

原

著

## ヒト骨髓由来間葉系幹細胞, 骨芽細胞の T 細胞に対する抑制効果

北 嶋 俊 樹

新潟大学大学院医歯学総合研究科 生体機能調節医学専攻

機能再建医学講座 血液学分野

(主任: 相澤義房教授)

### T - cell Suppression by Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells (BM - MSCs) and BM - MSC - differentiated Osteoblasts

Toshiki KITAJIMA

Division of Hematology,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Yoshifusa AIZAWA)

#### 要 旨

【目的】間葉系幹細胞 (MSC) は, 骨芽細胞, 軟骨細胞, 脂肪細胞といった間葉系細胞に分化し, 骨髓間質細胞を形成する細胞である. MSC は主にマウスや細胞株を用いた検討により, 造血前駆細胞を支持すると同時に免疫抑制作用も併せ持ち, 特に活性化 T 細胞の増殖を抑制することが知られている. しかし, ヒトの primay MSC を用いた研究は未だ少ない. また MSC から分化しうる骨芽細胞から形成される osteoblastic niche における免疫調節については過去に報告がない. 本研究ではヒト骨髓細胞から分化誘導した MSC および骨芽細胞の, 同種活性化 T 細胞に対する作用を検討した.

【方法】健常人の骨髓単核球を分離, 培養して MSC を得, さらに骨芽細胞に分化誘導した. これらの培養 MSC, 培養骨芽細胞に, 別の健常人末梢血から分離した単核球 (PB - MNC) を加えて, anti - CD3/CD28 beads 存在下で 72 時間共培養した. 最後の 4 時間, Phorbtor 12 - Myristate 13 - Acetate, Ionomycin, Brefeldin A を加えて刺激した. 共培養後の PB - MNC の数, T 細胞のサイトカイン産生能を測定し, さらに MSC, 骨芽細胞の各種遺伝子発現を定量 RT -

Reprint requests to: Toshiki KITAJIMA  
Division of Hematology  
Niigata University Graduate School of Medical  
and Dental Sciences  
1 Asahimachi - dori Chuo - ku,  
Niigata 951 - 8510 Japan

別刷請求先: 〒951 - 8510 新潟市中央区旭町通 1 番町  
新潟大学大学院医歯学総合研究科生体機能調節医学  
専攻機能再建医学講座血液学分野 北 嶋 俊 樹

PCRで検討した。

【結果】共培養により、培養MSC、培養骨芽細胞存在下で活性化T細胞の増殖が抑制された。培養MSC、培養骨芽細胞はCD8陽性T細胞のIFN- $\gamma$ 、IL-2の産生能を低下させた。T細胞との接着阻害により、培養MSC、培養骨芽細胞ともIL-2産生能の低下は解除された。共培養後の培養MSC、培養骨芽細胞ではiNOS、IDO、LIF、IL-10のmRNA発現が誘導された。

【結論】ヒト骨髓由来MSC、骨芽細胞は活性化T細胞に対し、その増殖抑制とサイトカイン産生能の低下をもたらし、免疫抑制的に作用する。

## 緒 言

骨髓は骨髓間質細胞と骨髓マトリックスから構成され、成体のヒトの造血の「場」として、造血幹細胞から各種造血細胞が分化し末梢血液中に供給される臓器である。生涯にわたる造血の維持を可能にしている造血システムのメカニズムは古くから研究の対象となっており、特に造血幹細胞の維持や分化のメカニズムについて、主に血球側の因子について研究が進んできた。現在では系列特異的転写因子のstochasticな発現により分化の運命づけがなされ、系統特異的サイトカインシグナルにより分化した細胞の生存、増殖がもたらされると考えられている<sup>1)~3)</sup>。分化の過程は成体における定常状態では一定の階層性を形成しているが、前駆細胞レベルにおいては転写因子の発現の変化やサイトカインシグナルの変化によるline-age switchがおこりうることも報告されている<sup>4)5)</sup>。

一方、骨髓微小環境を形成する骨髓間質細胞と骨髓マトリックスは、外的刺激として、造血細胞の分化増殖に重要な働きを担っていると考えられる。骨髓微小環境は多様な細胞群により形成されているため、詳細な造血細胞との関係については研究が進展せず、造血の維持に必要な特別な「場」すなわち造血ニッチは長く概念的なものであった。近年BMPレセプターIAやPTHrP受容体の遺伝子改変マウスの研究により骨芽細胞が造血幹細胞のニッチとして機能することが明らかにされ、さらにN-cadherin陽性の紡錘形骨芽細胞が長期造血再構築能を持つ造血幹細胞を支持していることが報告され、osteoblastic nicheと呼ばれている<sup>6)7)</sup>。造血細胞は造血幹細胞から分化するにつれてosteoblastic nicheから離れ、傍血管内皮細

胞領域へ移動し血管内へ供給されていくと考えられるが、分化段階の前駆細胞と骨髓微小環境の関係についてはいまだ研究が進んでいない。

MSCは、骨髓中に0.001%~0.01%という極めて低い頻度で存在する細胞である。他に脂肪や胎児肝組織、胎盤からも分離可能であると報告されている<sup>8)9)</sup>。骨髓中で骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞という間葉系細胞に分化し、細網細胞や血管内皮細胞とともに骨髓間質細胞を形成する<sup>10)</sup>。さらに骨髓外では心筋、骨格筋、神経細胞など多様な間葉系細胞へ分化しうる多能性の前駆細胞である<sup>11)12)</sup>。MSCの造血支持能については生体内の定常状態においてはその存在数の少なさよりその関与は明確には示されていないが、培養条件下においては、造血前駆細胞の増殖を支持することが示されている<sup>13)</sup>。NOD/SCIDマウスを用いたヒト造血幹細胞の移植モデルにおいて生着を促進することが報告されており<sup>14)</sup>、実際の造血幹細胞移植の臨床例においてもMSC同時移植により造血回復が促進されたという報告がされているが、造血幹細胞の生着に与える作用については結論をみていない<sup>15)16)</sup>。一方、MSCは主にマウスやcell lineを用いた検討によりT細胞、NK細胞、樹状細胞などに対し、免疫抑制的に作用することが報告されている<sup>17)~19)</sup>。特にNOの産生を介し活性化T細胞の増殖を抑制することが明らかにされている<sup>20)</sup>。しかしヒトのprimaryなMSCを用いた研究は少なく、ヒト生体での機能は十分明らかにされていない。MSCはHLA class Iを発現しており、さらにIFN- $\gamma$ によりHLA class IIも誘導的に発現するが、costimulatory moleculeを発現しておらず、同種反応性T細胞を刺激しない。このことにより同種造血幹細胞移

