

# 学位申請論文

マウス骨髄由来間葉系幹細胞の免疫調節能と年齢

國友 雅義

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 機能再生・再建科学専攻

インプラント再生補綴学分野

指導教授

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 インプラント再生補綴学分野

窪木 拓男

## 緒言

中胚葉由来の体性幹細胞である骨髄由来間葉系幹細胞は、自らの機能、性質を保持したまま複製できる自己複製能だけでなく、中胚葉由来の細胞である骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞や、外胚葉組織由来の細胞である神経細胞様細胞へ分化することができる多分化能を有した細胞群とされている<sup>1, 2)</sup>。この間葉系幹細胞の多分化能を応用した組織再生療法<sup>3)</sup>が数多く研究され、臨床応用<sup>4, 5)</sup>もされつつある。他方、近年、間葉系幹細胞の新たな機能として、T細胞、B細胞、NK細胞等の免疫担当細胞の抑制や、サイトカイン産生を抑制したり、制御性T細胞の分化誘導を促進したりするという免疫調節能が注目を浴びるようになった<sup>6-8)</sup>。その免疫調節能は、移植片対宿主病や全身性エリテマトーデスのような難治性の免疫疾患に対し、間葉系幹細胞を全身に移植することで症状が劇的に改善されるという結果からも裏付けられている<sup>9-14)</sup>。これらの間葉系幹細胞の機能を応用した組織再生療法や幹細胞移植療法は、これまで困難であった広範囲の組織再生や難治性免疫疾患に対する新たな解決策として、大きな期待が寄せられている。

一方、現状の間葉系幹細胞を応用した組織再生療法や移植療法を広く臨床応用するためには、改善すべき問題点がいくつか挙げられている。例えば、幹細胞が移植後に宿主免疫応答により死滅すること<sup>15)</sup>、移植幹細胞の標的外定着により肺塞栓症等の重篤な有害事象を引き起こす可能性があること<sup>16)</sup>、宿主免疫の過剰抑制による易感染<sup>17)</sup>や抗腫瘍免疫の弱体化<sup>18)</sup>、さらには、単離、培養した幹細胞の性質を維持したまま無菌状態で大量に培養するための高額なコストなどが問題視されている。これらの問題を解決するために、現在、さまざまな試みがなされている。幹細胞移植に先立って、宿主免疫応答を調節し、移植幹細胞の死滅や機能抑制を最小限にとどめる工夫<sup>19)</sup>や、培養幹細胞を使用せずに、組織から抽出した細胞群をそのまま全身性に移植する方法<sup>20)</sup>、または、細胞移植そのものから脱却し、内在性の宿主幹細胞を炎症・傷害部位に動員・集積させる方法<sup>21-23)</sup>などである。さらには、移植幹細胞の分化能力<sup>24)</sup>や免疫調節能などを高めた<sup>25)</sup>上で、効果は温存しながらより少ない移植幹細胞を移植することで副作用の発生を軽減させる試みもなされている。

ところで、これらの幹細胞を応用した再生療法や免疫療法は、幹細胞の持つ多分化能や免疫調節能に治療効果が左右されるものの、その機能の発現や機序

は、様々な要因によって調節されることが示唆されている。間葉系幹細胞の微小環境であるニッチによる影響<sup>26)</sup>、局所での炎症による影響<sup>27)</sup>、様々な全身疾患による宿主の状態によっても影響を受ける<sup>28)</sup>ことが報告されている。近年、これらの環境要因の中でもとりわけ宿主の老化により、間葉系幹細胞の機能が変化することが懸念されている。宿主の年齢が高くなると幹細胞の細胞接着性が低下したり<sup>29)</sup>、幹細胞の分裂回数に限界が生じたり<sup>30)</sup>、また、骨芽細胞への分化能力が低下したり<sup>31)</sup>する等の報告がなされており、幹細胞機能と宿主の年齢には少なからず関連性があると言える。しかしながら、間葉系幹細胞の免疫調節能と宿主の年齢の変化についてはこれまでほとんど検討がなされておらず、その詳細は未だ不明である。間葉系幹細胞の免疫調節能と宿主の年齢の関係を明らかにすることで、間葉系幹細胞の機能発現機序の一端を解明し、幹細胞機能を維持したり、向上させたりすることが可能になるかもしれない。さらには、老化と自己免疫疾患、抗自己抗体産生の増加、老化による退行性変化の成り立ちと間葉系幹細胞との関係性に新たな知見を得ることにつながる可能性がある。そこで本研究では、宿主の年齢の違いが、間葉系幹細胞の多分化能と免疫調節能にどのような影響を与えるのかを明らかにすることを目的に、週齢

の異なるマウス大腿骨骨髓の形態学的差異や骨髓由来間葉系幹細胞の機能の差を比較検討した。

## 材料ならびに方法

### 1. 実験動物

本研究では週齢の異なるマウス（C57BL6/J，日本クレア株式会社，5 週齢，40 週齢，雌）を使用し，骨髓由来間葉系幹細胞を比較・検討した。また，出血性大腸炎モデル誘導には 8 週齢マウス（C57BL6/J，雌）を使用した。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. マイクロ CT ( $\mu$ CT) 解析

