

氏 名	窪木 慎野介
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7447号
学位授与の日付	令和 8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	環境依存的に可塑性を示す CAR 細胞 -in vitro での特性消失と in vivo での再誘導-
論文審査委員	久保田 聡 教授 上岡 寛 教授 大森 一弘 准教授

学位論文内容の要旨

骨髄では、生涯を通じて血球細胞の産生が絶えず行われており、その基盤となる微小環境（骨髄ニッチ）の形成には支持細胞の働きが不可欠である。なかでも、骨髄由来間葉系間質細胞の多くを占める *C-X-C Motif Chemokine Ligand 12 (Cxcl12)*-Abundant Reticular Cell (CAR 細胞) は、血球系細胞と接着する突起を持つ細網細胞であり、造血幹細胞の維持や免疫担当細胞の産生を支える骨髄ニッチを形成することで、骨髄機能の中心的役割を担う。近年、タモキシフェン誘導性の系譜標識マウスを用いた解析により、損傷刺激に応答して CAR 細胞が一度、より未分化な状態へ脱分化し、再び骨芽細胞へ分化するという可塑性の概念が提唱されている。しかし、本結果は分化経路推定解析に基づく間接的証拠であり、CAR 細胞が可塑性を有することを直接的に実証した研究は存在しない。そこで本研究では、①CAR 細胞は *in vitro* 培養により特性を喪失するか、②一度失われた特性が *in vivo* の適切な環境下で再び獲得されるか、という二点を、シングルセル RNA シーケンス (scRNA-seq)、バルク RNA シーケンス (bulk RNA-seq)、および組織学的解析を組み合わせ検証した。

はじめに、*Cxcl12*-GFP マウス大腿骨骨髄の非血球系細胞と、同マウス大腿骨骨髄細胞を培養して得られた培養 3 日目の細胞を対象に scRNA-seq 解析を行った。Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP)により二次元上に可視化した結果、骨髄細胞と培養細胞は明確に分離し、全く異なる細胞集団として識別された。骨髄細胞には *Cxcl12*, *Leptin Receptor (Lepr)*, *Adiponectin (Adipoq)*を高発現する CAR 細胞が存在したが、培養細胞に CAR 細胞に類似する遺伝子発現プロファイルをもつ細胞は認められなかった。発現変動遺伝子解析の結果、2940 遺伝子に発現差が認められ、培養細胞では *Cxcl12* や *Lepr* など CAR 細胞関連遺伝子が著しく低下し、*Timp Metalloproteinase Inhibitor 1 (Timp1)*や *Actin Alpha 2 (Acta2)*など線維化・筋線維芽細胞関連遺伝子が上昇していた。これらの結果から、CAR 細胞特性は *in vitro* で速やかに喪失することが明らかとなった。

次に、CAR 細胞特性を失った細胞が適切な環境により CAR 細胞様特性を再獲得しうるかを検討するため、大腿骨 CAR 細胞、培養 3 日目の GFP 陽性細胞（培養 GFP 陽性細胞）、および培養 GFP 陽性細胞を Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2)/ β -Tricalcium Phosphate (β -TCP) とともに移植して形成された異所性骨から回収した GFP 陽性細胞（異所性骨 GFP 陽性細胞）の 3 群で bulk RNA-seq 解析を行った。主成分解析の結果、培養 GFP 陽性細胞は大腿骨 CAR 細胞から大きく乖離し、発現変動遺伝子数は 7,459 であった。一方、異所性骨 GFP 陽性細胞は大腿骨 CAR 細胞と近い位置に分布し、発現変動遺伝子数は 545 であった。次に、詳細な解析を行うため、Transcripts Per Million (TPM)を用いて 3 群間比較を行った。その結果、培養 GFP 陽性細胞の CAR 細胞関連遺伝子の発現は大腿骨 CAR 細胞と比較し有意に低下したが（一元配置分散分析, Tukey 検定, *Cxcl12*: $p < 0.05$, *Kitl*: $p < 0.05$, *Ebf3*: $p < 0.05$, *Runx2*: $p < 0.05$, *Foxc1*: $p < 0.05$, *Adipoq*: $p < 0.05$), 異所性骨 GFP 陽性細胞の CAR 細胞関連遺伝子の発現が回復し、大腿骨 CAR 細胞と比較し有意差は認められなかった。また、組織学的解析の結果、異所性骨組織内には *Cxcl12*-GFP と *LepR* を共発現し、細長い突起を有して類洞周囲に局在する CAR 細胞様形態を示す細胞が観察された。