植後のステロイド抵抗性重症移植片対宿主病 (graft versus host disease; GVHD) の治療に 3rd party の MSC の投与が試みられ有効性を示した報告もなされている<sup>21)22)</sup>。このことは、骨髓環境においても MSC による免疫調節作用が同種造血幹細胞移植の際の生着や移植片対白血病効果 (GVL) に何らかの働きを果たしている可能性を示唆する。さらに骨髓内における MSC が極めて minor な population であることを考えれば、MSC から分化した骨髓間質細胞も何らかの免疫調節能を担っている可能性が考えられる。

MSC から分化しうる骨髓間質細胞のうち、骨芽細胞は骨髓内で造血幹細胞のニッチとして働くが、周囲にはT細胞、マクロファージといった免疫担当細胞も存在している。すなわち造血ニッチは、同種造血幹細胞移植で造血幹細胞が生着に際し同種免疫反応を受け、また白血病幹細胞が同種免疫反応 (すなわち GVL) を受ける「場」でもあると考えられる。しかしながら osteoblastic niche においていかなる免疫調節が働いているかについての報告は過去にない。本研究ではヒト骨髓細胞から分化誘導した MSC および骨芽細胞の、同種活性化T細胞に対する作用を検討した。

## 材料と方法

### ヒト間葉系幹細胞 (MSC) と骨芽細胞の培養、分化誘導

Informed consent を得たのち健康人の腸骨からヘパリン加採取した骨髓液を、Lymphoprep (Axis Shield PoC AS, Oslo, Norway) 上に重層させ、比重遠心法で骨髓単核球 (BM-MNC) 分画を採取した。PBS で2回洗浄した後、チュルク液で10倍に希釈し、Burker-Turk 計算板を用いて検鏡下で細胞数を計測した。1 × 10<sup>6</sup> の BM-MNC を、非コート of the 6-well プレート上で Mesencult basal medium (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) に Mesenchymal stem cell stimulatory supplements (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) を 10 % の濃度で加えた培養液中で 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。

培養液は3日毎に全量交換し、浮遊している骨髓由来の血液細胞を除去した。約14日間培養し、semiconfluent となった時点で Trypsin/EDTA (Invitrogen) を用いて再浮遊させ、PBS で2回洗浄し、同培養液で 1/3 の濃度にして継代培養した。同様の継代培養を2回繰り返し、最終的に confluent の MSC を得た。また、MSC の一部を2回目の継代以降 Mesencult basal medium に Osteogenic stimulatory supplements (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canada) 15 %, Dexamethasone (StemCell Technologies.) 1 × 10<sup>-8</sup> μM, Ascorbic acid (StemCell Technologies.) 5 × 10<sup>-2</sup> mg/mL を加えた培養液中で約10日間培養し、骨芽細胞に分化誘導した。

### ヒト末梢血単核球の分離

Informed consent を得たのち健康人の末梢血をヘパリン加採取し、Lymphoprep 上に重層させ、比重遠心法で末梢血単核球 (PB-MNC) 分画を採取した。PBS で2回洗浄した後、チュルク液で10倍に希釈し、Burker-Turk 計算板を用いて検鏡下で細胞数を計測した。

### 末梢血単核球と MSC、骨芽細胞、HUVEC との共培養

非コート of the 6-well プレート上で confluent とした培養 MSC、培養骨芽細胞上に 1 × 10<sup>6</sup>/well の同種 PB-MNC を加え、RPMI-1640 medium (NIPRO, Osaka, Japan) に FBS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 10 %, penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 μg/mL を添加した培養液中で、Dynabeads CD3/CD28 T Cell Expander (4 × 10<sup>7</sup> beads/mL) (DynaBio, Oslo, Norway) 1 × 10<sup>6</sup> beads/well 存在下で72時間共培養した。最後の4時間、Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) (WAKO, Osaka, Japan) 2 μg/mL, Ionomycin (SIGMA, St. Louis, MO, USA) 2 μg/mL, Brefeldin A (WAKO) 10 μg/mL を添加してT細胞を刺激した。

Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) (Lonza Walkersville, Basel, Switzerland) を EGM-2 Bullet kit (Lonza Walkersville) の培養液で培

養, confluent とし, 同様に共培養を行った. また, 共培養以外に, 前記のように Dynabeads CD3/CD28 T Cell Expander, PMA, Ionomycin, Brefeldin A を加える条件で PB-MNC, 培養 MSC, 培養骨芽細胞, HUVEC それぞれを単独で培養し, 共培養後の PB-MNC, MSC, 骨芽細胞, HUVEC と比較した.

さらに, 細胞接着の有無による T 細胞に対する効果の差異を検討するために, TransWell chambers with 0.1 $\mu$ m pore size membrane (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) を用いて, feeder 細胞と PB-MNC との接着を阻害した条件で同様の共培養を行った.

共培養後は, feeder 細胞が剥離しないように浮遊細胞を回収した. Feeder 細胞は浮遊細胞回収後, 残存する PB-MNC を除去するために PBS で3回洗浄した.

#### 共培養後の浮遊細胞数計測

浮遊細胞は回収後に Dynal MPC-L (Dynal Biotech) を用いて Dynabeads CD3/CD28 T Cell Expander を除去し, PBS で1回洗浄した. 1 well から回収した細胞を PBS 1ml で再浮遊し, チュルク液で10倍に希釈し, Burkert-Turk 計算板を用いて検鏡下で細胞数を計測した. Feeder なしで培養したもの (Control) を含めて各培養条件での細胞数を算定し Control に対する比を計算した.

#### アルカリホスファターゼ (ALP) 染色

ALP 染色キット (武藤化学株式会社, Tokyo, Japan) を用いて, feeder 細胞の ALP 染色を行った. Confluent になった培養 MSC と培養骨芽細胞から培養液を除去し, 冷風乾燥した. 固定準備液 10mL + メタノール 90mL を加えて氷上で5秒間固定, 流水で30秒間水洗し, 冷風乾燥した. 基質原液 10mL に Fast Blue RR Salt を溶解させた液で細胞を覆い, 湿潤状態で 37 $^{\circ}$ C, 2時間静置し, 流水で30秒水洗, 1%サフラニン O で後染色2分行い, 流水で30秒水洗, 冷風乾燥した.

