

## 軟骨細胞の同種 T 細胞におよぼす影響

研究分担者 加藤 玲子 国立医薬品食品衛生研究所・医療機器部・主任研究官  
研究協力者 岡田 恵里 東海大学医学部外科学系整形外科学・特定研究員

研究要旨：本研究では同種積層化軟骨細胞シートの臨床応用を目指し、同種軟骨細胞の免疫細胞に対する反応性について検討してきている。昨年度、同種ソースとして想定している多指症軟骨組織由来細胞 (PDCCs)が、T細胞の免疫応答を惹起しないだけでなく、活性化 T 細胞の増殖を抑制することを示した。今年度は *in vitro* の接触培養条件下において、PDCCs による活性化 T 細胞の増殖抑制効果への PGE2 および TGF- $\beta$ 1 の影響を検討した。その結果、接触培養条件下では PDCCs が有する T 細胞増殖抑制効果には、PGE2 や TGF- $\beta$ 1 といった液性因子よりも細胞間接触による抑制効果が強いことが示唆された。また、NHACs と共培養された MLR 中の CD4<sup>+</sup>T 細胞がどのようなサブセットになっているか検討したところ、IL-2 および TNF- $\alpha$  といった Th1 細胞タイプサイトカインは、軟骨細胞と共培養することで有意に減少しており、IL-4 や IL-17 といった Th2 細胞、Th17 細胞タイプのサイトカイン量はほとんど産生されていなかった。一方、Treg 細胞が産生する IL-10 は有意に発現量が増えていた。再現性の確認が必要であるが、軟骨細胞と共培養することで、免疫寛容に關与する Treg 細胞が優位になっていることが示唆された。

### A. 研究目的

関節軟骨再生修復を目指し、自己積層化軟骨細胞シートを用いた臨床研究が、既に本研究代表者の東海大学佐藤正人教授らによって進められてきており、その関節軟骨修復再生の有効性が示されてきているが、この技術を用いた再生治療の将来的な普及には同種細胞移植が必須になると考えられる。これまでの経験上、軟骨組織は免疫応答が低いと言われている。しかし実際に宿主内で、同種軟骨細胞が、特に免疫反応においてどのような挙動を示すかの詳細な報告がなかったことから、我々はこれまでに同種軟骨細胞の T 細胞におよぼす影響について検討してきている。

現在のところ同種細胞のソースとして、多指症患者の手術時廃棄組織由来軟骨細胞を想定している。多指症由来軟骨細胞 (PDCCs)は増殖能が高く、短期間に多くの

積層化シートを作製することが可能であり、魅力的な細胞ソースになると考えられる。しかしながら、同種細胞移植の際、拒絶反応が起こることが懸念される。昨年度は、*in vitro*においてPDCCsが同種T細胞におよぼす影響を検討し、PDCCsは免疫原性が低だけでなく、活性化T細胞の増殖抑制効果を有することを明らかにし、同種積層化軟骨細胞シート移植の際の細胞ソースとしてPDCCsを利用出来る可能性を示した。また、軟骨細胞による免疫調節効果のメカニズムの解明をめざして、軟骨細胞で高発現しているTGF- $\beta$ 1に着目し、PDCCsによるT細胞増殖抑制効果への影響を検討したところ、接触培養条件下では、中和抗体でTGF- $\beta$ 1の生理活性を減弱させても、抑制効果に影響がないことを示した。そこで今年度は、積層化軟骨細胞で高い発現がみられているPEG2のPDCCsによるT細胞増殖抑

制に対する影響を検討した。さらに、軟骨細胞が CD4<sup>+</sup>T 細胞の分化にどのような影響を与えるかを、各 T 細胞サブセットに特徴的なサイトカイン量を測定し検討したので報告する。

## B. 研究方法

### 1. 細胞

多指症軟骨組織由来細胞 (PDCCs)は、国立成育医療研究センター研究所臨床研究審査委員会の承認を得て、患者同意のもと、国立成育医療研究センターで多指症手術時に得られた 3 例の軟骨組織から単離された細胞を使用した。(以下、PDCC1, PDCC2, PDCC3 と記す。) 正常ヒト関節軟骨細胞-膝(NHAC-kn 以下 NHACs)、ヒト抹消血由来 CD4<sup>+</sup>T 細胞 (CD4<sup>+</sup>TCs)および正常ヒト樹状細胞(NHDCs)は Lonza Walkersville, Inc. (以下 Lonza 社) より購入した。

