

論文の内容の要旨

静水圧負荷下 3 次元培養による脱分化関節軟骨 細胞の再分化促進効果

指導教官 中村 耕三 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 川西 誠

背景: 荷重部関節軟骨は、関節にかかる外圧を分散・吸収するクッションの役割と、摩擦係数を低減させ滑動性を良好にする歩行生活に重要な役割を果たしている。関節軟骨は細胞とその周囲に存在する細胞外マトリックス（主に Type II コラーゲンと軟骨型プロテオグリカン（アグレカン））によって構成されている。関節の硝子軟骨はその無血管・無リンパ管・無神経野という特異な環境と栄養は関節液の拡散のみによって行われており一旦損傷を受けると自然修復は望めないとされている。また細胞そのものも高度に分化した細胞で、ほとんど分裂・増殖せず、その修復能力は極端に低い。何らかの原因によって生じた関節軟骨損傷部は経時的に周囲や相対する関節軟骨をも変性に陥れ、最終的には変形性関節症（以下 OA）へと進行し、疼痛・可動域制限などの関節機能の低下を引き起こし日常生活に支障を来す。

現在日本は急速に高齢化が進んでおり、高齢者における荷重関節の機能低下は深刻かつ重要な問題である。関節軟骨損傷を引き起こす代表的な疾患である関節リウマチ（以下 RA）は全人口の約 1%、OA は日本だけで年間 90 万人も発症するとされている。これらの疾患により完全に機能を失った関節機能の再獲得には、現在のところステンレス・チタン・セラミックスなどの金属による人工関節置換術しか存在しない。しかし人工関節は生体内組織ではないため、長期間の使用による緩みや感染、イオンの溶出から人工関節の寿命が長くて 1

5年程度といった問題や生体適合性の問題、それに付随して高齢者には想像を絶する手術による再置換といった問題などが常につきまとう。また人工物であるがゆえに個体の成長には対応できず、若年者には適応が限られる。よって関節症を招来する前に何らかの処置が必要であり、これらの損傷部が限られた範囲であるうちに生物学的修復により治療されることが理想である。

そこで期待されるのが軟骨再生医療である。現在の再生軟骨治療の中心は自家関節軟骨細胞培養移植である。しかし、この方法には骨膜使用による骨化の問題や、患者から採取できる軟骨細胞には限りがあるために、増殖の過程が必要になり細胞は脱分化するが、移植によりこの脱分化した細胞が体内で再分化するのかといった問題が残されている。この増殖させることによる脱分化の問題解決なくして臨床現場での発展性は無いと考える。

研究の目的：軟骨細胞は単層培養し増殖させると関節軟骨特有の細胞外マトリックスである Type II コラーゲンやアグレカンの mRNA の発現が低下し、間葉系細胞に脱分化するといわれている。そこで、静水圧の仮説「関節の動きや荷重によって関節軟骨内に生じる静水圧は、軟骨細胞の分化維持や分化誘導を促進する」を立てた。脱分化した軟骨細胞で、その仮説の検証をするために、今まで存在しなかった圧負荷時も培地のガス交換可能で長期負荷の可能な静水圧負荷培養装置を構築することと、脱分化した関節軟骨細胞より作製した3次元培養体 (pellet) に対する間欠的な生理的な静水圧負荷を行いその再分化促進効果について検証することを目的とした。

静水圧負荷培養装置の構築：従来報告されている静水圧負荷培養装置では圧を負荷する時に系が閉鎖系になり、理論的にガス交換可能なシステムは、我々の研究室にいた水野らが報告した培地を循環させるシステムしか存在せず、長期に負荷培養可能な装置が無かった。しかし培地を循環させるシステムでは系の細菌汚染の危険を完全には排除できずにいた。そこで培養液を循環水から隔離するためにガス透過性が確認されバクテリア・ウイルス・フリーである血小板自己血輸血用のポリオレフィン製のカワスミ分離バッグを加工して細胞を封入し耐圧カラム内 RO 水に沈めることにより、培地と循環水系を分離し、循環水系でガス交換可能とするシステムを構築した。また実際にガス交換されているかどうかの検証は血液ガス測定器で、循環 RO 水とバッグ内培地の pCO_2 , pO_2 を実際に測定し判定した。

方 法：仔牛膝関節軟骨細胞は2系代目より Type II コラーゲン・アグレカンの mRNA 発現が減少し Type I コラーゲン mRNA が増加し3継代目では Type I コ

ラーゲン mRNA の発現はピークとなり、Type II コラーゲン mRNA の発現はほぼ失われる。この脱分化した仔牛膝関節軟骨細胞を用いて関節軟骨 3 次元培養体 (pellet) を作製し、上記静水圧負荷培養装置で生理的範囲内と考えられる間欠的静水圧 (5 MPa, 0.5 Hz) を一日 4 時間、計 4 日間負荷した。評価は pellet 軟骨細胞の Type I コラーゲン・Type II コラーゲン・アグレカン mRNA の発現を RT-PCR 法により半定量解析し、同時に組織染色を行った。

