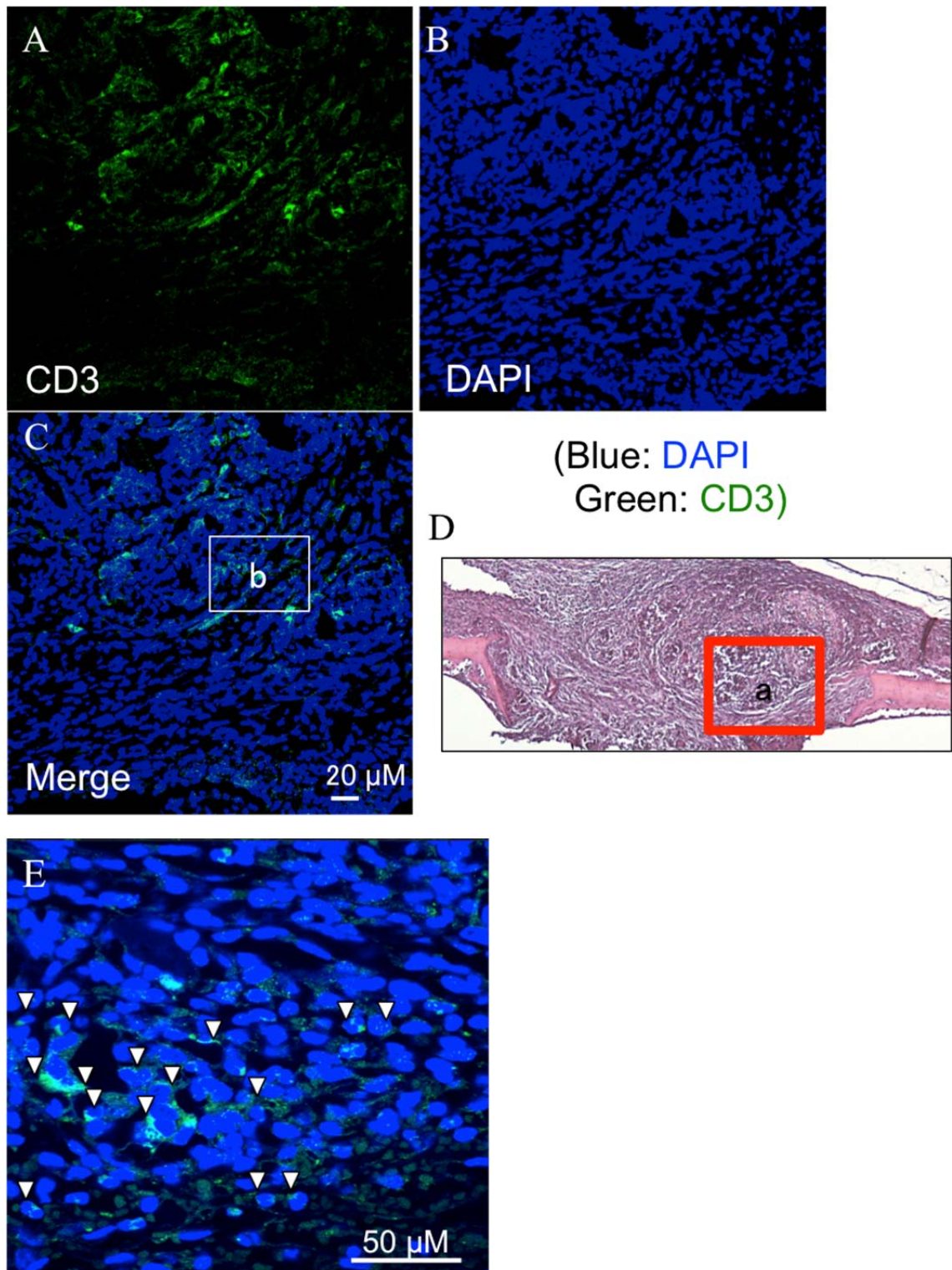


図 17. 移植後 1 週のマウス頭蓋骨欠損部の免疫染色像:  
 C-MSC 移植群 a の免疫染色像; A) Green: CD3 B) Blue: 核 C) Merge  
 D) HE 染色像 E) b の強拡大像。三角は CD3 陽性細胞を示す。

