

<研究課題> 間葉系幹細胞集塊 Clumps of MSCs/ECM complex を用いた他家細胞移植骨組織再生療法の開発

代表研究者 広島大学大学院 歯周病態学研究室 助教 加治屋幹人  
共同研究者 広島大学大学院 歯周病態学研究室 大学院 竹下慶

[まとめ]

高齢者の骨粗鬆症や転倒を原因とした骨折のような骨破壊疾患に対して、細胞バンクから提供される間葉系幹細胞を用いた他家細胞移植再生療法の開発が望まれている。本研究では、ヒト立体培養間葉系幹細胞集塊の免疫調節能を IFN $\gamma$  前処理によって向上させ、これをマウス頭蓋冠欠損に移植すると、免疫拒絶無く骨再生を示すことを見出した。この事実は、他家細胞移植骨再生療法へ応用可能であることを示唆した。

1.研究の目的

高齢化が進行中の日本において、骨粗鬆症や転倒を原因とした骨折のような骨破壊疾患が急増している。従来の整復固定による治療法では患者の治癒力が不足することから、近年、間葉系幹細胞 (MSC) を用いた再生療法の開発が期待されている。しかし、この細胞治療法は、高齢者から得られる MSC が少ないことや、移植のために用いる人工足場材料が高齢者に対して良好な生体適合性を発揮できるか不

明であるといった問題がある。この問題点を克服するために、1) 人工の足場材料を必要としない MSC 移植治療法を確立すること、2) 患者本人からではなく、細胞バンク等を集められた他家 MSC を利用すること、の2点が必須であると考えられる。申請者の研究室では、これまでに、MSC 自身が産生する細胞外基質 (ECM) を利用して人工細胞集塊 Clumps of MSC/ECM complex (C-MSC) を作成した。これは細胞集塊の状態でも培養可能であり、人工の足場材料を必要とせず欠損組織に直接移植可能なものである (Kittaka M, Kajiya M, et al., *Cytherapy*, 2015)。一方、他家細胞移植治療法の最大の障壁は、移植される他者の細胞に対する免疫応答反応である。興味深いことに、近年、IFN $\gamma$  刺激された MSCs が高い免疫制御能を発揮するという報告がある。そこで、本研究課題では、この C-MSC の免疫調節能を Ex vivo にて IFN $\gamma$  することで向上させ、人工足場材料を必要とせず、移植拒絶を起こさない新規他家移植骨再生療法の開発を目指し、その基礎研究を行った。

## 2. 研究方法と経過

### 2-1 細胞

ヒト骨髄間葉系幹細胞(MSCs)は理化学研究所から提供されたものを用いた。

### 2-2 C-MSCs の作成

MSCs を、24well プレートに播種し、50  $\mu$ g/ml のアスコルビン酸含有の増殖培地にて7日間培養する。これをマイクロピペットチップにてこそぎ、細胞シートの状態で剥離させ、この浮遊した MSCs/ECM 複合体をさらに増殖培地にて培養することによって、細胞集塊 C-MSC を得た。

### 2-3 IFN $\gamma$ 刺激による C-MSC の IDO 発現への影響

作成された C-MSC に IFN $\gamma$ (0, 10, 50, 100ng/ml)を各種時間作用し、免疫調節性酵素 indoleamin 2,3-dioxygenase (IDO)mRNA 発現をリアルタイム PCR 法にて、タンパク発現を Western Blotting 法にて解析した。またその IDO 活性は培養上清中に含まれる、IDO の代謝産物キヌレニン量を測定することで評価した。

### 2-3 C-MSCs の免疫調節能の評価

C-MSC の免疫調節能を評価するために T 細胞共培養試験を行った。すなわち、ポアサイズ 0.5 $\mu$  のトランズウェルの上皿に、C-MSC および IFN $\gamma$ (10,50, 100 ng/ml:24 時間) 刺激された C-MSC (C-MSC $\gamma$ (10, 50, 100)) を設置し、下

皿に抗 CD3 抗体・CD28 抗体をコーティングし、これにヒト抹消血から分離した単核球細(PBMC)胞を播種して共培養を行った。また、IDO 阻害剤として 1-MT (100 $\mu$ M)を添加した。72 時間後に PBMC を回収し、抗 CD3 抗体・CD28 抗体による T 細胞刺激によって増加した細胞増殖能を BrdU incorporation assay にて解析した。

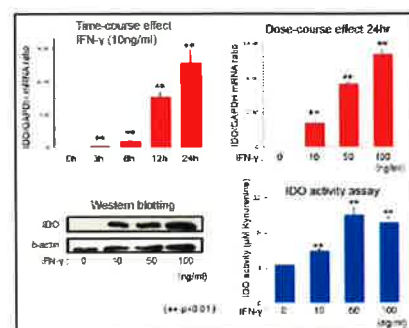
### 2-4. C-MSC および C-MSC $\gamma$ 異種移植による骨再生効果の検討

6 週齢のオス C57BL6/c マウス頭蓋冠に直径 1.6mm の骨欠損を作成。ここに、ヒト C-MSC、もしくはヒト C-MSC $\gamma$ (10,50,100)を移植し、1 週間および 4 週間の経過観察後に屠殺。組織標本を通法に従い作成し、HE 染色にてリンパ球浸潤および骨再生量を評価した。