結 果: ガス圧測定ではバッグ内 pCO₂ は実験開始時で平均約 4.3 % その後圧負荷開始後 24 時間で 5 % となり平衡に達し、4 日後まで持続した。一方 pO₂ は開始時平均 21 % で 24 時間後に 18.5 % となり平衡に達し、4 日後まで持続した。どちらもバッグで良好にガス交換されていることが分かった。

3 継代目の仔牛膝関節軟骨細胞の Aggrecan と Type II コラーゲンのバンドはほぼ認められず、Type I コラーゲンのバンドがはっきりとしていた。この脱分化した軟骨細胞を用いて pellet を作製し、間欠的静水圧を負荷した pellet は Aggrecan と Type II コラーゲンのバンドが負荷していない pellet よりもはっきりと出現していた。半定量解析はそれぞれ NIHImage を使用して、GAPDH で補正を行い、Microsoft Excel の統計解析用マクロプログラムの unpaired Student's t-test を用いて危険率 1 % 未満を有意差有りとした。

Aggrecan mRNA の発現は圧負荷を行った群で有意に上昇しており、負荷していない群の約 5 倍 (m ± SEM (n=4), P<0.01) を示した。Type I コラーゲン mRNA 発現は圧負荷を行った群も、行っていない群も有意差は認められなかった。Type II コラーゲン mRNA の発現は圧負荷を行った群で有意に上昇しており、負荷していない群の約 4 倍 (m ± SEM (n=4), P<0.01) を示した。以上より半定量ではあるが、3 継代目で脱分化傾向に向かっていた仔牛膝関節軟骨細胞は pellet にすることで Type I コラーゲン mRNA の発現は減少した。さらに生理的な間欠的静水圧を負荷することにより、軟骨細胞に特異的な Aggrecan と Type II コラーゲン mRNA の発現は静水圧を負荷しない群よりもそれぞれ約 5 倍、4 倍と増加し再分化の傾向がみられた。

組織染色では H-E 染色を比較観察してみると、組織形成は間欠的静水圧を負荷した pellet も負荷していない pellet も壊死も無く組織形成は良好であった。アルシアンブルー染色の比較では静水圧を負荷していない pellet も染色性を認めたが、静水圧を負荷した pellet の染色性はさらに良好であった。サフラニン O 染色による比較では静水圧を負荷していない pellet もわずかに染色性を認めたが、静水圧を負荷した pellet は明らかに染色性が良好であった。以上より mRNA の発現だけでなく、間欠的静水圧を負荷した pellet では静水圧を負荷しない pellet よりも胞外マトリックスが良好に産生されていることが伺えた。

考察・今後の展望：以上より今回用いた軟骨細胞3次元体（pellet）に対する間欠的静水圧負荷は、我々の研究室の古川らによる大量浮遊培養法で、増殖させた軟骨細胞より大量の軟骨マイクロエレメントを得ることに成功していることと組み合わせることで、自家軟骨細胞移植への道がさらに前進するのではないかと期待している。今後この装置を利用して関節軟骨細胞に対する静水圧長期負荷の影響の検証や、より生体軟骨に近い3次元関節軟骨培養体の構築の検証が可能であると考えている。そして、生理的範囲内の間欠的静水圧負荷が軟骨基質産生のみを促進し軟骨細胞の肥大化・骨化を促進しないことが証明できれば、担体にも液性因子にも頼らずに生体外で自家軟骨細胞3次元体の構築が可能になり臨床応用できるかもしれないと考えている。

結論：1) 静水圧長期負荷培養システムを構築した。

培養液を循環水から隔離するためにガス透過性が確認され、バクテリア・ウイルス・フリーである血小板自己血輸血用のポリオレフィン製のカワスミ分離バッグを加工して、細胞を封入しカラム内RO水に沈めることにより、培地と循環水系を分離し、循環水系でガス交換可能とした。このシステムで培地内のガスは良好にコントロールされ、細菌汚染のリスクも無く、静水圧負荷下の長期培養が可能であることが分かった。

2) 間欠的な生理的な静水圧負荷によって脱分化した仔牛膝関節軟骨細胞より作製した軟骨3次元培養体（pellet）に対して再分化促進効果を検討した。

mRNA 発現、組織染色の結果より、単層培養から3次元体（pellet）にすることで、Type I コラーゲン mRNA の発現は抑制され脱分化傾向が弱まり、関節軟骨細胞に対する生理的範囲内と思われる間欠的静水圧負荷は、さらに Aggrecan、Type II コラーゲン mRNA の発現を促進し、組織染色でも基質産生の良好な染色性を示し、再分化促進効果があることが分かった。