#### フローサイトメトリーによる細胞表面抗原, サイトカイン産生能の解析

##### (1) MSC の表面抗原解析

Confluent の培養 MSC を Trypsin/EDTA で処理し, PBS で洗浄, 再浮遊させた. FITC, PE 結合モノクローナル抗体 (anti mouse IgG2a, CD14, CD38, CD44, CD45-FITC, anti mouse IgG1, CD29, CD34, CD105, CD133-PE) (Becton Dickinson) を加えて 4 $^{\circ}$ C 暗所で15分間反応させて MSC 表面抗原を染色した. PBS で洗浄, 再浮遊させ, FACScan laser flow cytometry system (Becton Dickinson) で測定を行い, mouse IgG1, IgG2a を negative control として, それぞれの抗原について陽性率を測定した. 解析ソフトウェアとして CELLQuest (Becton Dickinson) を用いた.

##### (2) 共培養後 T 細胞のサイトカイン産生能の解析

共培養後, 回収した浮遊細胞に PE 結合 anti CD4, CD8 モノクローナル抗体 (Becton Dickinson) を加え, 4 $^{\circ}$ C 暗所で15分間反応させて T 細胞表面抗原を染色した. PBS で洗浄後のペレットに, Cytofix/Cytoperm solution (Becton Dickinson) 500 $\mu$ L を加えて 4 $^{\circ}$ C で20分間反応させ, 固定, 膜透過処理を行い, 1 $\times$  Perm/Wash (Becton Dickinson) で洗浄後, ペレットに FITC 結合 anti interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), anti interleukin-2 (IL-2) モノクローナル抗体 (Becton Dickinson) を加え, 4 $^{\circ}$ C 暗所で30分反応させ細胞内サイトカインを染色した. 1 $\times$  Perm/Wash で洗浄, 再浮遊させた後, FACScan laser flow cytometry system で測定, CELLQuest を用いて解析し, 各培養条件での T 細胞における細胞内サイトカイン陽性率を求めた.

#### 定量 RT-PCR による MSC, 骨芽細胞, HUVEC の遺伝子発現解析

共培養後の feeder 細胞における, T 細胞の増殖抑制に関わるとされる遺伝子の発現量を比較するため, mRNA 量を測定した.

PB-MNC との共培養後, MSC, 骨芽細胞を dish

表 1 定量 RT-PCR のプライマー

	Sense primer	Antisense primer
human GAPDH	gaaggtgaaggtcggagtc	gaagatggtgatgggatttc
human iNOS	gagattggagttcgagagttc	tggttagtgcttcagacttc
human IDO	gcctgcgggaagcttat	ttggctgctggcttgca
human LIF	accagaagatcctcaacccca	acgtggtacttgctgcacagg
human IL-10	ctacggcgctgtcatcgat	ggcattcttcacctg
human TGF- $\beta$	ctctccgacctgccacagat	taacctagatgggcgcgcatc

上で洗浄, 回収し, Trizol reagent kit (Invitrogen) を用いて total RNA を得た.  $5\mu\text{g}$  の total RNA を用いて, deoxyribonucleotide triphosphate (Invitrogen) 各  $0.125\text{ mM}$ , Random primer (Invitrogen)  $0.15\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , RNase inhibitor (Invitrogen)  $0.5\text{U}/\mu\text{L}$ , Reverse transcriptase (Invitrogen)  $10\text{U}/\mu\text{L}$  により,  $20\mu\text{L}$  の系で complementary DNA (cDNA) を作製した. cDNA を用いて, 定量 RT-PCR 法を用いて定量した. 表 1 に示したプライマーを用い, inducible nitric oxide synthase (iNOS), indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO), leukemia inhibitory factor (LIF), interleukin-10 (IL-10), transforming growth factor (TGF- $\beta$ ) について mRNA を定量した. 対照として Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた.

定量 RT-PCR は LightCycler (Roche, Indianapolis, IN, USA) を用い,  $95^\circ\text{C}$  5 秒,  $60^\circ\text{C}$  15 秒,  $72^\circ\text{C}$  13 秒を 1 サイクルとして 45 サイクル行った. PCR 産物の特異性はメルティングカーブにより確認した. RNA  $1\mu\text{g}$  あたりの各 RNA のコピー数を計算した.

### 統計解析

各群の測定値を mean  $\pm$  SD で表記し, 群間の差は Student の t 検定により比較し,  $p < 0.05$  をもって有意とした.

## 結 果

### 培養 MSC の表面抗原と, 骨芽細胞への分化の確認

BM-MNC を培養して得られた培養 MSC の表面抗原は CD29, CD44, CD105 陽性 CD34, CD45, CD133 陰性であり (図 1), 検鏡では紡錘形でアルカリホスファターゼ染色陰性の細胞で (図 2-a), 骨髓中の MSC の表面抗原, 形態として報告されているものと同様であった. また, CD14, CD45 陽性を示す細胞は認められず, 得られた付着細胞中への血液細胞の混入がないことを確認した (図 1).

培養して得られた MSC から分化誘導した培養骨芽細胞は, 扁平で突起を伸ばした形態をしており, アルカリホスファターゼ染色で強陽性を示し, 骨芽細胞への分化が確認された (図 2-b).