## 3. 研究の成果

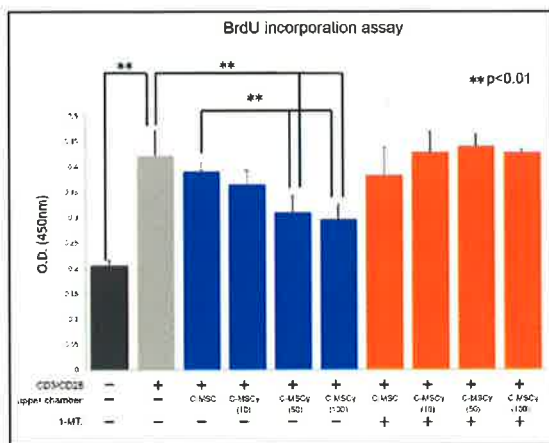
### 3-1 実験結果

IFN $\gamma$  刺激は C-MSC の IDOmRNA 発現を濃度・時間依存的に上昇させた。タンパクレベルにおいても同様に、IFN $\gamma$  刺激が IDO 発現を劇的に増加させた。また培養上清中の IDO 代謝産物であるキヌレニン量も IFN $\gamma$  処理によって有意に増加した (図 1)。



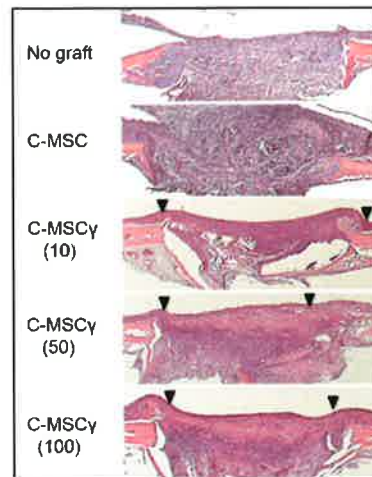
(図 1)

また、CD3 抗体・CD28 抗体による T 細胞増殖刺激によって PBMC の細胞増殖能が増加し、これに C-MSC 共培養は影響を与えなかったのに対し、C-MSC $\gamma$  (50,100)がその増殖能を有意に抑制した。さらに、IDO 阻害剤添加が、この C-MSC $\gamma$  (50,100)による細胞増殖抑制効果を阻害した。(図 2)

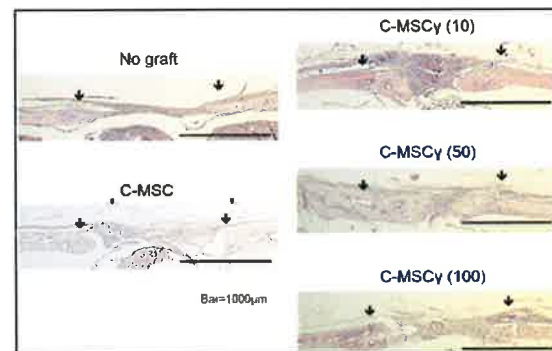


(図 2)

マウス頭蓋冠欠損に大して、ヒト C-MSC 移植は、移植 1 週目において多くのリンパ球浸潤を誘導し、移植 4 週目において骨再生は誘導できなかった。一方、C-MSC $\gamma$ (50)移植は、移植 1 週目に、わずかなリンパ球浸潤が観察され、肥厚した骨膜の再生が認められた。さらに移植 4 週目においては明らかな骨再生が確認された。同様の傾向が C-MSC $\gamma$ (100)移植群においても観察された (図 3、4)。



(図 3. 移植 1 週目)



(図 4. 移植 4 週目)

### 3-2 結論

上記の結果から、IFN $\gamma$  刺激された C-MSC、すなわち C-MSC $\gamma$  は免疫調節性酵素 IDO を高発現することで、T 細胞の活性化を抑制することが示された。また異種移植の検討によって、C-MSC $\gamma$  は宿主からの免疫拒絶応答反応を抑制し、効果的な骨再生を導くことが示唆された。このことは、ヒト同士の他家移植においても同様に、C-MSC $\gamma$  他家移植は、移植拒絶などの好ましくない免疫応答を制御することで、効果的な骨再生を達成できるものと考えられる。

#### 4 今後の展望

IFN $\gamma$  前処理によって免疫調節能の高いC-MS $\text{C}\gamma$ が得られ、上記のように、異種移植可能かつ骨再生能を発揮できることが分かった。しかし、本研究で検討された免疫拒絶は、小動物であるマウスの免疫システムであり、実際の臨床で行う他家移植の場合は、より精密なヒトの免疫システムを制御できる必要がある。そこで、今後は、他家移植が可能であるかを検討するために、ヒト免疫化マウスを作成し、これにC-MS $\text{C}\gamma$ を移植することで免疫拒絶を起こすことなく、骨再生を誘導できるかを検討していきたい。また、同様の実験をラットを用いた他家移植実験も開始しており、良好の結果が得られ始めている。さらに、臨床応用を可能にするために、大動物での実験も必要になる。現在、ビーグル犬の他家移植モデルの作成にも着手している。これら一連の研究成果が、将来、骨再生のための安全・効果的な他家細胞移植治療法の確立につながるものと期待される。

#### 5 研究成果の公表方法

本研究で得られた結果は第 58 回春季日本医州病学会学術開会にて口頭発表を行った。現在、英語論文にまとめ、Stem Cells Research に投稿準備中である。