マウスを頸椎脱臼にて安楽死させた後，各週齢マウスより大腿骨を採取し，skyscan (Bruker, MA, USA) にて行った。成長板から 0.5mm 中央へ，幅 1.0mm の大腿骨を測定し，比較・検討を行った<sup>32)</sup>。

### 3. 組織切片作製およびヘマトキシリン・エオジン染色

各週齢のマウス大腿骨を 4 %パラホルムアルデヒドにて浸漬固定した後、10 %エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) にて脱灰し、パラフィンにて包埋した。厚さ 5  $\mu\text{m}$  の切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色 : 1 %エオジン Y 液, デラフィールド・ヘマトキシリン : 武藤化学株式会社, 東京, 日本) を行い, 組織学的解析を行った。

### 4. マウス大腿骨骨髓由来間葉系幹細胞 (mBMSCs) の単離・培養

各週齢マウス大腿骨から骨髓を採取した後, Friedenstein らの方法<sup>33)</sup> によって mBMSCs を単離・培養した。すなわち, 骨髓液を 100 mm プレート (Greiner Bio-One Inc., Frickenhausen, Germany) に播種し, 骨髓細胞播種より 14 日間培養し, コロニー形成を確認した後, Accutase<sup>®</sup> (Innovative Cell Technologies Inc., San Diego, CA, USA) を用いて継代した。第二継代細胞を以降の実験に使用した。培養には, 20%ウシ胎仔血清 (Fetal Bovine Serum : FBS : Life technologies<sup>™</sup>, Gaithersburg, MD, USA) , 2 mM Glutamine (Life technologies<sup>™</sup>), 100 Units/mL penicillin streptomycin (Sigma-Aldrich, St.

Louis, MO, USA), 55  $\mu$ M 2-Mercaptoethanol (2-ME: Life technologies™) 含有 Minimum Essential Medium Alpha basic ( $\alpha$ -MEM : Life technologies™) (以下, マウス通常培養液) を用いて, 37 °C, 5 %CO<sub>2</sub> 気相下で培養した。

## 5. 細胞表面抗原解析

細胞表面抗原の発現をフローサイトメトリーにて解析した。すなわち, それぞれの週齢から単離, 培養した mBMSCs を  $1.0 \times 10^6$  個/100  $\mu$ L の密度でリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline, PBS) に懸濁し, 蛍光標識された一次抗体, あるいは isotype control を添加, 遮光下, 氷上にて 45 分間反応させた。抗体は APC anti-mouse CD146 (BioLegend, San Diego, CA, USA), PE Rat anti-Mouse Ly-6A/E (BD, Franklin Lakes, NJ, USA), PE Rat anti-Mouse CD44 (BD), PE Rat anti-Mouse CD34 (BD), PE Rat anti-Mouse CD14 (BD), PE Hamster anti-Mouse/Rat MCP-1 (BD) を 1  $\mu$ g 使用し, 解析は, Accuri™ C6 Flow Cytometer (BD) を用いて行った。

## 6. mBMSCs の骨芽細胞分化誘導ならびに脂肪細胞分化誘導

各週齢の mBMSCs を以下に示す分化誘導培地を用いて培養し, 多分化能を検討した。

骨芽細胞分化誘導 : 24 ウェルプレート (Greiner Bio-one Inc., Frickenhausen, Germany) にてサブコンフルエントに達するまでマウス通常培養液で培養した。その後, 骨芽細胞分化誘導培地に交換し, 28 日間誘導した。

分化誘導培地には, マウス通常培養液に  $10^{-4}$  M Dexamethasone sodium phosphate, 10 mM L-ascorbic acid, 200mM beta-glycelophosphate を加えたものを使用した。28 日間培養後, カルシウム塩の沈着を Alizarin red-S 染色にて評価した。また, 12 ウェルプレートに播種し, 同様に 28 日間誘導した細胞の total RNA を, Pure Link™ RNA Mini Kit (Life technologies™) を用いて抽出および精製を行った。精製した RNA は iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて逆転写を行い, cDNA を合成した。リアルタイム Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) は増幅反応には, iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) を使用し, 95 °C10 秒, 65 °C30 秒のステップを 40 サイクル繰り返した。内部標準遺伝子として 29s リボソーム

RNA (*s29*) を使用した。解析対象遺伝子およびプライマーの塩基配列を表 1 に示す。

脂肪細胞分化誘導：24 ウェルプレートにてサブコンフルエントまでマウス通常培養液で培養した。その後、脂肪細胞分化誘導培地に交換し、5 日間培養した。

分化誘導培地には 20%FBS, 50mM Isobutylmethylxanthin, 6mM Indomethacine, 0.5mM Hydrocortisone, 10 $\mu$ g/ml Insuline, 10,000U/ml each Penicillin/streptomycin, 10 mM L-ascorbic acid phosphate, 200mM Glutamine, 55mM 2-ME 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM : Life technologies™) を用いて, 37 °C, 5 %CO<sub>2</sub> 気相下で培養した。5 日間培養後, 脂肪滴の形成を Oil Red-O 染色 (Sigma-Aldrich) にて評価した。同様に 12 ウェルプレートに播種した細胞を脂肪細胞分化誘導培地で 5 日間培養し, total RNA を抽出, 精製後, 脂肪分化誘導の際に発現する遺伝子をリアルタイム RT-PCR 法にて解析した。