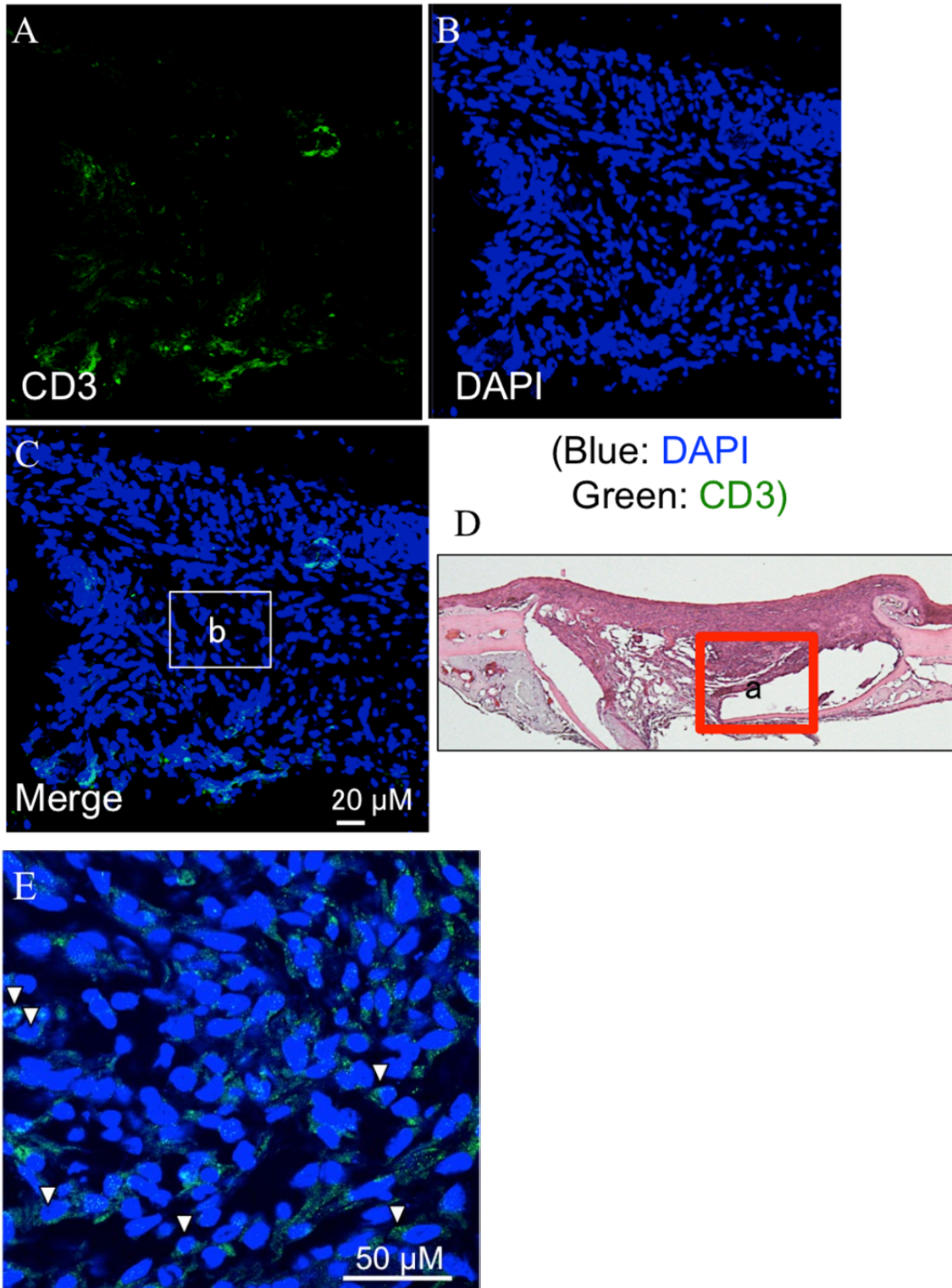


図 18. 移植後 1 週のマウス頭蓋骨欠損部の免疫染色像:

C-MSCy (10) 移植群 a の免疫染色像; A) Green: CD3 B) Blue: 核 C) Merge  
 D) HE 染色像 E) b の強拡大像。三角は CD3 陽性細胞を示す。