### 共培養による細胞数の変化 (活性化 T 細胞の増殖抑制)

共培養後の浮遊細胞数は, Control (feeder なしで PB-MNC のみ培養したもの) を 1 とすると培養 MSC, 培養骨芽細胞, HUVEC 存在下でそれぞれ  $0.20 \pm 0.18$ ,  $0.10 \pm 0.06$ ,  $1.35 \pm 0.71$  ( $n = 6$ ) であり, 培養 MSC, 培養骨芽細胞存在下で有意な浮遊細胞数の減少が認められた. HUVEC 存在下での細胞数と比較しても有意に細胞数が少なかった (MSC:  $p = 0.0037$ , 骨芽細胞:  $p = 0.0018$ ) (図 3-a). TransWell system で細胞接着を阻害し

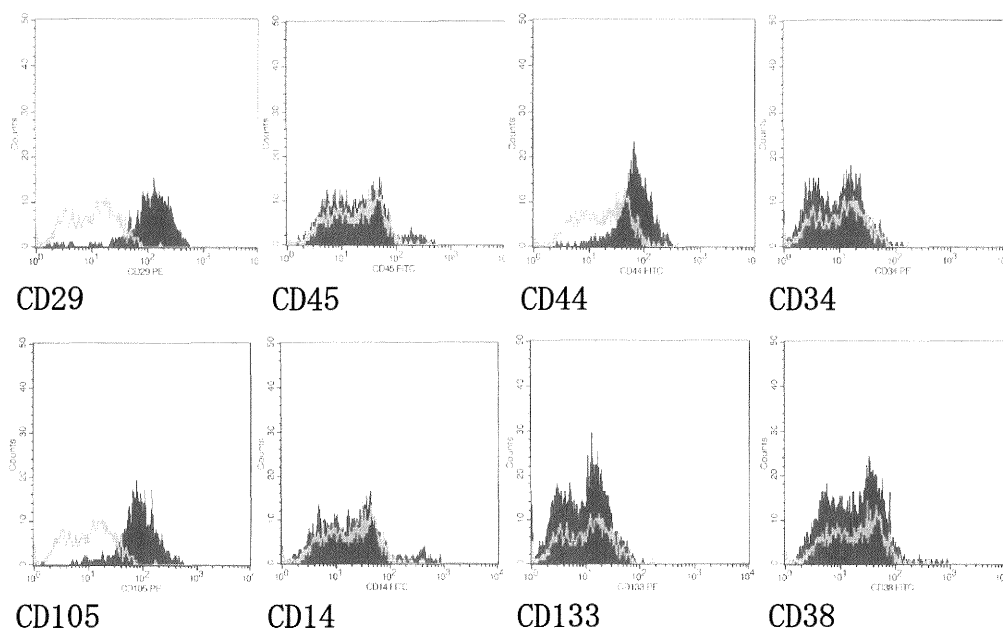


図1 培養MSCの表面抗原

培養MSCの表面抗原をフローサイトメトリーを用いて測定し、1パラメータヒストグラムで表示した。横軸に表記された各抗体のFITC, PE蛍光(Log scale), 縦軸に細胞数(Linear scale)をとり、Negative controlとしてmouse IgG2a (FITC) またはmouse IgG1 (PE)を重ねて表示した。

た場合(非接触条件)においても、Controlを1として培養MSC, 培養骨芽細胞, HUVEC存在下でそれぞれ $0.33 \pm 0.24$ ,  $0.26 \pm 0.11$ ,  $0.97 \pm 0.04$  ( $n = 3$ )と培養MSC, 培養骨芽細胞存在下での細胞数が有意に減少しており, HUVEC存在下と比較して有意な細胞数の減少を認めた。(MSC:  $p = 0.0375$ , 骨芽細胞:  $p = 0.0035$ )(図3-b)。また細胞接着の有無による差を比較すると, 培養骨芽細胞存在下では非接触条件で有意に細胞数が多く( $p = 0.0216$ ), 培養MSC, HUVEC存在下では有意差を認めなかった(MSC:  $p = 0.3725$ , HUVEC:  $p = 0.5029$ )(図3-a, b)。

#### 共培養によるT細胞のサイトカイン産生能の変化

共培養後のT細胞のサイトカイン産生能を比較するため, フローサイトメトリーでT細胞の細

胞内サイトカイン陽性率の解析を行った。その1例の結果を図4-a, bに示す。接触条件( $n = 6$ )ではCD8陽性T細胞における細胞内IFN- $\gamma$ 陽性率は, Control(feederなし,  $48.2 \pm 10.2\%$ )と比較して培養MSC存在下( $2.0 \pm 2.6\%$ ,  $p = 0.0001$ ), 培養骨芽細胞存在下( $2.6 \pm 2.6\%$ ,  $p = 0.0001$ )で有意に低下した。一方HUVEC存在下( $23.3 \pm 24.8\%$ ,  $p = 0.1221$ )では有意な低下を認めなかった(図4-c)。細胞内IL-2陽性率は, Control( $26.9 \pm 5.6\%$ )と比較して培養MSC存在下( $2.8 \pm 2.8\%$ ,  $p = 0.0002$ ), 培養骨芽細胞存在下( $5.6 \pm 3.0\%$ ,  $p = 0.0005$ )で有意に低下し, それに対しHUVEC存在下( $14.5 \pm 9.2\%$ ,  $p = 0.0770$ )では有意な低下を認めなかった(図4-d)。非接触条件( $n = 3$ )では, 細胞内IFN- $\gamma$ 陽性率は接触系と同様, Control( $28.9 \pm 4.1\%$ )と

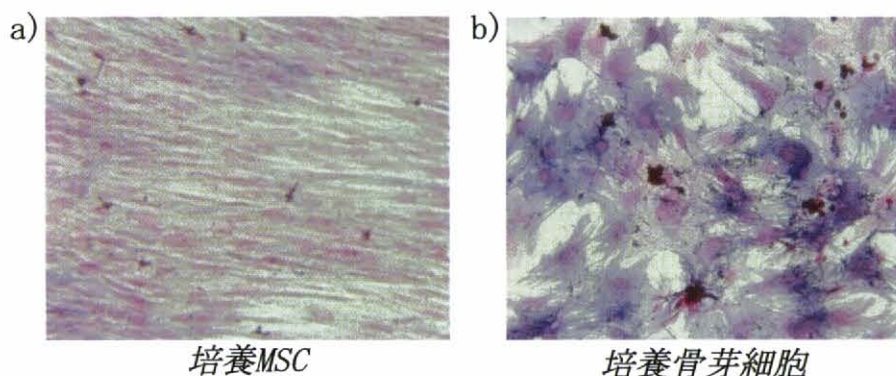


図2 培養 MSC, 培養骨芽細胞のアルカリホスファターゼ染色

Confluent となった培養 MSC (a), 培養骨芽細胞 (b) のアルカリホスファターゼ (ALP) 染色 (青紫色に染色) を, 光学顕微鏡写真 (10 × 100 倍) で示す。