## 7. 抗炎症性サイトカインの遺伝子発現解析

各週齢の mBMSCs より抽出した total RNA を使用し, 抗炎症性サイトカイ

ンであるインターロイキン 2 (*Il2*) , インターロイキン 10 (*Il10*) , トランスフォーミング成長因子 $\beta$ -1 (*Tgf $\beta$ 1*) , 肝細胞増殖因子 (*Hgf*) の遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR 法にて比較検討した。

## 8. T 細胞の単離, 活性化および培養

8 週齢 C57BL6/J マウス脾臓を摘出し, CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>Naive T cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて, CD4<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> T 細胞を単離した。単離したマウス T 細胞は, Purified NA/LE Hamster Anti-CD3e (BD) にて 3 時間コーティング処理 (3  $\mu$ g/mL) を行った 60 mm プレート (Geiner Bio-one Inc.) に播種し, Purified NA/LE Hamster Anti-CD28 (BD) を添加 (2  $\mu$ g/mL) した培養液で 24 時間培養することで活性化させた。培養は, 10%FBS, 2 mM Glutamin, 100 Units/mL penicillin streptomycin, 55  $\mu$  M 2-ME, 1M 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES: Sigma-Aldrich) , 100 mM Sodium Pyruvate (Sigma-Aldrich) , 100x non-essential amino acids (NEAA: Life technologies™) 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM : Life technologies™) (以下, T 細胞培養液)

を用いて、37°C、5%CO<sub>2</sub>気相下で培養し、mBMSCsとの共培養に使用した。

## 9. T細胞アポトーシス誘導

各週齢の mBMSCs とマウス T 細胞の共培養を行い、幹細胞による T 細胞のアポトーシス誘導能を比較検討した。mBMSCs は、12 ウェルプレートに  $3.0 \times 10^5$  個/ウェルの濃度で播種し、播種してから 24 時間後に活性化 CD4<sup>+</sup>CD62 L<sup>+</sup>T 細胞を  $3.0 \times 10^5$  個/ウェルの密度で mBMSCs のプレートに添加した。共培養 24 時間後、T 細胞のアポトーシスをフローサイトメトリーにて評価した。アポトーシス T 細胞の定量的解析は、APC Rat Anti-Mouse CD4 (1 µg : BD) および FITC-Annexin V Apoptosis Detection kit I (BD) を使用し、Accuri™ C6 Flow Cytometer を用いて行った。また、各週齢 mBMSCs の FASL の発現は PE Rat Anti-Mouse FasL (BD) を用いてフローサイトメトリー解析にて評価した。

## 10. T細胞遊走誘導能の検討

T 細胞に対する遊走誘導能をボイデンチャンバー法 (Corning® FluoroBlok™ 24 Well Plate Permeable Support with 8.0 µm Colored PET Membrane :

Coring Inc., Corning, NY, USA) を用いて検討した。すなわち, 24 ウェルプレートにボイデンチャンバーをセットし, 上部チャンバーには,  $5 \times 10^4$  個/ウェルの密度になるようマウス通常培養液で懸濁した Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE:invitrogen, Carlsbad, CA, USA) にて標識した活性化 T 細胞を播種し, 下部チャンバーには各週齢 mBMSCs を  $0.2 \times 10^5$  個/ウェルの密度で播種し,  $37^\circ\text{C}$ ,  $5\% \text{CO}_2$  気相下で共培養を行った。培養 12 時間後にフィルター下面に遊走した T 細胞を BZ-x710 蛍光顕微鏡 (KEYENCE, Osaka, JPN) 下でランダムに 4 箇所を選択し観察した。また, 各週齢 mBMSCs の MCP-1 の発現は PE Hamster Anti-Mouse/Rat MCP-1 ( $1\mu\text{g}$ , BD) , FOXP3 Fix/Perm Buffer Set (BioLegend) を用いてフローサイトメトリーにて解析した。

## 11. マウス出血性大腸炎モデルの作製と mBMSCs の移植

8 週齢マウスに  $2\%$  デキストラン硫酸ナトリウム水溶液 (DSS : MP Biomedicals, CA, USA) を飲水機にて供給し, 自由に 10 日間経口摂取させることにより, 出血性大腸炎モデルを作製した<sup>33)</sup>。投与 2 日後に, 各週齢 mBMSCs

( $1 \times 10^6$  個/匹) を尾静脈から全身投与し (各  $n=4$ ), 幹細胞移植群とした。全てのマウスは DSS 投与後, 疾患活動度 (表 2) を測定した。すべての群のマウスを誘導 10 日目で屠殺, 大腸を採取し解析を行った<sup>34)</sup>。

## 12. mBMSCs の細胞老化の検討

mBMSCs の細胞老化の評価として Cellular Senescence Kit (OZ BIOSCIENCES, Marseille, France), また, 老化関連因子として知られる P16, P21 タンパク質を抗 P16, P21 抗体 (Abcam, Cambridge, England) にて, それぞれ濃度を P16:  $1 \mu\text{l}/\text{mL}$ , P21:  $1.35 \mu\text{l}/\text{mL}$ , 二次抗体 : goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) を使用し, LAS 4000 (GE Healthcare, Chicago, LA, USA) にて Power Pac Basic (Bio Rad, ) を使用し, ウェスタンブロッティング法により解析を行った。