### 2. 各種細胞の培養

全ての培養は 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 下で行った。PDCCs は DMEM/F12 supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS; GIBCO 社) and 1% antibiotics-antimycotic (GIBCO 社)、4 日目以降はさらに 50µg/ml ascorbic acid (Wakojunyakukougyou 社) を加えたもので培養した。実験に使用する際は、血清濃度を 10 %に減らした培地に交換した。

NHACs は、Chondrocyte Basal Medium (CBM)に Supplements and Growth Factors を加えた培地 (CGM) で培養した。

NHDCs は LGM-3™ (Lonza 社) にインターロイキン-4 (IL-4)と顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)をそれぞれ最終濃度 50 ng/ml になるように添加した培地に懸濁し、温度応答性培養皿である UpCell®に播種して 1~3 日培養した後、室温で 30 分以上放置して UpCell®から剥がし、必要数播種した。

CD4<sup>+</sup>TCs は反応当日に細胞融解後、LGM-3™ に再懸濁して、必要数播種した。

### 3. 混合リンパ球培養反応 (MLR)

96 ウェルに NHDCs (3 x 10<sup>4</sup> cells) と CD4<sup>+</sup>TCs (2 x 10<sup>5</sup> cells)を播種し共培養した。

### 4. MLR と軟骨細胞の共培養

PDCCs (2 x 10<sup>4</sup> cells)もしくは NHACs (2 x 10<sup>4</sup> cells)が予め播種された各ウェルに、先述した条件の MLR を共培養した。

### 5. Cox2 インヒビターによる PGE2 産生抑制および TGF-β 中和抗体による上清中の TGF-β1 の生理活性抑制

培養開始日の上清に最終濃度 1 µM NS398 (Sigma 社) の Cox2 インヒビターを添加した。PEG2 と TGF-β1 の同時抑制の場合は、最終濃度 1 µM NS398 と最終濃度 5 µg/ml anti-TGF-β (Clone No. 1D11; R&D System 社) を併せて添加した。

### 6. 細胞増殖測定

細胞増殖 ELISA, 5-Bromo-2-

deoxyuridine 化学発光キット（Roche 社）を用いて測定した。培養 3~5 日目に各ウェルに BrdU を加え 6~8 時間培養した後、リンパ球の DNA 合成中の BrdU 取り込み量を測定し、細胞増殖を評価した。各反応系での細胞増殖は同一条件を 3 ウェル行い、統計的有意差を Student's T 検定もしくは Welch's T 検定により確認した。

#### 7. IL-2, IL-4, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL17 の測定

培養上清中の各サイトカインの量は BD™ Cytometric Bead Array (BD Biosciences 社)を用いて測定した。同一条件の培養上清を 3 つ測定し、統計的有意差を Student's T 検定もしくは Welch's T 検定により確認した。

#### 8. TGF- $\beta$ 1 の測定

培養上清中の TGF- $\beta$ 1 の量は Quantikine<sup>®</sup> ELISA Human TGF- $\beta$ 1 (R&D System 社)を用いて測定した。同一条件を 3 ウェル測定し、統計的有意差を Student's T 検定により確認した。

#### 9. 倫理面への配慮

研究に用いた PDCCs は、国立成育医療研究センター研究所臨床研究審査委員会および東海大学医学部臨床研究審査委員会の承認を得ている。また、NHACs、CD4<sup>+</sup>TCs および NHDCs は LONZA 社より購入していることから、倫理面の問題はないと考えられる。

#### C. 結果

##### 1. 接触培養条件における PDCCs の T 細胞増殖抑制効果に与える PGE2 の影響についての検討

積層化軟骨細胞では PGE2 の発現が高いことから、PDCCs の T 細胞増殖抑制効果への PGE2 の関与を検討するため、MLR と PDCCs の共培養系に PGE2 産生に関わるシクロオキシゲナーゼ-2 (Cox2) の阻害剤である NS398 を添加し、PGE2 の産生を抑えた。NS398 の添加有り、無しの間で T 細胞増殖活性を比較したところ、有意な差は見られなかった。(図 1)

