

氏名	松永 直也
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7254号
学位授与の日付	令和7年3月25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	持続的な腫瘍壊死因子- α 刺激がマウス間葉系幹細胞の免疫調節機能に与える影響
論文審査委員	岡村 裕彦 教授 高柴 正悟 教授 西田 崇 准教授

学位論文内容の要旨

【目的】

間葉系幹細胞 (MSCs) は、骨芽細胞・脂肪細胞等に分化する多分化能を持ち、生体の組織再生や恒常性維持に関与していることが知られている。また、MSCs は、炎症性サイトカインの分泌抑制や T 細胞のアポトーシスを制御する免疫調節機能を有することも報告されている。我々の研究グループでは、抗原提示細胞であるマクロファージが分泌する腫瘍壊死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α : TNF- α) が、MSCs の免疫調節機能を向上させ、組織再生を促進する可能性を報告してきた (Aung et al., 2024)。これは、炎症が再生を促す「炎症・再生連関」の概念に基づいた知見ではあるが、一方で、長期にわたる炎症性刺激は、炎症局所における MSCs の骨芽細胞分化能を低下させることも報告されている (Akiyama et al., 2012, Chen et al., 2015)。この現象は、持続的な炎症性刺激により MSCs が免疫調節機能を十分に発揮できない「疲弊」した状態である可能性を示唆している。しかしながら、MSCs の免疫調節機能の疲弊に関する研究はなく、その詳細は明らかにされていない。そこで、本研究では持続的な炎症性刺激が、MSCs の免疫調節機能に与える影響を検討し、「免疫調節疲弊」の状態を引き起こす可能性を明らかにすることを目的とした。

【方法】

C57BL/6J マウス (10 週齢, 雌) を安楽死させ、大腿骨髄由来 MSCs およびマクロファージを単離・培養し、以後の実験に使用した。(岡山大学動物実験委員会承認 OKU-2018189, 2021377)

実験 1: M1 マクロファージとの共培養による MSCs の遺伝子発現の変化

マクロファージを Lipopolysaccharide (LPS: 100 ng/ml) および Interferon- γ (20 ng/ml) の存在下で培養して M1 マクロファージへの分化を誘導後、カルチャーインサート法で MSCs との間接共培養を行った。MSCs は、共培養開始後 0, 12, 24, 36, 48 時間後にそれぞれ回収し、total RNA を抽出・精製した。逆転写酵素を用いて cDNA を作製、real-time PCR 法で MSCs の免疫調節遺伝子 (*Transforming Growth Factor beta 1*, *Hepatocyte Growth Factor*, *Interleukin 10*, *Fas Ligand*), 免疫チェックポイント遺伝子 (*Programmed Cell Death 1*, *Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4*) の発現を解析した。対照群は非共培養群とした (各群 n=3)。

実験 2: TNF- α 刺激による MSCs の遺伝子発現レベルの変化

MSCs 培養液にマウスリコンビナント TNF- α を添加 (10 ng/mL) し、0, 12, 24, 36, 48 時間培養

後、回収した。無添加群を対照群とし（各群 n=3）、実験 1 と同様の遺伝子および *Tnf- α* 転写活性遺伝子 (*Nuclear Factor Kappa B Subunit 1*) の発現レベルを解析した。また、免疫細胞化学染色 (ICC) にて、Transforming Growth Factor beta 1 (TGF β 1)、Interleukin 10 (IL-10)、Programmed Cell Death-1 (PD-1) 陽性細胞を検出し、刺激群と非刺激群で陽性細胞率の変化を ImageJ software を用いて比較検討した。

実験 3：TNF- α 刺激除去後の MSCs の遺伝子発現レベルの変化

実験 2 と同様に TNF- α にて 36 時間刺激後、TNF- α を除去した培地に交換し、さらに、0、12、24、36、48 時間培養後、回収した（各群 n=3）。実験 1 と同様の遺伝子に加え、アポトーシス関連遺伝子である *Bcl-2 Associated X* および *Caspase3* の遺伝子発現レベルを解析した。