## 13. 統計解析

各データの統計学的有意性は, one-way ANOVA, unpaired- $t$  検定を行った。また, これらの解析には Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla,

CA, USA) を使用した。

## 結果

### 1. 週齢が異なる大腿骨および骨髄の形態学的比較

5週齢および40週齢マウス大腿骨の $\mu$ CT解析ならびにHE染色による組織学的解析の結果、40週齢大腿骨では、5週齢大腿骨と比較して骨髄腔内における海綿骨梁の著明な減少が観察された(図1A)。また、40週齢大腿骨は、5週齢大腿骨と比較して骨密度、海綿骨梁数の有意な減少が見られ、海綿骨の骨梁間距離が有意に大きいことが認められた(図1B)。 $\mu$ CT解析と同様に、HE染色による組織学的解析においても、40週齢では、海綿骨の著明な減少が見られ、さらに、骨髄中に脂肪組織が多数観察された(図1C)。

### 2. 週齢が異なる mBMSCs の幹細胞表面抗原の比較

フローサイトメトリーによる幹細胞表面抗原の発現解析を行った結果、間葉

系幹細胞陽性抗原である CD146, SCA-1, CD44 はいずれの週齢においても発現が見られたものの, 40 週齢 mBMSCs は 5 週齢 mBMSCs と比較し, それぞれの発現が低いことがわかった (図 2A)。また, 間葉系幹細胞陰性抗原である CD34, CD14 に関しては, いずれの週齢においても発現は見られなかった (図 2B)。

### 3. 週齢が異なる mBMSCs の多分化能の比較

各週齢の mBMSCs を骨分化誘導培地にて 28 日間培養し, 骨芽細胞への分化能を検討した結果, 40 週齢 mBMSCs は, 5 週齢 mBMSCs と比較して, Alizarin Red 染色液に染まるカルシウム塩の沈着が少なく, また, リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析では, アルカリフォスファターゼ (*Alp*) の発現量に差は認められなかったが, オステオカルシン (*Ocn*) の発現は有意に低かった (図 3 A, C)。

一方, 脂肪分化誘導培地にて 5 日間培養し, 脂肪細胞への分化能を検討した結果, 40 週齢 mBMSCs は, 5 週齢 mBMSCs と比較して, Oil red-O 染色液に染まる脂肪滴の形成が多く観察され, また, リアルタイム RT-PCR による遺伝

子発現解析では、リポタンパクリパーゼ (*Lpl*) の発現に差は認められなかったものの、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 $\gamma$  (*Ppar $\gamma$* ) の発現が有意に高かった (図 3 B, D)。

#### 4. 週齢が異なる mBMSCs の *in vitro* における免疫調節能の比較

間葉系幹細胞が発現する抗炎症性サイトカインの遺伝子発現量についてリアルタイム RT-PCR 法にて比較検討した。

40 週齢 mBMSCs は、5 週齢 mBMSCs と比較し、*Il2*, *Il10*, *Hgf* の遺伝子発現に差は認められなかったが、リンパ球の増殖、分化を抑制する効果<sup>35)</sup> が報告されている *Tgfb1* の発現が有意に低い結果となった (図 4)。

また、間葉系幹細胞移植において、重要な役割を持つと報告されている FASL ならびに MCP-1<sup>36)</sup> による免疫調節能を、*in vitro* における活性化 T 細胞と各週齢の mBMSCs をの共培養し、活性化 T 細胞のアポトーシスならびに遊走活性を評価した。その結果、CD146 陽性細胞において、アポトーシスの誘導因子である FASL の発現は、40 週齢 mBMSCs では 5 週齢の mBMSCs に比べ、FASL の発現が低く (図 5A) , また、T 細胞との共培養におけるアポトーシスマーカ

一である AnnexinV 陽性細胞の割合も低い結果となった (図 5B)。

さらに、リンパ球等の単球の遊走促進作用を有するケモカインの一つである MCP-1 の発現は、40 週齢 mBMSCs では 5 週齢 mBMSCs よりも低く (図 6A)、T 細胞の遊走誘導作用が低い結果となった (図 6B)。

#### 5. 週齢が異なる mBMSCs の *in vivo* における免疫調節能の比較

DSS 誘導性出血性大腸炎モデルに対する各週齢 mBMSCs 移植の治療効果を比較した。DSS 投与群では、非投与群であるコントロールと比較して著明な体重減少が観察された。また、5 週齢 mBMSCs 移植群は DSS 群と比べ、有意な体重減少抑制効果を示した (図 7A)。40 週齢 mBMSCs 移植群では有意な体重減少抑制は見られなかったものの、DSS 群と比べ、抑制傾向が見られた (図 7A)。

また、疾患活動度を測定した結果、DSS 投与群では疾患活動度の著明な上昇を認めた。しかしながら、5 週齢 mBMSCs 移植群、40 週 mBMSCs 移植群ともに有意な差は認められなかった (図 7B)。

