

# 論 文 内 容 要 旨

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

主指導教員：栗原 英見教授

(応用生命科学部門歯周病態学)

副指導教員：柴 秀樹教授

(統合健康科学部門歯髓生物学)

副指導教員：加藤 功一教授

(基礎生命科学部門生体材料学)

竹下 慶

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

## 論文内容要旨

論文題目 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

### 【背景および目的】

間葉系幹細胞 (MSCs) は骨、軟骨、靭帯、筋肉などのさまざまな組織への多分化能を有し、患者から安全に分離することが可能であり、遺伝子導入を必要としないため、再生医療に有効な細胞ソースであると期待されている。現在までに私たちの研究室では MSCs と細胞自身の産生する細胞外基質 (ECM) を利用して得られる細胞集塊 Clumps of MSCs/ECM complex (C-MSC) を作製した。これは立体的に培養可能な細胞集塊であり、人工の足場材料を用いずに欠損組織に直接移植可能なものである。さらに *ex vivo* にて分化程度を制御することで、組織再生を効果的に促進できることを明らかにしている。(2015. Kittaka et.al)。高齢者や骨髄関連疾患を有する患者に代表されるような細胞療法のための MSCs を十分に採取できないこのようなケースに対して、MSCs を細胞製剤として供給するための細胞バンクの設立が注目を集めている。しかしながら、細胞バンクから提供される MSCs は他家のものであるため、この移植形式は *allo-graft* となり移植拒絶等のリスクが残る。一方、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多くなされている。特に、移植拒絶等の問題を克服するために、IFN- $\gamma$  前処理によって MSCs の免疫調節能を向上させ、他家移植に利用する試みは注目される。そこで、本研究の目的は、*ex vivo* において C-MSC を IFN- $\gamma$  にて前処理をすることで、免疫調節性 C-MSC に誘導し、これを利用した他家 C-MSC 細胞治療法を開発することである。

### 【材料および方法】

ヒト MSCs (理科学研究所から提供) を、24well プレートに  $20 \times 10^4$ /well の密度で播種し、50  $\mu$ g/ml のアスコルビン酸含有の増殖培地 (Hi-glucose DMEM+10% FBS) で 4 日間培養することで、ECM 産生を誘導した。培養した細胞を鈍的にウェルから剥離し、ECM と MSCs から構成されるシート状の複合体とした。この浮遊した MSCs/ECM 複合体を ultra-low binding プレートに移し、さらに球状になるまで増殖培地で培養することによって、細胞集塊 C-MSC を得た。はじめに IFN- $\gamma$  (0,10,50,100 ng/ml) で刺激した C-MSC の免疫調節因子 indoleamine2,3-dioxygenase (IDO) mRNA 発現量を Real-time PCR 法で、IDO Protein 発現量を Western blotting 法で測定した。IDO 活性分析は、培養上清中の

IDO 代謝産物であるキヌレニン量で定量した。また骨関連タンパク (OPN,ALP,OCN,BMP-2) mRNA 発現量を Real-time PCR 法で分析した。以下の実験について、IFN- $\gamma$  (10,50,100 ng/ml) で刺激した C-MSC をそれぞれ C-MSC $\gamma$ (10,50,100)とする。C-MSC $\gamma$  の免疫調節能は、ヒトから採取した末梢血単核細胞と C-MSC $\gamma$  をトランズウェルを用いて共培養し、T 細胞増殖アッセイで分析した。同時に、IDO 阻害剤として 1-MT を用いた。*in vivo* において C-MSC $\gamma$  の異種移植骨再生効果を検討するために、マウス頭蓋骨に作製した直径 1.6mm 径の小規模骨欠損もしくは直径 4mm 径の大規模骨欠損に対し、ヒト MSCs から作製した C-MSC $\gamma$  を移植した。C-MSC を移植したものを対照群とした。移植後 4 もしくは 12 週で組織切片を作製し hematoxylin-eosin(HE)染色後に鏡検した。さらにマイクロ CT 解析によって骨欠損内部の新生骨の体積を算出した。

#### 【結果および考察】

IFN- $\gamma$ 10 ng/ml 刺激(0,3,6,12,24 h)は、時間依存的に IDO mRNA 発現量を上昇させ、IFN- $\gamma$  24 時間刺激(0,10,50,100 ng/ml)は、IDO mRNA 発現量を濃度依存的に上昇させた。また IFN- $\gamma$ (10,50,100 ng/ml)刺激は、IFN- $\gamma$  無刺激と比較し C-MSC における IDO protein 発現量、IDO 活性を上昇させた。一方、骨関連タンパク mRNA 発現については IFN- $\gamma$  24 時間刺激(0,10,50,100 ng/ml)によって、OPN mRNA 発現が濃度依存的に減少した。OC mRNA 発現は IFN $\gamma$ 100 ng/ml 刺激時のみ発現量が減少していた。ALP および BMP-2 mRNA 発現は影響を受けなかった。このことから IFN- $\gamma$  高濃度刺激(100 ng/ml)時が C-MSC の石灰化能を低下させる可能性が示唆された。免疫調節能の検討については、C-MSC $\gamma$ (50,100)が C-MSC と比較し、有意に T 細胞の増殖を抑制し、その T 細胞増殖抑制効果は IDO 阻害剤である 1-MT によって阻害された。これらの結果から、C-MSC $\gamma$  が IDO の発現を介して免疫調節能を発揮することが示唆された。異種移植骨再生効果についての検討では、マウス頭蓋骨小規模骨欠損に C-MSC $\gamma$ (10,50)移植 4 週後に、対照群(C-MSC 移植)と比較して、豊富な結合組織と骨再生が観察された。同様に、マウス頭蓋骨大規模骨欠損に対して、C-MSC $\gamma$ (10,50)群で広い範囲での新生骨が観察され、マイクロ CT 解析ではコントロールの約 2 倍の有意な骨再生量を示した。一方、C-MSC $\gamma$ (100)の移植群は、小規模・大規模骨欠損の両者において骨再生を誘導することは無かった。ヒト C-MSC $\gamma$ (10,50)の異種移植がマウス頭蓋骨欠損の再生を促進したことは、*ex-vivo* における IFN- $\gamma$  刺激によって上昇した IDO 発現による異種移植免疫拒絶反応を抑制し、骨分化能を発揮した結果と考えられる。以上のことから、C-MSC $\gamma$  は免疫調節能を有し C-MSC $\gamma$  は他家移植による再生医療に有用な細胞/細胞外基質複合体であると考えられる。