

学位研究紹介

骨髄由来間葉系幹細胞培養上清に含まれる MCP-1 はマクロファージ極性転換により骨形成を促進する

MCP-1 from conditioned media of mesenchymal stem cells promote bone regeneration through macrophage phenotype switching

新潟大学大学院医歯学総合研究科 組織再建口腔外科学分野

橋爪 孝介

Division of Reconstructive Surgery for Oral and Maxillofacial Region, Faculty of Dentistry & Graduate School of Medical and Dental Science, Niigata University

Hashizume Kosuke

【背景および目的】

間葉系幹細胞 (MSCs) による骨再生では、細胞相互の接着による直接的な情報伝達に加えて、液性因子等のオートクライン作用やパラクライン作用による間接的なコミュニケーションが重要な役割を担うと知られている。われわれはこれまでに、骨髄間葉系幹細胞由来培養上清 (Mesenchymal Stem Cell Conditioned Media; MSC-CM) には様々な成長因子が含まれており、細胞遊走、血管新生、細胞分化の亢進により骨再生を促進していることを報告してきた^{1, 2)}。近年、MSC-CM による骨再生において、マクロファージ極性転換の誘導と炎症環境の構築が重要な役割を担うことが指摘されている。マクロファージは炎症を促進する M1 マクロファージと、炎症を抑制する M2 マクロファージの二つの極性に大別される。LPS, IFN- γ 等の刺激下では M1 マクロファージが優位となり IL-1, IL-12 等のサイトカインを分泌し炎症を促進させる。一方、単球遊走因子 (Monocyte Chemoattractant protein-1; MCP-1) などによる極性転換により M2 マクロファージが優位になるとマクロファージは IL-10, TGF- β 等のサイトカインを分泌し、抗炎症作用や組織再生作用を発揮するとされている³⁾。本研究では、MSC-CM に含まれるマクロファージ極性転換因子である MCP-1 が骨形成にどのように影響を及ぼすかを検討した。

【材料と方法】

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (Human Mesenchymal Stem Cells; hMSCs) を 10% ウシ胎児血清 + ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) にて 80% コンフルエントまで培養した後、無血清 DMEM に交換して 48 時間インキュベートした。培地を回収し、遠心分離処理、フィルター処理をした上清を MSC-CM とした。磁気ビーズに結合させた抗 MCP-1 抗体と MSC-CM をインキュベートした後、磁石で抗原抗体複合物を沈降させ、その上清を回収し depMSC-CM とした。8 週雄性 Wistar ラットの大腿骨より骨髄細胞を採取し、マクロファージコロニー刺激因子 (Macrophage Colony Stimulating Factor; M-CSF) 含有培地で 7 日間培養したものをラット骨髄由来マクロファージ (Bone Marrow Macrophages; BMMs) として実験に使用した。

BMMs を MSC-CM または depMSC-CM で 48 時間培養し、それぞれのマクロファージ極性に関連する遺伝子の発現を免疫細胞化学とポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) にて比較した。

hMSCs を MSC-CM または depMSC-CM で 48 時間培養し、それぞれの骨形成関連遺伝子の発現を qPCR 法によって比較した。

ラット頭蓋骨欠損モデルを用い、MSC-CM または depMSC-CM をアテロコラーゲンとともに移植し、それぞれの骨形成の過程を比較した。

【結 果】

ELISA 法にて、MSC-CM には MCP-1 が含まれていた一方、depMSC-CM では無血清 DMEM と同程度まで MCP-1 が除去されていた。

qPCR 法と免疫細胞化学において、MSC-CM は depMSC-CM と比較して BMMs における M2 マクロファージマーカーである CD206, アルギナーゼ 1 (Arg-1) の発現を亢進させる一方、M1 マクロファージマーカーである誘導性一酸化窒素合成酵素 (iNOS), CD80 の発現を抑制した。