次に、大腸の組織学的検討により治療効果を評価した。HE 染色において、DSS 投与群では、コントロールと比較して、炎症性細胞の浸潤（白矢頭）や、上皮層の破壊（黒矢頭）が多く観察された。5 週齢 mBMSCs 移植群では、炎症性細胞の浸潤や上皮層の破壊が減少している像が観察されたものの、40 週齢 mBMSCs 移植群では DSS 群と比較し、依然として炎症性細胞の浸潤や上皮層の破壊が多く観察された（図 7C）。

さらに、DSS 投与群では、コントロール群と比較し、著明に大腸が短縮したが、5 週齢 mBMSCs を移植することで有意に短縮抑制効果が見られた。一方で、40 週齢 mBMSCs を移植しても著明な改善は認められなかった（図 7D）。

## 6. 週齢が異なる mBMSCs の細胞老化関連因子の発現について

各週齢における mBMSCs の細胞老化を比較検討した結果、40 週齢 mBMSCs は 5 週齢 mBMSCs と比較して、老化関連  $\beta$ gal 陽性細胞の割合が有意に高く（図 8A）、また、老化関連因子である P16、P21 の発現が高いことが分かった（図 8B）。

## 考察

本研究では、宿主年齢の違いが間葉系幹細胞の機能、とりわけ、免疫調節能にどのような影響を与えるのかを明らかにすることを目的として研究を行った。

週齢が異なる大腿骨の $\mu$ CT解析では、中高齢宿主のモデルである40週齢マウス大腿骨で著明な骨梁および骨密度の低下が見られ、組織学的にも、骨髄中の脂肪組織が多く観察されたことから、週齢の増加によって、脂肪髄化した可能性が考えられた。骨髄の脂肪髄化の役割や影響はほとんど知られていないが、骨髄中の脂肪組織が造血作用に影響すること<sup>37)</sup>が知られており、宿主年齢とともに脂肪髄化することによって、造血系幹細胞と間葉系幹細胞から構成される骨髄ニッチ<sup>38)</sup>の機能に変化が生じる可能性は十分に考えられる。また、脂肪細胞分化の必須転写因子である *Ppar $\gamma$*  は、骨芽細胞分化に必須の転写因子である Runt-related transcription factor 2 (*Runx2*) に対して強力な阻害作用を持つため<sup>39)</sup>、脂肪組織の多い40週齢骨髄より単離された mBMSCs の骨分化能が低いこと、脂肪分化能が高いことは容易に想像される結果である。

また、幹細胞性の指標となる表面抗原は、mBMSCs では CD44, CD73, CD90,

CD105, CD146, stage specific embryonic antigen 4 (SSEA4), SCA-1, platelet-derived growth factor receptor alpha (PDGFR $\alpha$ ), leptin receptor (LEPR) など多くの因子が陽性であることが報告されている<sup>40-43</sup>。今回の研究においても、幹細胞で陽性とされる CD146, SCA-1, CD44 がそれぞれの週齢で発現しており、さらに宿主の年齢に伴ってその発現が減少していることが明らかとなった。しかしながら、mBMSCs はヘテロジニアスな細胞集団<sup>44</sup>であり、単離・培養方法によって細胞集団の構成が変化するとされているため、これら表面抗原発現の強弱のみで細胞集団の性質を比較することは困難である。表面抗原と細胞機能の関係について、PDGFR $\alpha$ や SCA-1, LEPR 陽性細胞と間葉系幹細胞が骨芽細胞へ分化する過程で発現する *Runx2* との関連が報告<sup>45</sup>され、表面抗原と細胞機能の関わりが徐々に明らかにされつつあり、これらの表面抗原と細胞機能の関わりをより詳細に検討して行く必要がある。今回、週齢の異なる mBMSCs の免疫調節能を比較したが、抗炎症性サイトカインとして知られている IL-2, IL-10, HGF の遺伝子発現に著明な差を認めなかった。一方で TGF $\beta$ 1 では遺伝子発現が年齢によって低下しており、TGF $\beta$ を介したT細胞の分裂抑制<sup>46</sup>や炎症性サイトカインの産生抑制<sup>47</sup>、制御性T細胞の分化誘導<sup>48</sup>に

差があるかもしれない。さらに、幹細胞移植療法において、発現が重要である FASL も 40 週齢 mBMSCs の方が発現が低く、*in vitro*において、T 細胞のアポトーシス誘導能が低い結果となった。同様に、T 細胞等の単球の遊走を誘導する MCP-1 の発現も低いことから、出血性大腸炎モデルにおける幹細胞移植療法の効果が、5 週齢 mBMSCs を移植した群よりも低かった理由の一つと考えられる。今回は、幹細胞移植後に疾患マウスの T 細胞アポトーシス誘導を検討していないため、今後、より詳細な検討が必要である。