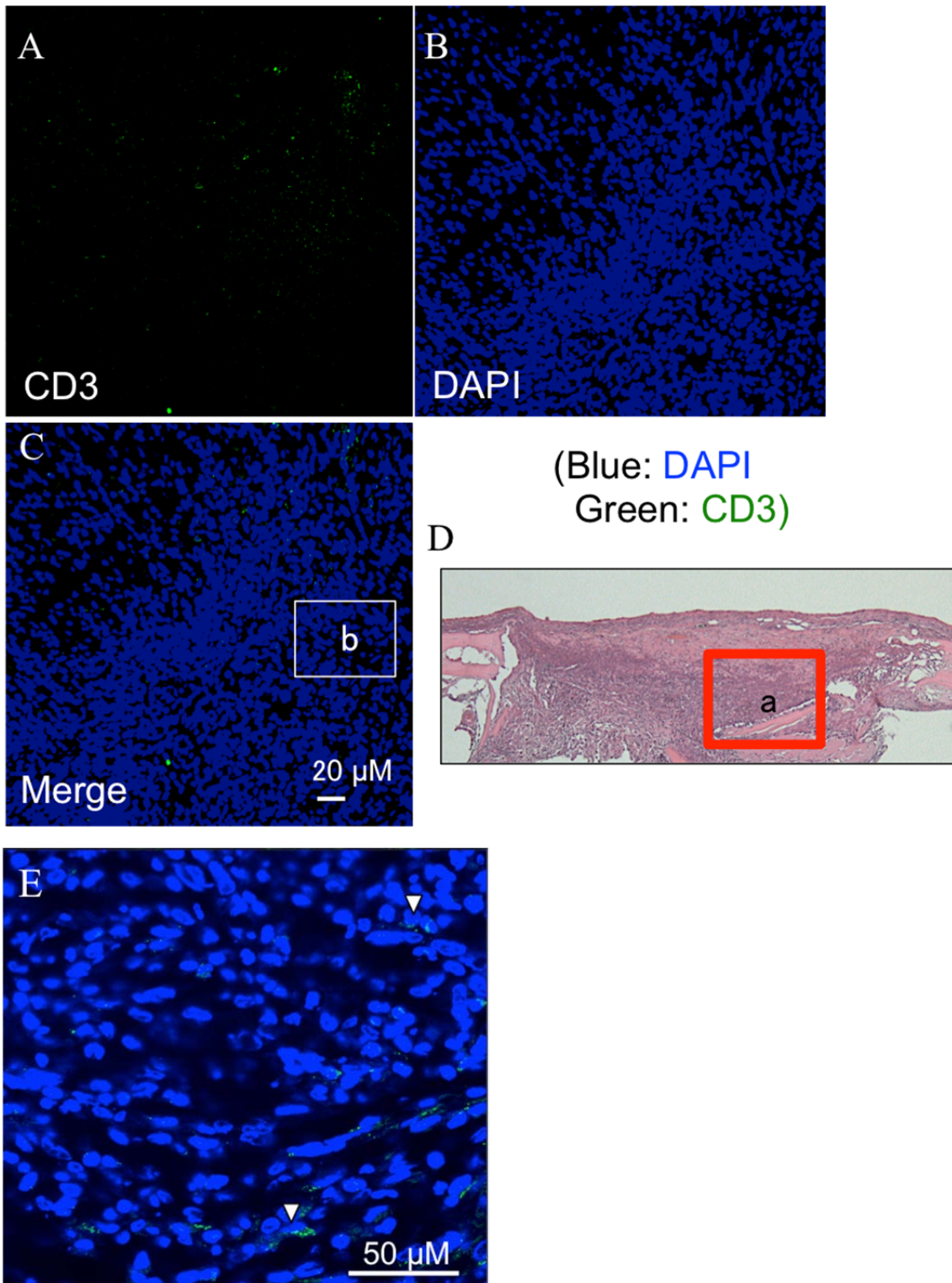


図 19. 移植後 1 週のマウス頭蓋骨欠損部の免疫染色像:

C-MSCy (50) 移植群 a の免疫染色像; A) Green: CD3 B) Blue: 核 C) Merge  
 D) HE 染色像 E) b の強拡大像。三角は CD3 陽性細胞を示す。