##### 2. 接触培養条件における PDCCs の T 細胞増殖抑制効果に与える PGE2 および TGF- $\beta$ 1 の影響についての検討

昨年度、接触培養条件下においては TGF- $\beta$ 1 を単独で抑制しても、PDCCs が有する T 細胞増殖抑制効果への影響がないことを報告した。また今回 PGE2 を単独抑制しても、同条件下では PDCCs が有する T 細胞増殖抑制効果を減弱されることがないことが分かったことから、両者活性を同時に抑えた場合の影響について検討した。その結果、それぞれ単独抑制の場合と同様に、PDCCs が有する T 細胞増殖抑制効果への影響がみられなかった。(図 2)

##### 3. 軟骨細胞が CD4<sup>+</sup>TCs のサブセットに与える影響についての検討

今回は NHACs による MLR 中の CD4<sup>+</sup>TCs のサブセットへの影響を検討し

た。図 3-1 に示す条件で培養した培養上清中の各サイトカインの量を測定した。

### 3-1. Th1 細胞：IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 量の測定

IL-2 および TNF- $\alpha$  は CD4<sup>+</sup>TCs や NHACs のみの培養上清中では、検出限界以下だった。MLR では IL-2 が約 2050 pg/ml、TNF- $\alpha$  が約 380 pg/ml であるのに対して、NHACs と共培養した上清中では IL-2 が約 1645 pg/ml、TNF- $\alpha$  が約 44 pg/ml と有意に低くなっていた。一方、IFN- $\gamma$  は逆に MLR で約 392 pg/ml であるのに対して、共培養系では約 766 pg/ml と有意に高くなっていた。（図 3-2）

### 3-2. Th2 細胞：IL-4 量の測定

MLR と NHACs の共培養系で約 5.7 pg/ml であったが、それ以外は検出限界(4.9 pg/ml)以下であり測定できなかった。（図 3-3）

### 3-3. Th17 細胞：IL-17 量の測定

IL-17 は、いずれも検出限界(18.9 pg/ml)以下であり測定できなかった。

### 3-4. Treg 細胞：IL-10 および TGF- $\beta$ 1 量の測定

IL-10 は MLR で約 11 pg/ml であるのに対して、NHACs と共培養した上清中では約 45 pg/ml と有意に高くなっていた。一方、TGF- $\beta$ 1 は CD4<sup>+</sup>TCs や MLR の上清中では共に約 100 pg/ml であるのに対して、NHACs と MLR の共培養中では約 340 pg/ml と高発現が見られたが、NHACs 単独と比較して（約 320 pg/ml）有意差がなかった。（図 3-4）

## D. 考察

本研究は、同種細胞を用いた積層化軟骨細胞シートの臨床応用を目指し、同種軟骨細胞が免疫系に与える影響を *in vitro* で検討している。我々は昨年度までに、マウス軟骨細胞、成人関節軟骨細胞とその積層化シート、および現在同種細胞のソースとして想定している多指症軟骨組織由来細胞 (PDCCs) が同種リンパ球の活性化を惹起しないだけでなく、活性化リンパ球の細胞増殖も抑制することを明らかにしている。さらに昨年度においては、成人関節軟骨細胞を用いた先行実験から、T 細胞増殖抑制効果には、1：液性因子と、2：細胞間接触の両方が関与していることを示唆する結果を得ていた（厚生労働科学研究費補助金 再生医療実用化事業 H23 年度：細胞シートによる関節治療を目指した臨床研究 および H24 年度：関節治療を加速する細胞シートによる再生医療の実現の報告書の加藤分担の項参照）ことから、接触培養条件下における PDCCs の T 細胞増殖抑制効果に与える TGF- $\beta$ 1 の影響について検討したところ、培養上清中の TGF- $\beta$ 1 の生物活性をベースレベルまで減少させても PDCCs の T 細胞増殖抑制効果を減弱させることがないことを明らかにした。そこで今年度、積層化軟骨細胞で高発現しており、T 細胞増殖に抑制的に働くことが知られている PGE2 の産生抑制および TGF- $\beta$ 1 の生理活性と PGE2 量を同時に減少させることで、PDCCs の T 細胞増殖抑制効果に与える影響を検討した。その結果、PGE2 を単独で