比較して培養 MSC 存在下 ( $6.4 \pm 2.7 \%$ ,  $p = 0.0001$ ), 培養骨芽細胞存在下 ( $7.0 \pm 3.5 \%$ ,  $p = 0.0002$ ) で有意に低下し, HUVEC 存在下 ( $40.4 \pm 8.7 \%$ ,  $p = 0.0626$ ) では有意な低下を認めなかった (図 4-c)。しかし非接触条件で細胞内 IL-2 陽性率は, Control ( $14.5 \pm 4.6 \%$ ) に対して培養 MSC 存在下 ( $11.4 \pm 4.3 \%$ ,  $p = 0.3613$ ), 培養骨芽細胞存在下 ( $10.5 \pm 1.8 \%$ ,  $p = 0.1568$ ), HUVEC 存在下 ( $13.1 \pm 1.5 \%$ ,  $p = 0.6397$ ) とも有意な低下を認めなかった (図 4-d)。

CD4 陽性 T 細胞については, 共培養後に CD4 の発現が減弱したため, 評価が困難であった (data not shown)。

#### 共培養による MSC, 骨芽細胞の遺伝子発現パターンの変化

同種活性化 T 細胞を抑制している培養 MSC, 培養骨芽細胞の遺伝子発現を, 共培養前の培養 MSC, 培養骨芽細胞と比較するために, 共培養を行わない系 ( $n = 6$ ), 接触条件の共培養 ( $n = 6$ ), 非接触条件の共培養 ( $n = 3$ ) それぞれについて, 定量 RT-PCR で iNOS, IDO, LIF, IL-10, TGF- $\beta$  の mRNA 量を測定した。

iNOS は, 共培養を行わない系では培養 MSC,

培養骨芽細胞, HUVEC とも感度以下であったが, 共培養によって培養 MSC, 培養骨芽細胞では発現が誘導された。一方 HUVEC ではわずかに増加した。培養 MSC と培養骨芽細胞の間では発現量に有意差は認められなかった ( $p = 0.8418$ )。非接触条件では, 同様に培養 MSC, 培養骨芽細胞で発現の誘導を認めた。細胞接着の有無による MSC, 骨芽細胞の iNOS 発現量には有意差を認めなかったが, 非接触条件で発現量が少ない傾向があった (MSC:  $p = 0.0579$ , 骨芽細胞:  $p = 0.0982$ ) (図 5-a)。

IDO は, 共培養を行わない系では培養 MSC, 培養骨芽細胞, HUVEC とも感度以下であったが, 共培養によって培養 MSC, 培養骨芽細胞, HUVEC で発現が誘導された。非接触条件でも同様に培養 MSC, 培養骨芽細胞, HUVEC で発現の誘導を認めた。細胞接着の有無による発現量の有意差は, 培養 MSC, 培養骨芽細胞では認めなかったが (MSC:  $p = 0.5967$ , 骨芽細胞:  $p = 0.1038$ ), HUVEC では非接触条件で有意に発現量が多くなった ( $P = 0.0263$ ) (図 5-b)。

LIF は共培養を行わない系と比較して, 培養 MSC, 培養骨芽細胞, HUVEC とも共培養によって有意に発現量が増加した (MSC:  $p = 0.0070$ ,

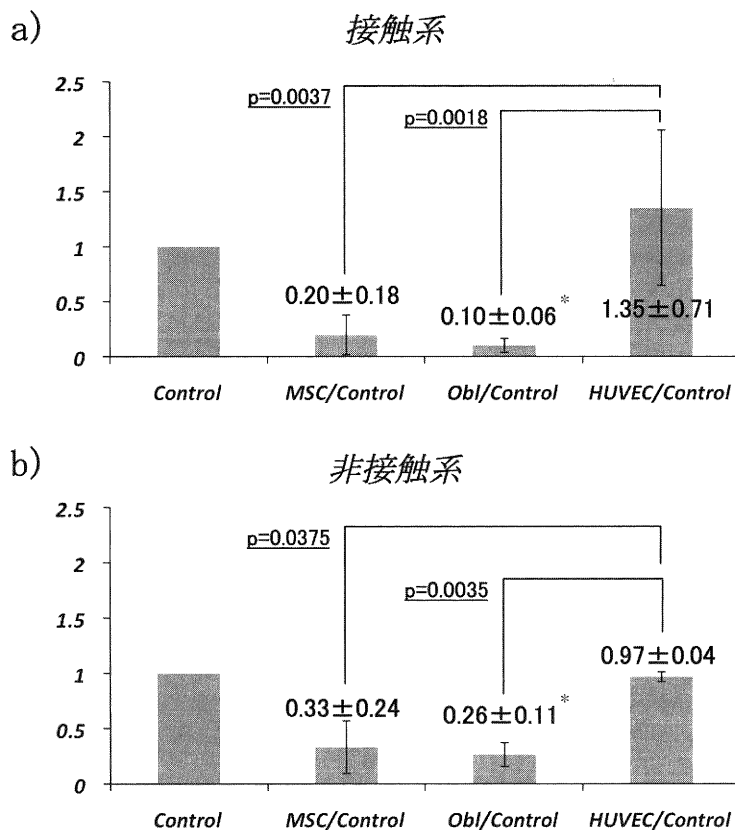


図3 共培養後の単核球数の比較

共培養後のPB-MNC数を計測し、Control (FeederなしでPB-MNCのみ培養したもの)の細胞数を1として比を算出し mean ± SD で表示した。Cell-contactを阻害しない系 (a)、TransWell systemによりCell-contactを阻害した系 (b)の双方において、培養MSC存在下、培養骨芽細胞存在下のPB-MNC数をそれぞれHUVEC存在下と比較し、t検定により算出したp値を表記した。

骨芽細胞存在下ではcell-contactのある条件よりもcell-contactを阻害した条件で有意にMNC数が多かった (p = 0.0216) (\*)。

MSC: Mesenchymal stem cell (間葉系幹細胞), Obl: Osteoblast (骨芽細胞), HUVEC: Human umbilical vein endothelial cell

骨芽細胞: p = 0.00003, HUVEC: p = 0.0023). 非接触条件でも培養MSC, 培養骨芽細胞, HUVECで有意な発現量の増加が認められた

(MSC: p = 0.0417, 骨芽細胞: p = 0.0028, HUVEC: p = 0.0255). 細胞接着の有無による発現量の有意差は、培養MSC, 培養骨芽細胞では認