最後に、週齢の違いによる mBMSCs の細胞老化を比較検討した。40 週齢 mBMSCs は 5 週齢と比較して、老化関連  $\beta$ gal 染色陽性細胞の割合が有意に高く、細胞増殖が停止した細胞の割合が高いことが分かった。さらに、細胞周期を抑制することが知られている P16 や P21<sup>49)</sup> が高く発現していることから、細胞周期が停止し、分裂能力が低下している細胞が多いことがうかがえる。実際、我々の実験においても、5 週齢 mBMSCs が 25 回以上継代できたのに対して、40 週齢 mBMSCs は、6 回の継代で細胞分裂が認められなくなった（結果非提示）。このことから、40 週齢 mBMSCs の分裂限界が短く、細胞老化が進んでいる可能性が示唆された。

今回の結果から、中高齢宿主モデルである 40 週齢マウスより採取した mBMSCs は、骨芽細胞分化能が低く、免疫調節能も低い可能性が示唆された。

このことは、幹細胞の分化能を応用した組織再生療法や免疫調節能を応用した間葉系幹細胞移植療法にとって治療効果を左右する重要な知見である。すなわち、この機能低下を抑制し、幹細胞機能を高めることによって、より効率的な組織再生療法、免疫調節療法が開発できる可能性がある。さらには、内在性幹細胞の機能低下は、組織修復・再生能力の低下、外来因子に対する感染防御力の低下、免疫寛容の崩壊による自己免疫疾患の惹起などに繋がるかもしれない。

したがって、幹細胞機能の低下をより簡便にとらえる技術が開発されれば、宿主内在性幹細胞機能の低下による疾患の発症や退行性変化を未然に防止する新たな治療法の開発につながると考えている。

## 結論

5 週齢と 40 週齢のマウスを比較して、年齢が骨髄や骨髄由来間葉系幹細胞の多分化能と免疫調節能にどのような影響を与えるのかを研究した。その結果、以下の点が明らかになった。

1. マイクロ CT ならびに組織学的評価より、40 週齢大腿骨の骨髄は、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 週齢骨髄由来間葉系幹細胞 (mBMSCs) は、5 週齢 mBMSCs 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。40 週齢 mBMSCs は、5 週齢 mBMSCs 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、*Pparg* 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。
3. 40 週齢 mBMSCs は、5 週齢 mBMSCs 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。

4. 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おいて、5 週齢 mBMSCs を全身性に移植した場合、40 週齢 mBMSCs を移植した場合と比較して、より強い体重減少抑制効果、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が認められた。
5. 40 週齢 mBMSCs は、5 週齢 mBMSCs と比較して、老化関連  $\beta$ gal 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。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、御懇切なる御指導と御校閲を賜りました岡山大学大学院  
医歯薬学総合研究科インプラント再生補綴学分野 窪木拓男教授に深甚なる感  
謝の意を表します。また、研究の遂行に際し、終始御指導、御鞭撻を賜りまし  
た岡山大学病院クラウンブリッジ補綴科 秋山謙太郎講師に謹んで感謝の意を  
表します。さらに本研究を進めるにあたり種々の御配慮、御援助、御助言をい

ただきました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科インプラント再生補綴学分野  
の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

#### 参考文献

- 1) Friedenstein, A.J., Chailakhyan, R.K., Latsinik, N.V., Panasyuk, A.F.  
and Keiliss-Borok, I.V.: Stromal cells responsible for transferring the  
microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and  
retransplantation in vivo. *Transplantation*, **17**, 331-340, 1974.
- 2) Prockop, D.J.: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic  
tissues. *Science*, **276**, 71-74, 1997.
- 3) Stoltz, J.F., de Isla, N., Li, Y.P., Bensoussan, D., Zhang, L., Huselstein,  
C., Chen, Y., Decot, V., Magdalou, J., Li, N., Reppel, L. and He, Y.: Stem  
cells and regenerative medicine: myth or reality of the 21th century.  
*Stem Cells Int.*, **2015**, 19, 2015.

- 4) Sharma, R.R., Pollock, K., Hubel, A. and McKenna, D.: Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion*, **54**, 1418-1437, 2014.
- 5) Young, P.P. and Schäfer, R.: Cell-based therapies for cardiac disease: a cellular therapist's perspective. *Transfusion*, **55**, 441-451, 2015.
- 6) Nauta, A.J. and Fibbe, W.E.: Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*, **110**, 3499-3506, 2007.
- 7) Uccelli, A., Pistoia, V. and Moretta, L.: Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? . *Trends Immunol.*, **28**, 219-226, 2007.
- 8) Uccelli, A., Moretta, L. and Pistoia, V.: Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.*, **8**, 726-736, 2007.
- 9) Le Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, H., Lewis, I., Lanino, E., Sundberg, B., Bernardo, M.E., Remberger, M., Dini, G., Egeler, R.M., Bacigalupo, A., Fibbe, W. and Ringdén, O.: Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*, **363**, 1439-1441, 2004.

- 10) Aggarwal, S. and Pittenger, MF.: Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, **105**, 1815-1822, 2005.
- 11) Augello, A., Tasso, R., Negrini, S. M., Cancedda, R. and Pennesi, G.: Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, **56**, 1175-1186, 2007.
- 12) Sun, L., Akiyama, K., Zhang, H., Yamaza, T., Hou, Y., Zhao, S., Xu, T., Le, A. and Shi, S.: Mesenchymal stem cell transplantation reverses multi-organ dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans. *Stem Cells*, **27**, 1421-1432, 2009.
- 13) Gonzalez, M. A., Gonzalez-Rey, E., Rico, L., Buscher, D. and Delgado, M.: Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology*, **136**, 978-989, 2009.