減少させても、TGF- $\beta$ 1 の生理活性と同時に減少させても、T 細胞増殖抑制効果を減弱させることがなかった。(図 1, 2) このことから、接触培養条件下においては細胞間接触による抑制効果が強いことが示唆された。

さらに今年度は NHACs が CD4<sup>+</sup>TCs のサブセットにどのような影響を与えているか検討した。従来 CD4<sup>+</sup>TCs は、産生するサイトカインの種類によって、Th1 細胞 (IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) と Th2 細胞 (IL-4, IL-5) に大別されていたが、近年、新たなサブセットとして Th17 細胞 (IL-17, IL-21, IL-22) や制御 T (Treg) 細胞 (IL-10, TGF- $\beta$ ) が分類された。Th1 細胞、Th2 細胞および Th17 細胞が免疫応答を促進するのに対して、Treg 細胞は免疫応答の抑制に働くことが知られている。これらのうちどのサブセットになるかは CD4<sup>+</sup>TCs が受ける刺激によって決められる。一方、NHACs は TGF- $\beta$ 1 を発現しているが、TGF- $\beta$ 1 は Th17 細胞や Treg 細胞の分化に関わるサイトカインであることから、NHACs との共培養によって MLR 中の CD4<sup>+</sup>TCs が Th17 細胞もしくは Treg 細胞に分化している可能性が高いと考えられた。そこで共培養中の CD4<sup>+</sup>TCs が実際にどのサブセットに分化しているか検討するため、MLR の培養上清と MLR と NHACs の共培養の培養上清中の IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  (Th1 細胞)、IL4 (Th2 細胞)、IL-17 (Th17 細胞)、IL-10 および TGF- $\beta$ 1 (Treg 細胞) を測定し比較した。その結果、共培養上清中で Th1 細胞タイプの

サイトカインでは、IL-2 および TNF- $\alpha$  は有意に減少していたが、IFN- $\gamma$  は有意に増加していた。この結果より Th1 細胞に分化していないことを否定できないが、免疫調節能を有すると報告のある間葉系幹細胞でも、今回の結果同様に IL-2 は減少させるが IFN- $\gamma$  は増加させたとの報告もある。今後、Th1 細胞に特異的な転写因子である T-bet の発現を確認する等の検討の余地がある。Th2 細胞タイプの IL-4 は解析系の検出限界が 4.9 pg/ml であるのに対して、共培養系で 5.7 pg/ml 測定された以外は検出できなかった。さらに Th17 細胞タイプの IL-17 も検出限界以下で測定できなかった。これらの結果より、Th2 細胞および Th17 細胞への分化はほとんどないと考えられる。Treg 細胞タイプサイトカインでは IL-10 は共培養系で有意に増加していた。一方、TGF- $\beta$ 1 は NHACs も発現していることから、Treg 細胞由来と区別できないが、共培養系が NHACs 単独培養中の TGF- $\beta$ 1 量より若干高い傾向がみられたが、有意な差はなかった。今後、フローサイトメトリーを用いた解析により、T 細胞だけに着目して、各サブセットに特異的な細胞表面抗原や細胞内タンパク質を検出することで、NHACs によって影響を受けた CD4<sup>+</sup>TCs のプロファイルを明らかにする必要があるが、今回の培養条件下では、TGF- $\beta$ 1 の刺激により IL-10 を産生する Treg 細胞が優位になっている可能性が高いと考えられる。

#### E. 結語

接触培養条件下において、PDCCs の活性化 T 細胞増殖抑制効果には、PGE2 や TGF- $\beta$ 1 といった液性因子よりも細胞間接触による抑制効果が強いことが示唆された。

活性化条件下にある CD4<sup>+</sup>TCs は軟骨細胞と共培養することで、免疫寛容に關与する Treg 細胞が優位になっている可能性が高い。

#### F. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

#### G. 研究発表

##### 1.学会発表

1) Miyajima-Tabata A, Kawakami T, Komoriya K, Kato R, Niimi S, Isama K. Effects of metal oxide nanomaterials on cytotoxicity and immune response in THP-1 cells. The 54th Annual Meeting of the Society of Toxicology (San Diego, 2015.3)

