

## 主論文の要旨

### **Factors secreted from dental pulp stem cells show multifaceted benefits for treating experimental rheumatoid arthritis**

〔 歯髄幹細胞が分泌する因子群は実験的  
リウマチ性関節炎に多面的な治療効果を示す 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
頭頸部・感覚器外科学講座 顎顔面外科学分野

(指導：日比 英晴 教授)

石川 純

## 【緒言】

リウマチ性関節炎(RA)の詳細な病因は不明であるが、マクロファージや破骨細胞などの単球系細胞が RA の炎症や骨吸収において中心的な役割を担っている。近年、活性化マクロファージが様々な難治性疾患の病因に関係していると報告されている。活性化マクロファージには炎症性 M1 と抗炎症性 M2 という 2 つの表現型が存在する。M1 は各種炎症性メディエーターの放出により、炎症を惹起し、破骨細胞分化を促進し、組織破壊をもたらす。一方で、M2 は抗炎症性サイトカインの放出によって炎症性 M1 に対抗する。一般的な創傷治癒では、M1 と M2 がそれぞれ炎症の惹起と消退に関わると報告されている。したがって、マクロファージの極性を調節することで、RA に対して治療効果が期待できる可能性がある。

幹細胞移植は RA に対する新たな治療戦略として注目されている。これまでに、骨髄、脂肪組織、臍帯、歯肉由来間葉系幹細胞の移植が、パラクライン効果により RA モデルマウスの病態を改善したと報告されている。しかしながら、間葉系幹細胞が分泌する因子群のみによる治療効果の検証はなされていない。

ヒト乳歯歯髄幹細胞(SHED)は優れた増殖能と多分化能を示す幹細胞である。SHED は神経堤由来の細胞と考えられ、間葉系幹細胞と神経幹細胞の両方のマーカーを発現する。心筋梗塞、全身性エリテマトーデス、虚血性脳傷害、脊椎損傷それぞれの動物モデルに対して、SHED を移植することで、パラクライン効果により著しい機能回復を認めたとの報告がある。我々はこれまでに、ラットの脊椎損傷モデルに対する SHED 由来無血清培養上清(SHED-CM)の治療効果を報告してきた。この効果のメカニズムは抗炎症性 M2 マクロファージの誘導が主体であった。しかしながら、RA に対する SHED-CM の治療効果の検証はなされていない。

今回、II型コラーゲン抗体誘導性関節炎モデルマウスに対して SHED-CM を投与し、その治療効果を検証した。

## 【材料と方法】

本学倫理委員会承認のもと本学附属病院で患者の同意を得て提供されたヒト乳歯より SHED を分離、培養した。対照群として、Lonza 社より購入したヒト骨髄間葉系幹細胞(BMSC)を使用した。各細胞を培養し、80%の細胞密度になったところで無血清培地(DMEM)に交換、さらに 48 時間培養した後に上清を回収した。上清を遠心し細胞残骸などを除去したものを CM として使用した。

8 週齢雄性 DBA/1J マウスに対して、Chondrex 社より購入した関節炎惹起用 II 型コラーゲン抗体を 1.5mg 腹腔内投与した。3 日目に LPS を腹腔内投与し関節炎を増悪させた。5 日目に SHED-CM、BMSC-CM、DMEM それぞれ 500 $\mu$ l を尾静脈より投与した。7 日目および 14 日目に屠殺し試料を採取した。7 日目には、免疫組織化学染色、Real time RT-PCR で炎症性、抗炎症性因子の発現を解析した。14 日目には、H-E 染色、Toluidine blue 染色、TRAP 染色および Real time RT-PCR で組織学的解析および破骨細胞の遺伝子発現を解析した(表 1)。また 0 日目から 14 日目まで、関節炎スコアを測定し、関節

炎の進行度を評価した(図 1A)。さらに、SHED-CM が含有する M2 の誘導因子である Siglec-9 を免疫沈降法により特異的に除去したもの(d-SHED-CM)を作製し、同様に解析した。

*In vitro* では、マウス大腿骨髄より採取した骨髄細胞を M-CSF でマクロファージへ分化誘導し、SHED-CM を作用させたときの M2 マクロファージへの誘導能を免疫組織化学染色および Real time RT-PCR で解析した。また、同様の骨髄細胞を M-CSF および RANKL で破骨細胞へ分化誘導し、SHED-CM を作用させたときの破骨細胞への分化の影響を、TRAP 染色および Pit Formation Assay で解析した。

各 CM が含有する Osteoprotegerin(OPG)および Siglec-9 の濃度を ELISA 法で測定した。

## 【結果】

関節炎モデルマウスに DMEM、BMSC-CM、SHED-CM を投与した結果、DMEM、BMSC-CM 群ではそれぞれ著しい四肢の腫脹を認めたが、SHED-CM 群ではほとんど腫脹は認められなかった(図 1B)。また、四肢の腫脹を定量的に評価した関節炎スコアの比較においても、SHED-CM 群ではスコアが有意に低下した(図 1C)。