- 14) Liang, J., Gu, F., Wang, H., Hua, B., Hou, Y., Shi, S., Lu, L. and Sun, L.:  
Mesenchymal stem cell transplantation for diffuse alveolar hemorrhage  
in SLE. *Nat Rev Rheumatol.*, **6**, 486-489, 2010.
- 15) Kean, TJ., Lin, P., Caplan, AI. and Dennis, JE.: MSCs: Delivery routes  
and engraftment, cell-targeting strategies, and immune modulation.  
*Stem Cells Int.*, **2013**, 13, 3013.
- 16) Makela, T., Takalo, R., Arvola, O., Haapanen, H., Yannopoulos, F.,  
Blanco, R., Ahvenjarvi, L., Kiviluoma, K., Kerkela, E., Nystedt, J.,  
Juvonen, T. and Lehenkari, P.: Safety and biodistribution study of bone  
marrow-derived mesenchymal stromal cells and mononuclear cells and  
the impact of the administration route in an intact porcine model.  
*Cytotherapy*, **17**, 392-402, 2015.
- 17) Reinders, ME., Bank, JR., Dreyer, GJ., Roelofs, H., Heidt, S., Roelen,  
DL., Al Huurman, V., Lindeman, J., van Kooten, C., Claas, FH., Fibbe,  
WE., Rabelink, TJ. and de Fijter, JW.: Autologous bone marrow derived  
mesenchymal stromal cell therapy in combination with everolimus to

preserve renal structure and function in renal transplant recipients. *J*

*Transl Med.*, **12**, 331, 2014.

18) Djouad, F., Plence, P., Bony, C., Tropel, P., Apparailly, F., Sany, J., Noël,

D. and Jorgensen, C.: Immunosuppressive effect of mesenchymal stem

cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*, **102**, 3837-3844,

2003.

19) Liu, Y., Wang, L., Kikuri, T., Akiyama, K., Chen, C., Xu, X., Yang, R.,

Chen, W., Wang, S. and Shi, S.: Mesenchymal stem cell-based tissue

regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN- $\gamma$  and

TNF- $\alpha$ . *Nat Med.*, **17**, 1594-1601, 2011.

20) Terai, S., Ishikawa, T., Omori, K., Aoyama, K., Marumoto, Y., Urata, Y.,

Yokoyama, Y., Uchida, K., Yamasaki, T., Fujii, Y., Okita, K. and

Sakaida, I.: Improved liver function in patients with liver cirrhosis after

autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem cells*, **24**, 2292-2298,

2006.

- 21) Hong, H.S., Lee, J., Lee, E., Kwon, Y.S., Lee, E., Ahn, W., Jiang, M.H., Kim, J.C. and Son, Y.: A new role of substance P as an injury-inducible messenger for mobilization of CD29 (+) stromal-like cells. *Nat Med.*, **15**, 425-435, 2009.
- 22) Koning, J.J., Kooij, G., de Vries, H.E., Nolte, M.A. and Mebius, R.E.: Mesenchymal stem cells are mobilized from the bone marrow during inflammation. *Front Immunol.*, **4**, 49, 2013.
- 23) Aikawa, E., Fujita, R., Kikuchi, Y., Kaneda, Y. and Tamai, K.: Systemic high-mobility group box 1 administration suppresses skin inflammation by inducing an accumulation of PDGFR $\alpha$  (+) mesenchymal cells from bone marrow. *Sci Rep.*, **5**, 11008, 2015.
- 24) Ishiy, F. A., Fanganiello, R.D., Griesi-Oliveira, K., Suzuki, A.M., Kobayashi, G.S., Morales, A.G., Capelo, L.P. and Passos-Bueno, M.R.: Improvement of in vitro osteogenic potential through differentiation of induced pluripotent stem cells from human exfoliated dental tissue towards mesenchymal-like stem cells. *Stem Cells Int.*, **2015**, 9, 2015.

- 25) Chen, C., Akiyama, K., Yamaza, T., You, Y.O., Xu, X., Li, B., Zhao, Y. and Shi, S.: Telomerase governs immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells by regulating FAS ligand expression. *EMBO Mol Med.*, **6**, 322-334, 2014.
- 26) Poggi, A. and Giuliani, M.: Mesenchymal Stromal Cells Can Regulate the Immune Response in the Tumor Microenvironment. *Vaccines*, **8**, 4, 2016.
- 27) Ueda M, Fujisawa T, Ono M, Hara E. S, Pham H. T, Nakajima R, Sonoyama W and Kuboki T.: A short-term treatment with tumor necrosis factor-alpha enhances stem cell phenotype of human dental pulp cells. *Stem Cell Res Ther.*, **5**, 31. 2014.
- 28) El-Saghir, J., Nassar, F., Tawil, N. and El-Sabban, M.: ATL-derived exosomes modulate mesenchymal stem cells: potential role in leukemia progression. *Retrovirology*, **13**, 73. 2016.
- 29) James, K., Yu, J., Wei, L., Wen, Z., Tan, H., Guangdong, Z., Scott, B., Antonios, M. and Yilin, C.: Donor age and cell passage affects

differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells.