2) 加藤玲子, 齋島由二, 福井千恵, 比留間瞳, 澤田留美, 宮島敦子, 新見伸吾. 「ヒト単球系細胞の蛋白質発現挙動に基づく医用材料の血液適合性評価マーカの探索」. 第 36 回日本バイオマテリアル学会(東京,2014.11)

3) 宮島敦子, 小森谷薫, 田中賢, 加藤玲子, 新見伸吾. 「血液適合性評価における HEMA/MEA ランダム共重合体材料に対する蛋白質マーカーの挙動について」. 第 36 回日本バイオマテリアル学会(東京,

2014.11)

4) 加藤玲子, 佐藤正人, 岡田恵里, 阿久津英憲, 小久保舞美, 河毛知子, 宮島敦子, 梅澤明弘, 持田譲治, 新見伸吾. 「多指症組織由来細胞の免疫制御能の解析」. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2014.10)

5) Miyajima-Tabata A, Kato R, Komoriya K, Niimi S. Cellular response of THP-1 cells cultured on the polymer biomaterials. Eurotox 2014 (Edinburgh, 2014.9)

6) 宮島敦子, 河上強志, 小森谷薫, 加藤玲子, 新見伸吾, 伊佐間和郎. 「酸化金属ナノマテリアルに対する THP-1 細胞の細胞応答」. 第 41 回日本毒性学会 (神戸, 2014.7)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