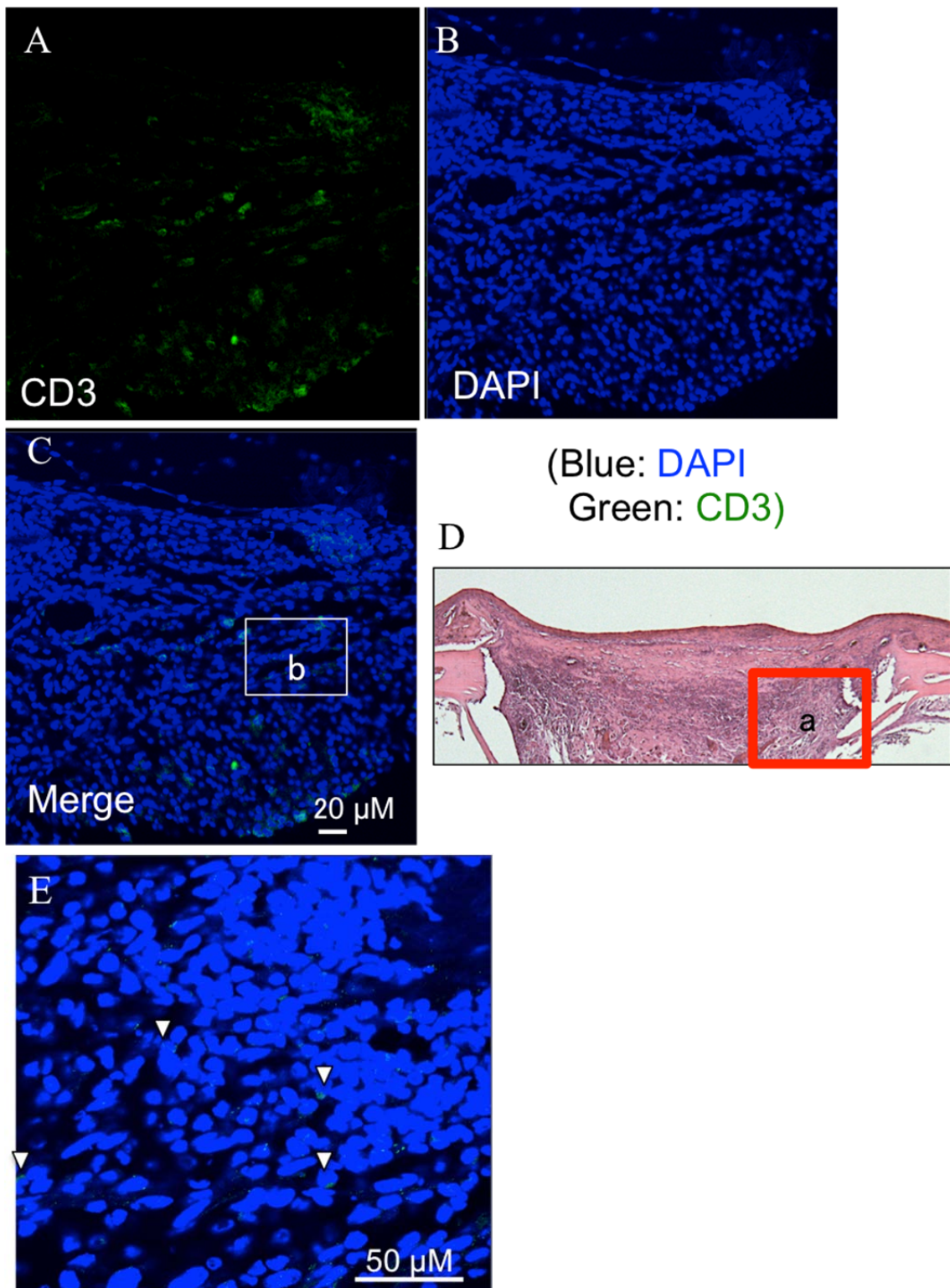


図 20. 移植後 1 週のマウス頭蓋骨欠損部の免疫染色像:

C-MSCy (100) 移植群 a の免疫染色像; A) Green: CD3 B) Blue: 核 C) Merge  
 D) HE 染色像 E) b の強拡大像。三角は CD3 陽性細胞を示す。