以上より、CAR 細胞は *in vitro* では速やかに特性を喪失するものの、BMP-2 により誘導される異所性骨モデルという *in vivo* の適切な環境下では、再び CAR 細胞様の性質を獲得し得ることが明らかとなった。本研究は、CAR 細胞の可塑性を直接示した初めての知見であり、骨髓ニッチの理解に新たな視点を提供するものである。また、本成果は CAR 細胞の安定的な培養条件の確立、骨髓ニッチ模倣培養系の構築、さらには造血機能制御に向けた基盤形成に資するものと期待される。

論文審査結果の要旨

【緒言】 骨髄由来間葉系間質細胞の多くを占める *Cxcl12* Abundant Reticular (CAR) 細胞は、血球系細胞と接着する突起を持つ細網細胞であり、造血幹細胞の維持や免疫担当細胞の産生を支える骨髄ニッチを形成することで、骨髄機能の中心的役割を担う。近年、損傷刺激に応答して CAR 細胞が一度、より未分化な状態へ脱分化し、再び骨芽細胞へ分化するという可塑性の概念が提唱されているが、それには分化経路推定解析に基づく間接的証拠しかなく、CAR 細胞が可塑性を有することを直接的に実証した研究は存在しない。そこで本研究では、CAR 細胞は *in vitro* 培養により特性を喪失するか、そして一度失われた特性が *in vivo* の適切な環境下で再び獲得されるかを検証した。

【方法】 *Cxcl12*-GFP マウス大腿骨骨髄細胞を回収し、*in vitro* で播種した。培養 3 日後に、培養皿に接着した CD51 陽性細胞 (以下培養細胞) および、大腿骨非血球系細胞に対して scRNA-seq 解析を行った。さらに、CAR 細胞を含む骨・骨髄ニッチを異所性に構築することが可能な BMP-2 誘導骨再生モデルを用いて検討した。具体的には、培養細胞を BMP-2/ β -TCP とともに野生型マウスの背部皮下へ移植した。移植 4 週後に異所性骨より GFP 陽性細胞を単離し、大腿骨 CAR 細胞、GFP 陽性の培養細胞とともに bulk RNA-seq 解析を行った。加えて、組織学的解析により局在と形態を評価した。

【結果】 scRNA-seq 解析では、UMAP により二次元上に可視化した結果、骨髄細胞と培養細胞が明確に分離し、培養細胞群に CAR 細胞様集団は認められなかった。培養により *Cxcl12*、*Lepr* など CAR 細胞関連遺伝子は低下し、多くの細胞で *Acta2*、*Timp1* など線維化関連遺伝子が上昇した。bulk RNA-seq 解析では、主成分解析の結果、培養 GFP 陽性細胞は大腿骨 CAR 細胞から大きく乖離した一方、異所性骨由来 GFP 陽性細胞は大腿骨 CAR 細胞に近接し、低下した CAR 細胞関連遺伝子発現の回復を認めた。組織学的にも異所性骨内に *Cxcl12*-GFP と *LepR* を共発現し、類洞周囲に局在する CAR 細胞様細胞が確認された。

【考察】 本研究により、CAR 細胞は *in vitro* 培養下で速やかに特性を喪失する一方、異所性骨モデルが提供する *in vivo* 環境下では骨髄間葉系間質細胞様特性を再獲得し得ることが示された。これは CAR 細胞が環境依存的に表現型を変化させる可塑性を直接支持する知見であり、CAR 細胞維持に必要なニッチ要因の重要性を示唆するものである。

以上の成果は、CAR 細胞の可塑性を直接示した初めての知見であり、骨髄ニッチの理解に新たな視点を提供するものである。また本成果は、CAR 細胞の安定的な培養条件の確立、骨髄ニッチ模倣培養系の構築、さらには造血機能制御に向けた基盤形成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。