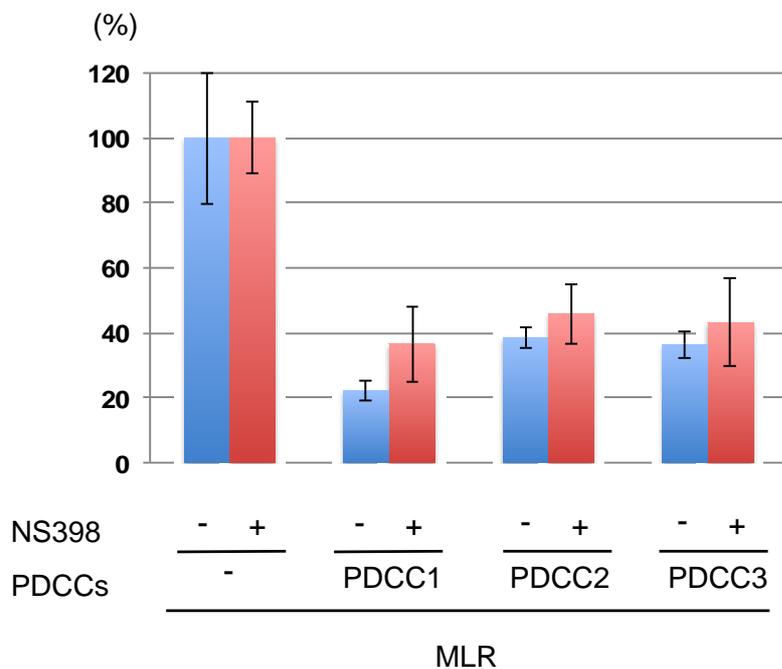


図1:接触培養条件における PDCCs の抑制効果への PGE2 の関与

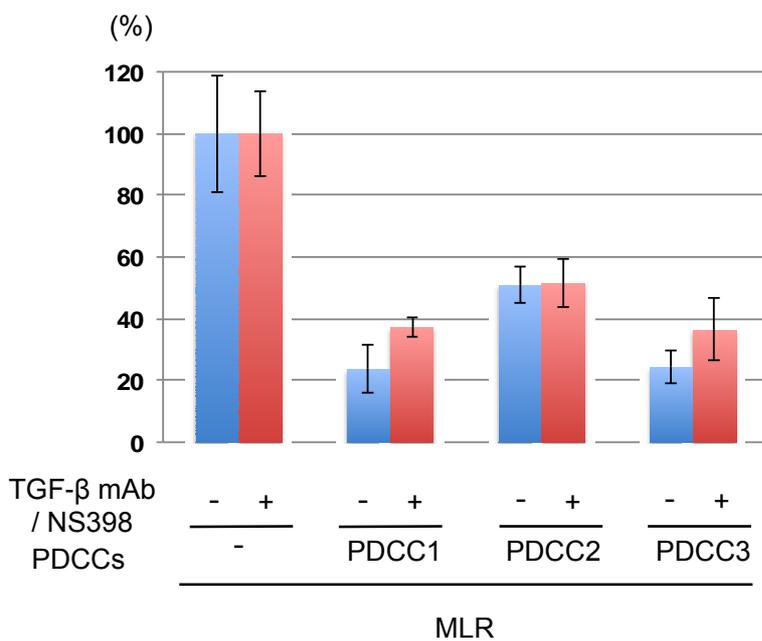


図2:接触培養条件における PDCCs の抑制効果への TGF-β1 および PGE2 の関与

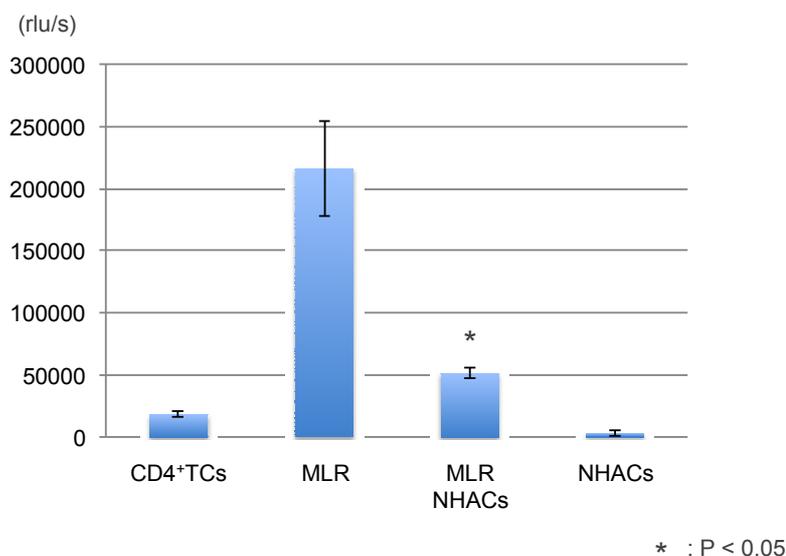


図3-1 : NHACs による MLR 中の CD4<sup>+</sup>TCs の増殖抑制  
 (以下、この培養条件の培養上清中の各サイトカイン量を測定)