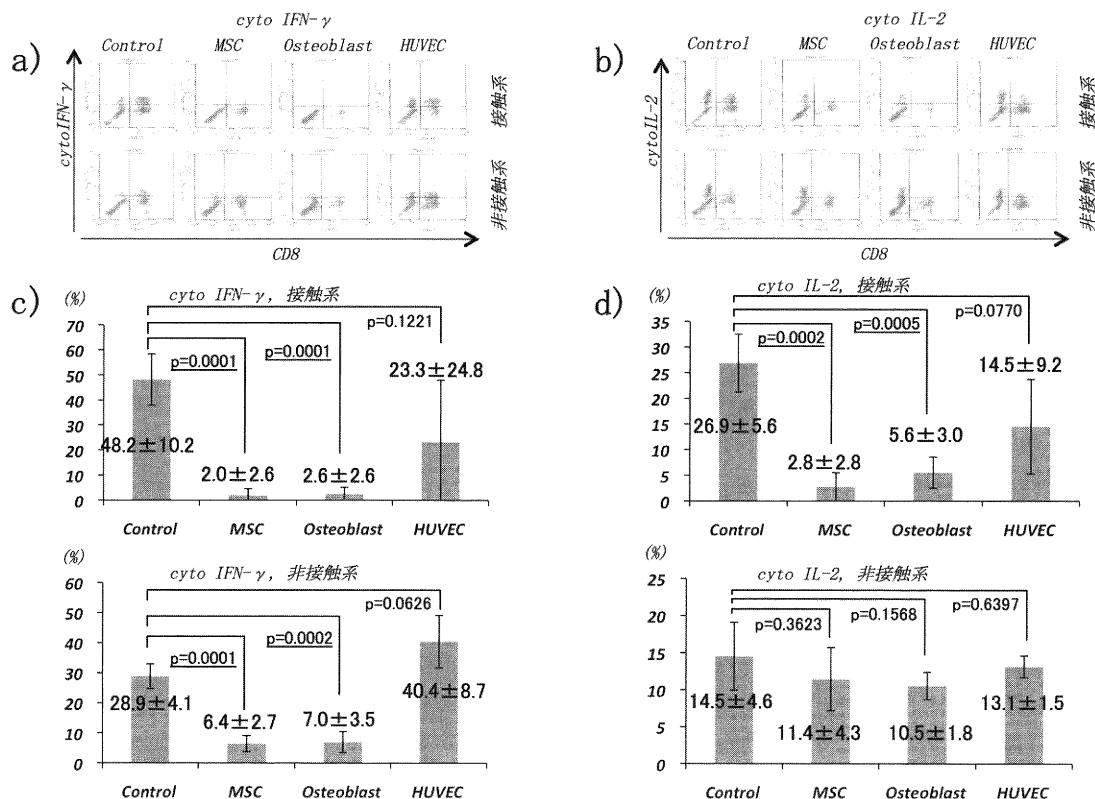


図4 共培養後 CD8 陽性 T 細胞のサイトカイン産生能

共培養後の PB-MNC のサイトカイン産生能をフローサイトメトリーで解析した。その 1 例の結果 (a, b) と、解析結果 (c, d) を示す。

(a, b) 縦軸：それぞれ cyto IFN- $\gamma$ , cyto IL-2, 横軸：CD8, 上段：cell-contact (+), 下段：cell-contact (-)。 (c, d) それぞれ cyto IFN- $\gamma$ , cyto IL-2 陽性率 (%) を mean  $\pm$  SD で表記した。上段：cell-contact (+), 下段：cell-contact (-)。培養 MSC, 培養骨芽細胞, HUVEC 存在下での陽性率を Control (Feeder 非存在下での陽性率) と比較し, t 検定により算出した p 値を表記した。

めなかったが (MSC:  $p = 0.2377$ , 骨芽細胞:  $p = 0.0731$ ), HUVEC では非接触条件で有意に発現量が少なかった ( $P = 0.0033$ ) (図 5-c)。

IL-10 は共培養を行わない系では, 培養 MSC, 培養骨芽細胞, HUVEC で感度以下であったが, 培養 MSC, 培養骨芽細胞, HUVEC とも共培養によって発現が誘導された。非接触条件では, 培養 MSC, 培養骨芽細胞, HUVEC とも発現の誘導は

認めなかった (図 5-d)。

TGF- $\beta$  は, 共培養を行わない系と比較すると, 培養 MSC, HUVEC では発現量に有意差を認めなかったが (MSC:  $p = 0.9394$ , HUVEC:  $p = 0.7843$ ), 培養骨芽細胞では共培養により有意に発現量が減少した ( $p = 0.0009$ )。非接触条件では, 培養 MSC, 培養骨芽細胞で有意な発現量の減少を認めた (MSC:  $p = 0.02955$ , 骨芽細胞:  $p =$