*BMC Cell Biol.*, **9**, 60, 2008.

30) Zaim, M., Karaman, S., Cetin, G. and Isik, S.: Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Ann Hematol.*, **91** , 1175-1186, 2012.

31) Wilson, A., Ahehadeh, L. A. Yu, H. and Webster, K. A.: Age-related molecular genetic changes of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *BMC Genomicd.*, **11**, 229, 2010.

32) Maeda, A., Ono, M., Holmbeck, K., Li, L., Kilts, T. M., Kram, V., Noonan, M. L., Yoshioka, Y., McNerny, E. M., Tantiillo, M. A., Kohn, D. H., Lyons, K. M., Robey, P. G. and Young, M. F.: WNT1-induced secreted protein-1 (WISP1) , a novel regulator of bone turnover and Wnt signaling. *J Biol Chem.*, **29**, 290, 2015.

33) Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K. and Lalykina, K.S.: The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.*, **3**, 393-403, 1970.

- 34) Alex, P., Zachos, N.C., Nguyen, T., Gonzales, L., Chen, T.E., Conklin, L.S., Centola, M. and Li, X.: Distinct cytokine patterns identified from multiplex profiles of murine DSS and TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis.*, **15**, 341-352, 2009.
- 35) Ding, G., Niu, J. and Liu, Y.: Dental pulp stem cells suppress the proliferation of lymphocytes via transforming growth factor- $\beta$ 1. *Hum Cell*, **28**, 81-90, 2015.
- 36) Akiyama, K., Chen, C., Wang, D., Xu, X., Qu, C., Yamaza, T., Cai, T., Chen, W., Sun, L. and Shi, S.: Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell*, **10**, 544-555, 2012.
- 37) Naveiras, O., Nardi, V., Wenzel, PL., Hauschka, PV., Fahey, F. and Daley, GQ.: Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature*, **460**, 259-263, 2009.
- 38) Méndez-Ferrer, S., Michurina, TV., Ferraro, F., Mazloom, A.R., Macarthur, B.D., Lira, S.A., Scadden, D.T., Ma'ayan, A., Enikolopov,

- G.N. and Frenette, P.S.: Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, **466**, 829-834, 2010.
- 39) Kawai, M., Sousa, K.M., MacDougald, O.A. and Rosen C.J.: The many facets of PPARgamma: novel insights for the skeleton. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, **299**, E3-9, 2010.
- 40) Atsuta, I., Liu, S., Miura, Y., Akiyama, K., Chen, C., An, Y., Shi, S. and Chen, F.M.: Mesenchymal stem cells inhibit multiple myeloma cells via the Fas/Fas ligand pathway. *Stem Cell Res Ther.*, **4**, 111, 2013.
- 41) He, L., Zheng, Y., Wan, Y. and Song, J.: A shorter telomere is the key factor in preventing cultured human mesenchymal stem cells from senescence escape. *Histochem Cell Biol.*, **142**, 257-267, 2014.
- 42) Farahani, R.M. and Xaymardan, M.: Platelet-derived growth factor receptor alpha as a marker of mesenchymal stem cells in development and stem cell biology. *Stem Cells Int.*, **2015**, 8, 2015.
- 43) Yue, R., Zhou, B.O., Shimada, I.S., Zhao, Z. and Morrison, S.J.: Leptin receptor promotes adipogenesis and reduces osteogenesis by

regulating mesenchymal stromal cells in adult bone marrow. *Cell Stem Cell*, **18**, 782-796. 2016.

44) Rennerfeldt, D. and Van Vliet, K.J. : Concise Review: When colonies are not clones: evidence and implications of intracolony heterogeneity in mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, **34**, 1135-1141, 2016.

45) Takarada, T., Nakazato, R., Tsuchikane, A., Fujikawa, K., Iezaki, T., Yoneda, Y. and Hinoi, E.: Genetic analysis of Runx2 function during intramembranous ossification. *Development*, **143**, 211-218, 2016.

46) McKarns, S.C. and Schwartz, R.H.: Distinct effects of TGF-beta 1 on CD4+ and CD8+ T cell survival, division, and IL-2 production: a role for T cell intrinsic Smad3. *J Immunol.*, **174**, 2071-2083, 2005.

47) Yoshimura, A., Wakabayashi, Y. and Mori, T.: Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta. *J Biochem.*, **147**, 781-792. 2010.

48) Kurebayashi, Y., Baba, Y., Minowa, A., Nadya, N.A., Azuma, M., Yoshimura, A., Koyasu, S. and Nagai, S.: TGF- $\beta$ -induced

phosphorylation of Akt and Foxo transcription factors negatively regulates induced regulatory T cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.*, **480**, 114-119, 2016.

49) ) Kundrotas, G., Gasperskaja, E., Slapsyte, G., Gudleviciene, Z., Krasko, J., Stumbryte, A. and Liudkeviciene, R.: Identity, proliferation capacity, genomic stability and novel senescence markers of mesenchymal stem cells isolated from low volume of human bone marrow. *Oncotarget.*, **7**, 10788-10802. 2016.