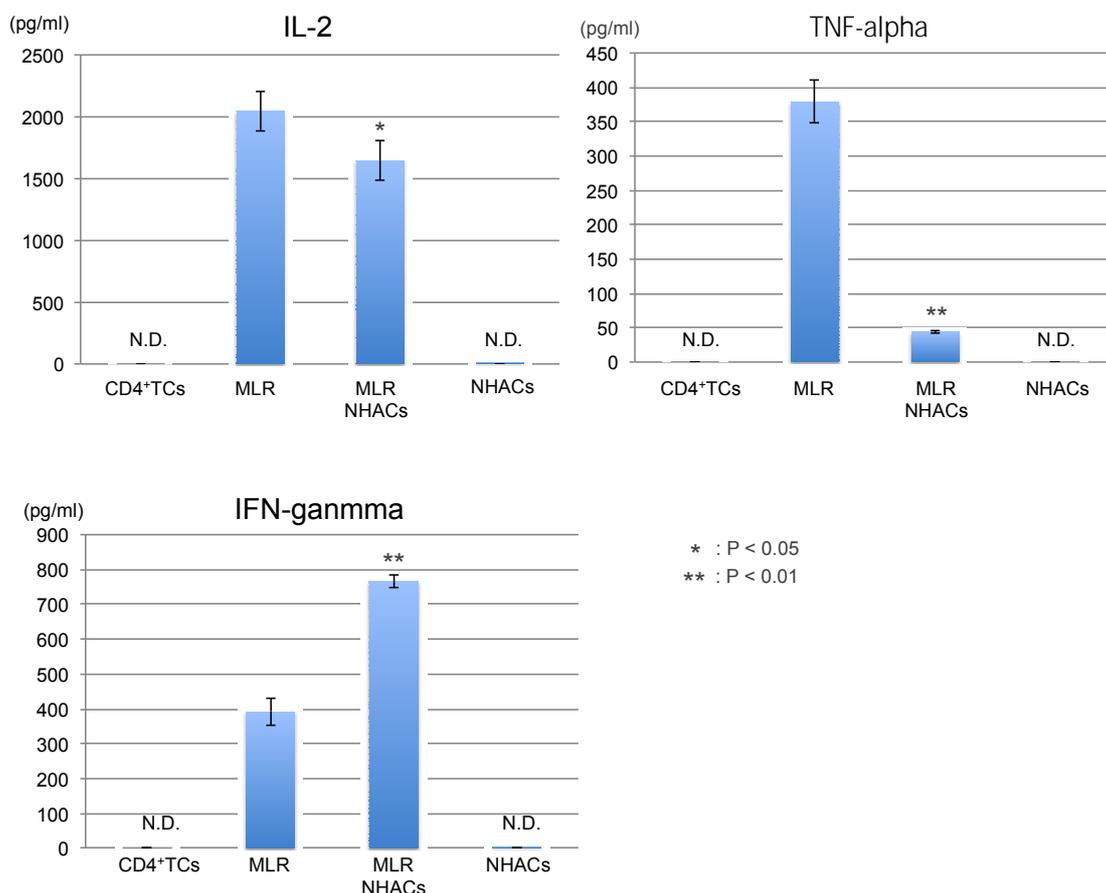


図3-2 : Th1 サイトカインの測定

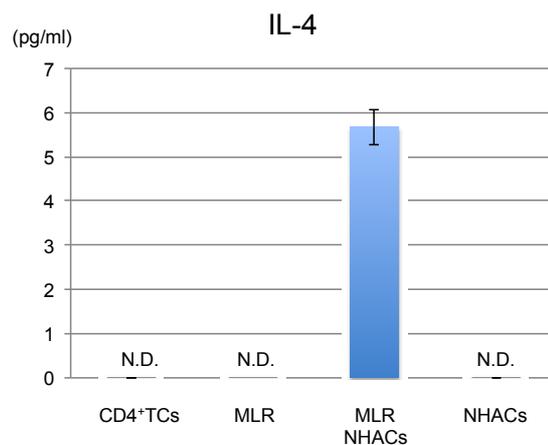


図3-3: Th2 サイトカインの測定

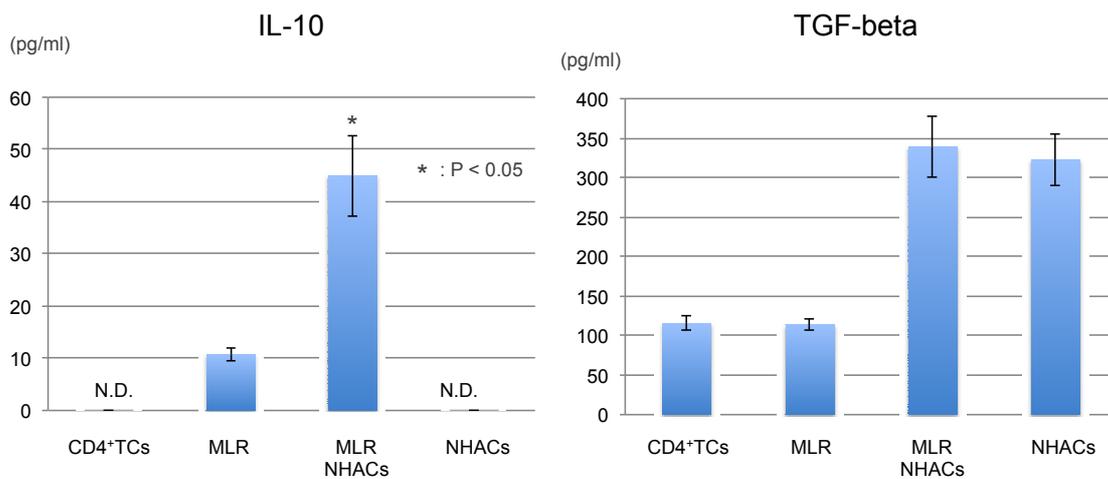


図3-4: Treg サイトカインの測定