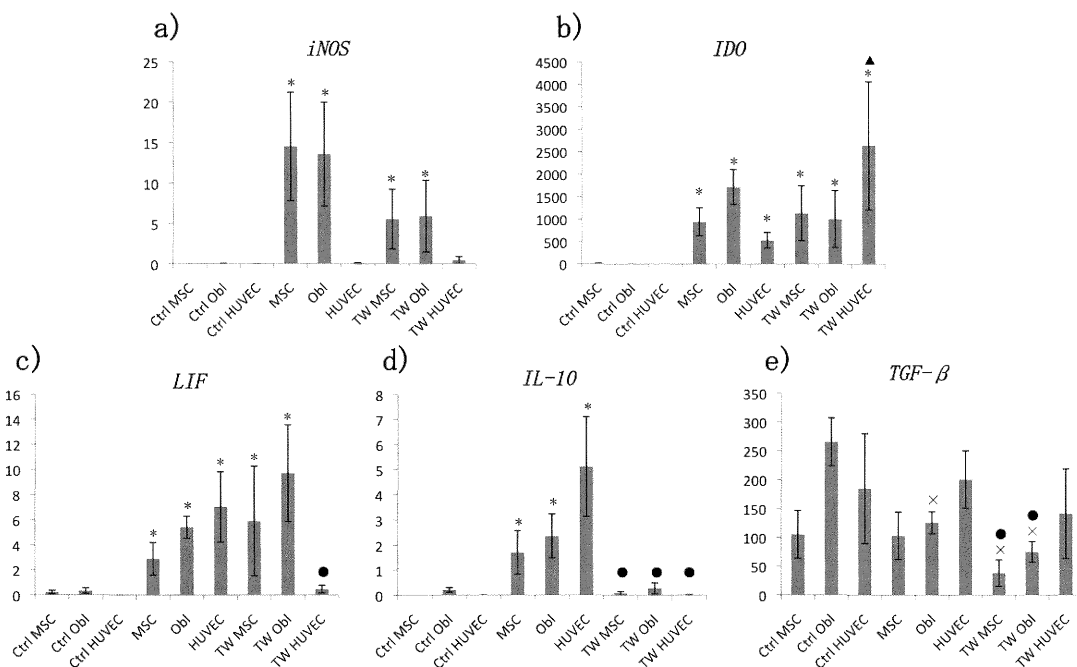


図5 共培養後の培養 MSC, 培養骨芽細胞の遺伝子発現解析

定量 RT-PCR による遺伝子発現量の解析結果を示す。iNOS (a), IDO (b), LIF (c), IL-10 (d), TGF-β (e) のそれぞれについて total RNA 1 μg あたりの mRNA コピー数 [× 10<sup>10</sup> copies/μg RNA] を mean ± SD を表示した。\* : Control (共培養を行わない系) と比較して有意に発現量が上昇 (p < 0.05), × : Control と比較して有意に発現量が低下 (p < 0.05), ▲ : Cell-contact (+) と比較して, Cell-contact (-) で有意に発現量が上昇 (p < 0.05), ● : Cell-contact (+) と比較して, Cell-contact (-) で有意に発現量が低下 (p < 0.05), Ctrl: Control (共培養しない系), TW: TransWell system (非接触系)。

0.0002)。HUVEC では有意差を認めなかった (p = 0.5032)。細胞接着の有無による比較では、培養 MSC, 培養骨芽細胞では有意に非接触条件で発現量が少なかった (MSC: p = 0.0330, 骨芽細胞: p = 0.0085)。HUVEC では有意差を認めなかった (p = 0.2473) (図 5-e)。

## 考 察

本研究によりヒト骨髓細胞から培養した MSC と、さらに in vitro で分化させた骨芽細胞が同種活性化 T 細胞に対して抑制作用を持つことが明

らかにされた。

MSC の培養には今回の研究で用いたように骨髓単核球から培養誘導する方法と、表面抗原をもとに cell sorter で分離したのち拡大培養する方法が報告されている<sup>23)</sup>。どちらも培養後の多分化能や表面抗原の発現に相違はないとされているが、免疫調節能など他の性質についてはその相違が十分に明らかになっていない。今回の培養法は非常に高い純度の MSC が効率よく得ることができ、臨床的に応用可能なスケールの培養に有利であると考えられる (図 1)。

本研究では培養 MSC の同種活性化 T 細胞に対

表2 共培養による Feeder 細胞の遺伝子発現の変化

	iNOS	IDO	LIF	IL-10	TGF- $\beta$
培養MSC	↑	↑	↑	↑	→
培養骨芽細胞	↑	↑	↑	↑	↓
HUVEC	→	↑	↑	↑	→

する作用として、増殖抑制能とサイトカイン産生能について検討した。Feeder 非存在下や HUVEC 存在下に比し有意な増殖抑制を認め、これまでの報告のように T 細胞の増殖抑制能は HLA 非拘束性であることが示された (図 3)。この結果はまた、MSC そのものは同種活性化 T 細胞に対して免疫原性を持たないことも示しているが、MSC を生体内に投与した場合は骨髓内に存在する抗原提示細胞により MSC に対する CTL の誘導は起こりうると考えられ、組織再生への応用など長期生着を目的とする場合は HLA を一致させた MSC を得る必要があると考えられる。MSC による T 細胞の IFN- $\gamma$  産生の抑制は、主に ELISA で検討した報告がされているが<sup>20)</sup>、今回の結果は CD8 陽性 T 細胞との接触を可能とした条件では IFN- $\gamma$  のみならず IL-2 についてもそのサイトカイン産生能が低下することを示した。非接触条件では IL-2 の抑制が認められなかったことは IFN- $\gamma$  と IL-2 産生を抑制するメカニズムが異なっている可能性を示唆する。また今回の検討では CD4 陽性 T 細胞についてはサイトカイン産生能を評価できなかったため、制御性 T 細胞に対する作用を検討することはできなかった。

MSC の T 細胞に対する抑制メカニズムについては TGF- $\beta$ <sup>24)</sup>、PGE2<sup>25)</sup>、LIF<sup>26)</sup> の関与や IFN- $\gamma$  を介した IDO の発現<sup>27)</sup>、さらに NO の関与などがこれまで報告されており<sup>20)</sup>、複数のメカニズムが存在するものと考えられる<sup>17)</sup>。本研究においてもこれまでの報告と同様に非接触系でも増殖抑制が認められ、増殖抑制に対しては液性因子の関与が強いと考えられた。一方、前述のよ

うに接触の有無によるサイトカイン産生能の抑制の相違は、T 細胞の機能調節には接着分子からのシグナルも関与していることを示唆する。今回、定量 RT-PCR を用いた遺伝子発現量の検討で、共培養後に iNOS、IDO、LIF、IL-10 の発現量が増加することを示した。特に iNOS、IDO は共培養後に誘導的に発現している (図 5)。今回の系では T 細胞以外の細胞が MSC に作用した可能性を除外できないが、少なくとも造血細胞との paracrine 機構が存在すると考えられる。IDO、LIF の発現が増強される HUVEC が T 細胞に対する免疫調節作用を示さないことから、iNOS が免疫抑制に最も重要な役割を果たしている可能性が考えられた (表 2)。

これまで、造血ニッチを構成する骨芽細胞の免疫調節作用は報告がなかったが、今回の結果は、ヒト骨髓由来培養骨芽細胞が同種活性化 T 細胞に対して MSC と同様に増殖抑制作用を示すことを明らかにした。今回用いた培養骨芽細胞の造血ニッチとしての機能は十分確認していないため、造血幹細胞ニッチとして機能する骨芽細胞への分化が完了していない分化段階の細胞である可能性は否定できないが、少なくとも MSC から骨芽細胞への分化過程の多くの段階で T 細胞に対する免疫抑制作用を保持していると考えられる。MSC から分化した脂肪細胞が同様に免疫抑制作用を持つという報告もあり、骨髓中の間質細胞の多くで同様の作用をもつ可能性もある<sup>28)</sup>。今回用いた骨芽細胞では非接触系での増殖抑制作用が接触系に比べ有意に低下していた。これは MSC では認められず、接着によるシグナルがより重要である