また MSC-CM は hMSCs における骨形成関連遺伝子であるオステオポンチン, コラーゲン 1, アルカリフォスファターゼ, オステオカルシンの発現を亢進させた一方、depMSC-CM はコラーゲン 1 のみ発現を亢進させた。

MSC-CM 群は depMSC-CM 群と比較して有意に骨形

成が促進された (図 1)。組織学的・免疫組織化学的評価では, MSC-CM 群において移植後 72 時間から 2 週にかけて iNOS 陽性細胞が少なくなる一方, CD206 陽性細胞は移植後 72 時間で多く, 1 週, 2 週では有意差がなかった。抗炎症性/炎症性マクロファージの相対的な比率である M2/M1 比は, 移植後 72 時間から 2 週まで MSC-CM 群で大きかった (図 2)。

【考察および結論】

MSC-CM に含まれる MCP-1 の作用により単球が骨欠損部へ早期に遊走し, 移植後 72 時間以内に M2 マクロファージへの極性転換を促進することで, 早期に骨形成が促進されたことが示唆された。MCP-1 が間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化に影響を与える可能性が示唆された。われわれがこれまでに報告してきた MSC-CM による早期の骨形成において, マクロファージ極性転換因子である MCP-1 による抗炎症環境の構築が重要な役割を担うことが示唆された。

【参考文献】

- 1) Osugi M, Katagiri W, Yoshimi R, Inukai T, Hibi H, Ueda M: Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects. *Tissue Eng. Part A*, 18: 1479-1489, 2012.
- 2) Takeuchi R, Katagiri W, Endo S, Kobayashi T: Exosomes from conditioned media of bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote bone regeneration by enhancing angiogenesis. *PLOS ONE*, 14: e0225472, 2019.
- 3) Katagiri W, Takeuchi R, Saito N, Suda, D, Kobayashi T: Migration and phenotype

switching of macrophages at early-phase of bone-formation by secretomes from bone marrow derived mesenchymal stem cells using rat calvaria bone defect model. *J. Dent. Sci.*, 17: 421- 429, 2022.

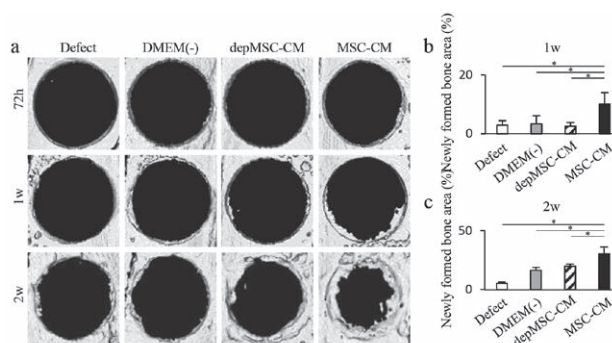


図 1

マイクロ CT 画像による経時的骨形成の評価
1 週, 2 週において MSC-CM 群で骨形成が認められた。
* P<0.05

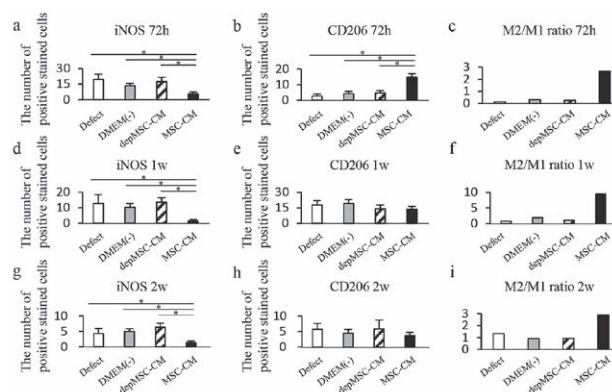


図 2

骨欠損部におけるマクロファージ極性の免疫組織化学的評価
MSC-CM は移植後 72 時間において M2 マクロファージへの極性転換を促進し, 2 週間後まで高い M2/M1 比を維持した。
* P<0.05