実験 4：In vivo による炎症モデルマウスを用いた MSCs の免疫調節機能関連タンパク発現細胞数の変化

C57BL/6J (10 週齢、雌) に LPS (*Escherichia coli* 由来、5 mg/kg、腹腔内注射) を投与し、in vivo 炎症モデルとした。投与した初日を 0 日目として、3、6 日目と 3 回投与し、7 日目で安楽死させた。大腿骨を回収、凍結切片を作製後、免疫組織化学染色 (IHC) にて Platelet-Derived Growth Factor Receptor α (PDGFR α)、TGF β 1、PD-1 を検出し、MSCs における陽性細胞数率の変化を比較検討した。

統計解析

各実験結果から得られたデータの平均値の差の統計学的有意性は、GraphPad Prism 9 を用いて一元配置分散分析、Tukey の多重比較検定および対応のない t 検定を行い評価した。

【結果】

実験 1：MSCs と M1 マクロファージの共培養による遺伝子発現レベルの変化

共培養により、免疫調節遺伝子の発現レベルは共培養後 12~24 時間で一時的に上昇したが、24~36 時間以降では低下した。一方、免疫チェックポイント遺伝子の発現は時間依存的に有意に上昇した。

実験 2：TNF- α 刺激による遺伝子発現レベルの変化

TNF- α 刺激により免疫調節遺伝子の発現レベルは 12 時間で一時的に上昇したが、24~48 時間で低下した。ICC 解析では TGF β 1、IL-10 陽性細胞数が 12 時間で増加した後減少した。一方、免疫チェックポイント遺伝子の発現レベルは時間経過とともに発現が上昇し、ICC でも PD-1 陽性細胞数が増加した。

実験 3：TNF- α 刺激除去後の遺伝子発現レベルの変化

TNF- α 刺激除去後では、免疫調節遺伝子の発現レベルは低下したまま、かつ免疫チェックポイント遺伝子の発現は上昇したままであり、対照群の発現レベルまで戻ることはなかったが、アポトーシス関連遺伝子は 36 時間まで上昇が続き、その後は低下した。

実験 4：LPS 刺激による in vivo 炎症モデル

LPS の継続投与によりマウス骨髄 MSCs における抗炎症性サイトカイン (TGF β 1) 陽性細胞数率は減少し、逆に免疫チェックポイント因子 (PD-1) 陽性細胞率は増加した。

【考察・結論】

本研究では、MSCs の TNF- α によって、免疫調節遺伝子の発現レベルが一時的に上昇するものの、刺激が持続することで発現レベルが低下し、同時に免疫チェックポイント遺伝子の発現レベルが時間依存的に増加することが確認された。In vivo における検証においても、LPS の継続投与により TGF β 1

陽性 MSCs が減少し、PD-1 陽性 MSCs の割合が増加することが観察され、これらの結果は、MSCs が短期間の炎症性刺激には応答するが、持続的な炎症性刺激環境では、免疫調節機能の低下および免疫チェックポイント機能の上昇という、免疫調節疲弊状態に移行する可能性を強く示唆している。

免疫調節疲弊状態を引き起こす機序として、持続的な Nuclear Factor Kappa B シグナルの活性化が Signal Transducer and Activator of Transcription 3 や Activator Protein-1 をそれぞれ活性化し、これらの転写因子が協調的に作用し、免疫チェックポイント遺伝子の発現を促進させている可能性が考えられる。また、TNF- α 刺激除去後も免疫調節機能が完全には回復せず、アポトーシス関連遺伝子の発現レベルが持続していたことから、長期的な炎症性刺激が MSCs の細胞死を誘導し、不可逆的な機能変化を引き起こす可能性もある。