ことを示唆している。共培養後の遺伝子発現は MSC とほぼ同様の变化を示し、共培養後の iNOS, IDO, LIF, IL-10 の発現量が増加したが、TGF- $\beta$  の発現は MSC と異なり、接触系、非接触系とも減少した。このことは骨芽細胞に MSC と共有しない特異的なメカニズムが存在すること示唆する。

今後、他の骨髄間質細胞の免疫調節作用や、T 細胞以外の免疫担当細胞に対する作用を明らかにしていくことで、骨髄における免疫機構を明らかにし、骨髄間質細胞を用いた細胞療法の開発につなげたい。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたりご指導を賜りました 新潟大学大学院医歯学総合研究科の相澤義房教授、新潟大学医歯学総合病院 高密度無菌治療部の増子正義助教、古川達雄准教授に深謝いたします。

## 文 献

- 1) Akashi K, Traver D, Miyamoto T and Weissman IL: A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404: 193 - 197, 2000.
- 2) Adolfsson J, Månsson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, Bryder D, Yang L, Borge OJ, Thoren LA, Anderson K, Sitnicka E, Sasaki Y, Sigvardsson M and Jacobsen SE: Identification of Flt3+ lympho - myeloid stem cells lacking erythro megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* 121: 295 - 306, 2005.
- 3) Lu M, Kawamoto H, Katsube Y, Ikawa T and Katsura Y: The common myelolymphoid progenitor: a key intermediate stage in hemopoiesis generating T and B cells. *J immunol* 169: 3519 - 3525, 2002.
- 4) Iwasaki H, Mizuno S, Wells RA, Cantor AB, Watanabe S and Akashi K: GATA - 1 converts lymphoid and myelomonocytic progenitors into the megakaryocyte/erythrocyte lineages. *Immunity* 19: 451 - 462, 2003.
- 5) Xie H, Ye M, Feng R and Graf T: Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* 117: 663 - 676, 2004.
- 6) Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y and Li L: Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425: 836 - 841, 2003.
- 7) Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY and Suda T: Tie2/angiopoietin - 1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 118: 149 - 161, 2004.
- 8) Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP and Hedrick MH: Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell - based therapies. *Tissue Eng* 7: 211 - 228, 2001.
- 9) In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg - van der Keur C, de Groot - Swings GM, Claas FH, Fibbe WE and Kanhai HH: Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cell* 22: 1338 - 1345, 2004.
- 10) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S and Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143 - 147, 1999.
- 11) Prockop DJ: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276: 71 - 74, 1997.
- 12) Sanchez - Ramos J, Song S, Cardozo - Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR and Sanberg PR: Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 164: 247 - 256, 2000.
- 13) Li N, Feugier P, Serrurier B, Latger - Cannard V, Lesesve JF, Stoltz JF and Eljaafari A: Human mesenchymal stem cells improve ex vivo expansion of adult human CD34+ peripheral blood progenitor cells and decrease their allostimulatory capacity. *Exp Hematol* 35: 507 - 515, 2007.

- 14) Noort WA, Kruisselbrink AB, In't Anker PS, Kruger M, van Bezooijen RL, de Paus RA, Heemskerk MH, Löwik CW, Falkenburg JH, Willemze R and Fibbe WE: Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood - derived CD34 (+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* 30: 870 - 878, 2002.
- 15) Koç ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI and Lazarus HM: Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous - blood stem cells and culture - expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high - dose chemotherapy. *J Clin Oncol* 18: 307 - 316, 2000.
- 16) Lazarus HM, Koç ON, Devine SM, Curtin P, Maziarz RT, Holland HK, Shpall EJ, McCarthy P, Atkinson K, Cooper BW, Gerson SL, Laughlin MJ, Loberiza FR Jr, Moseley AB and Bacigalupo A: Cotransplantation of HLA - identical sibling culture - expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol.Blood Marrow Transplant* 11: 389 - 398, 2005.
- 17) Nauta AJ and Fibbe WE: Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 110: 3499 - 3506, 2007.
- 18) Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A and Hoffman R: Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 30: 42 - 48, 2002.
- 19) Di Nicola M, Carlo - Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S and Gianni AM: Human bone marrow stromal cells suppress T - lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99: 3838 - 3843, 2002.
- 20) Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, Muroi K and Ozawa K: Nitric oxide plays a critical role in suppression of T cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 109: 228 - 234, 2007.
- 21) Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M and Ringdén O: Treatment of severe acute graft - versus - host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 363: 1439 - 1441, 2004.
- 22) Ringdén O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lönner H, Marschall HU, Dlugosz A, Szakos A, Hassan Z, Omazic B, Aschan J, Barkholt L and Le Blanc K: Mesenchymal stem cells for treatment of therapy - resistant graft - versus - host disease. *Transplantation* 81: 1390 - 1397, 2006.
- 23) Sorrentino A, Ferracin M, Castelli G, Biffoni M, Tomaselli G, Baiocchi M, Fatica A, Negrini M, Peschle C and Valtieri M: Isolation and characterization of CD146+ multipotent mesenchymal stromal cells. *Exp Hematol* 36: 1035 - 1046, 2008.
- 24) Di Nicola M, Carlo - Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S and Gianni AM: Human bone marrow stromal cells suppress T - lymphocyte proliferation induced by cellular or non - specific mitogenic stimuli. *Blood* 99: 3838 - 3843, 2002.
- 25) Aggarwal S and Pittenger MF: Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105: 1815 - 1822, 2005.
- 26) Nasef A, Mazurier C, Bouchet S, François S, Chapel A, Thierry D, Gorin NC and Fouillard L: Leukemia inhibitory factor: Role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression. *Cell Immunol* 253: 16 - 22, 2008.
- 27) Meisel R, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubener W and Dilloo D: Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T - cell responses by indoleamine 2, 3 - dioxygenase - mediated tryptophan degradation. *Blood* 103: 4619 - 4621, 2004.
- 28) Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E and Ringdén O: HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 31: 890 - 896, 2003.

(平成 21 年 1 月 14 日受付)