14 日目の組織学的解析において、DMEM、BMSC-CM 群では足関節の滑膜の肥厚、炎症細胞浸潤、パンス形成、骨、軟骨の破壊などの著しい組織破壊を認めた。一方、SHED-CM 群では、滑膜の炎症、骨、軟骨の破壊が明らかに減少していた(図 2A)。また、組織破壊の程度を定量的に評価した結果も同様に、SHED-CM 群でスコアが有意に低下していた(図 2B)。

14 日目の破骨細胞に関する解析において、DMEM、BMSC-CM 群では足関節に多数の破骨細胞を認めたが、SHED-CM 群ではその数が有意に減少していた(図 3A、B)。また、Real time RT-PCR による遺伝子発現解析では、SHED-CM 群で破骨細胞関連遺伝子の発現が有意に低下していた。次に各 CM に含まれる、RANKL の decoy 受容体である OPG の濃度を ELISA 法で測定したところ、BMSC-CM に比較して、SHED-CM 群で有意に高かった(図 3D)。マウス大腿骨髄より骨髄細胞を採取し、M-CSF および RANKL で破骨細胞へ分化誘導し各 CM を作用させたところ、SHED-CM 群では、他の群と比較して有意に破骨細胞への分化が抑制され(図 3E、F)、さらに破骨細胞の骨吸収活性も有意に抑制された(図 3G、H)。

7 日目の遺伝子発現解析では、SHED-CM 群で炎症性サイトカイン、組織破壊因子の発現が有意に低下していた(図 4A)。一方、M2 マーカー(*CD206*、*Arginase1*、*Fizz1*)の発現は、SHED-CM 群で有意に上昇していた(図 4B)。

SHED-CM の治療効果が M2 誘導によるものかを調べるために、M2 誘導因子である Siglec-9 のみを特異的に除去した d-SHED-CM を作製し(図 5A)、同様に解析した。関節炎スコア、組織学的解析、遺伝子発現解析それぞれにおいて、d-SHED-CM 群では、SHED-CM と比較して治療効果が有意に低下していた(図 5B-D、図 6A、B)。

免疫組織化学染色では、DMEM、d-SHED-CM 群に比較して、BMSC-CM、SHED-CM 群で、*iNOS*<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>M1 の割合が有意に減少していた(図 7A)。一方、*CD206*<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>M2

の割合は SHED-CM 群のみで有意に増加していた(図 7B)。マウス大腿骨髄より骨髄細胞を採取し、M-CSF でマクロファージを分化誘導し各 CM を作用させたところ、免疫組織化学染色において、CD206<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>M2 の割合が SHED-CM 群で有意に増加していた(図 8A)。遺伝子発現解析では、SHED-CM 群でのみ M2 マーカーが有意に上昇していた(図 8B)。

### 【考察】

SHED-CM は、関節炎モデルマウスの関節炎症状の悪化を防ぎ、炎症性 M1 関連サイトカインの発現抑制および、抗炎症性 M2 関連遺伝子の上昇によって滑膜の炎症環境を抗炎症環境へ変換した。その結果として関節における破骨細胞分化を抑制し、骨破壊を防いだ。さらに *in vitro* の結果より、SHED-CM は直接的にも破骨細胞の分化を抑制したと考えられた。

サイトカインアレイ解析で、これまでに RA に対して治療効果があることが報告されている HGF、IL-22、IL-1Ra、RAGE、Furin、OPG などの因子が SHED-CM に多く含まれていることが確認された(表 2)。CM 中のこれら治療効果因子の濃度は低いが、複数の因子が協調的に作用して治療効果を発揮していると考えられた。

SHED-CM による関節炎の治療効果は抗炎症 M2 環境の誘導と相関していた。一方、M2 誘導能を欠いた BMSC-CM や d-SHED-CM では治療効果が低かった。これらの結果は、過去に報告された様々な疾患に対する SHED-CM の治療メカニズムと矛盾しない。本研究と合わせて、炎症性 M1 環境から抗炎症性 M2 環境へ変換することは RA を含めた様々な難治性疾患に対する有効な治療戦略になる可能性が示唆された。

破骨細胞分化の抑制は RA に対する有効な治療戦略である。本研究結果より SHED-CM は少なくとも 2 つのメカニズムで破骨細胞分化を抑制したと考えられた。1 つは SHED-CM が炎症環境にある関節局所の環境を抗炎症環境へ変換したことで、破骨細胞分化を促す RANKL の産生を間接的に抑制したことと考えられた。もう 1 つは、*in vitro* の結果から、SHED-CM に多量に含まれる OPG の作用によって直接的に破骨細胞の分化を抑制したことと考えられた。

### 【結論】

SHED-CM には複数の治療効果因子が含まれており、抗炎症性 M2 環境を誘導することで、炎症および破骨細胞分化を抑制した。さらに SHED-CM は OPG を多量に含むことで破骨細胞の分化を抑制した。したがって、SHED-CM 投与は RA に対して有効な治療戦略となりうることを示唆された。