これらの知見は、慢性炎症性疾患において、炎症局所での MSC の免疫調節機能が低下する可能性を示しており、今後、炎症性環境が MSCs の免疫調節機能をどのように変化させるかを分子レベルで理解することが重要と考えられた。

本研究の成果は、持続的な炎症性刺激が MSCs の免疫調節機能を変化させるメカニズム解明の礎となると考えられる。

論文審査結果の要旨

【緒言】局所における持続的な炎症性刺激は、骨髄由来間葉系幹細胞（MSCs）の骨芽細胞への分化能を低下させる。この過程において、MSCsは免疫調節機能を十分に発揮できない「疲弊」した状態にあることも示唆されているが、その詳細については未知の点が多い。本研究では、マクロファージ由来の腫瘍壊死因子- α （Tumor Necrosis Factor- α : TNF- α ）による持続的な炎症性刺激が、MSCsの「免疫調節機能の疲弊状態」を誘導するかについて調べた。

【方法】C57BL/6Jマウス（10週齢、雌）の大腿骨からMSCsとマクロファージを単離・培養し、実験に使用した。マクロファージをLipopolysaccharide（LPS）とInterferon- γ にてM1マクロファージへと分化誘導後、MSCsとカルチャーインサートにて間接共培養を行った。48時間後まで12時間毎にReal-time PCR法にてMSCs内での免疫調節遺伝子（*Transforming Growth Factor beta 1*、*Interleukin 10*、*Fas Ligand*）と免疫チェックポイント遺伝子（*Programmed Cell Death 1*、*Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4*）の発現を解析した。次に、MSCsをマウスリコンビナントTNF- α で刺激し、前述の遺伝子群とTumor Necrosis Factor- α の転写に関わる遺伝子Nuclear Factor Kappa B Subunit 1の発現を解析した。さらに、MSCsをTNF- α で36時間刺激後にTNF- α を除去した培地で培養し、前述の遺伝子群とアポトーシス関連遺伝子*Bcl-2 Associated X*と*Caspase3*の発現を解析した。

また、C57BL/6Jマウス腹腔内にLPSを投与し、*in vivo*炎症モデルを作製した。回収した大腿骨の凍結切片を作製し、免疫組織染色にてTransforming Growth Factor beta 1（TGF β 1）、Programmed Cell Death-1（PD-1）を検出し、骨髄内のMSCsにおける陽性細胞率を調べた。

【結果】*in vitro*実験では、免疫調節遺伝子の発現レベルは共培養後12～24時間で一時的に上昇したが、24～36時間以降では減少した。一方、免疫チェックポイント遺伝子の発現レベルは時間依存的に上昇した。TNF- α 刺激で、MSCsの免疫調節遺伝子の発現レベルは、12時間で一時的に上昇し、24～48時間で減少した。TNF- α 刺激後にこれを除去すると、TNF- α 無刺激の対照群と比較して、免疫調節遺伝子の発現レベルは減少したまま、かつ免疫チェックポイント遺伝子の発現レベルは上昇したままであり、対照のレベルに戻ることはなかった。一方、アポトーシス関連遺伝子の発現レベルは36時間まで上昇し、その後は低下した。

*in vivo*炎症モデルでは、LPS投与後のMSCsにおいて、抗炎症性サイトカインTGF β 1陽性細胞が減少し、免疫チェックポイント因子であるPD-1陽性細胞が増加した。

【考察】本研究によって得られた結果は、マウスMSCsが短期的な炎症性刺激には免疫調節遺伝子発現を上昇させ、長期の持続的な炎症性刺激には免疫調節遺伝子発現を減少および免疫チェックポイント遺伝子発現を上昇させるという免疫調節疲弊状態に移行する可能性を示唆している。また、長期的な炎症性刺激がMSCsの細胞死の誘導を引き起こす可能性を示した。

以上の成果は、持続的な炎症性刺激がMSCsの免疫調節機能を変化させるメカニズム解明の礎となるものである。よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。