

論文の内容の要旨

論文題目 静水圧を用いた ES 細胞の分化に関する研究

氏名 保呂 聰

高齢化社会に突入している現在においては慢性関節リウマチや変形関節症などの関節軟骨についての疾患が深刻な問題となっている。従来は、これら関節疾患では人工関節置換術が行われてきたが、長期間の使用によって骨と人工関節との間にゆるみが発生するため定期的に再手術する必要がある、特に高齢者の負担となっていた。そのため、人工関節置換術に代わり、自家細胞を用いた軟骨再生医療が注目を浴びてきており、実際に臨床応用もされているが、採取できる軟骨細胞に限界があること、採取と移植の二段階手術が必要であるといった欠点が指摘されている。それらの欠点を解決するため、ES 細胞などの幹細胞から軟骨細胞を作製し、それを移植するといった再生医療が求められており、幹細胞から軟骨細胞への分化研究が求められている。一方で、全ての細胞に分化することが可能な ES 細胞についての研究は、主に化学的刺激を用いることによって多数行われているが、それらの研究では臨床での安全性が不透明な外来因子を用いている。そのため、化学的刺激に比べ、より安全な物理的刺激による ES 細胞の分化制御法が研究され始めているが、これまでに ES 細胞は高いせん断応力により動脈内皮細胞に、低いせん断応力により静脈内皮細胞に、また、引張刺激により平滑筋細胞に分化誘導されることが報告されており、実際の生体内で受ける物理的刺激と ES 細胞の分化は関連付けられると考えられている。そこで、生体内で軟骨細胞へ負荷されている静水圧刺激に注目し、ES 細胞への静水圧負荷システム、およびその前後の培養系を構築して、静水圧負荷が ES 細胞の分化に与える効果を検証した。また、静水圧を最も効果的に負荷する方法や条件を検討するためには、静水圧の負荷によって発せられるシグナルを計測することが重要となってくる。そこで、静水圧負荷下での ES 細胞およびそのシグナルのリアルタイム観測系を構築し、典型的なシグナル応答である Ca^{2+} の挙動を検証した。

静水圧を用いた ES 細胞の分化誘導実験

マウス由来 ES 細胞株 CCE を 3 日間浮遊培養し Embryoid body (EB) を作製し、20 MPa の静水圧を 60 分間負荷した。その後、あらかじめゼラチンでコーティングしたプレートに播種し、7 日間静置培養した後に細胞を回収して細胞染色及びリアルタイム RT-PCR に供した。

その結果、アルシアンブルー染色および、サフラニン O 染色において静水圧を負荷した ES 細胞がそれぞれ濃青色、濃赤色に染色された。一方でアルカリフォスファターゼ染色、オイルレッド O 染色においては差が見られなかった(Fig. 1)。また、リアルタイム RT-PCR の結果については、Collagen type II mRNA の発現は、静水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 ($P<0.01$) を示した。また、Sox9 mRNA の発現においても有意差こそ示されなかったものの ($P\approx 0.05$)、約 40 倍と大幅に上昇する傾向が示された。一方で、Collagen type I や Runx2 の mRNA においても発現がそれぞれ約 5 倍 ($P<0.001$)、13 倍 ($P<0.05$) 有意に上昇していた。Oct4 については有意差こそ示されなかったものの ($P\approx 0.06$)、静水圧負荷によって減少する傾向が示された(Fig. 2)。

プロテオグリカンの産生がアルシアンブルー染色およびサフラニン O 染色で確認されたこと、Collagen type II、Collagen type I、Sox9、および Runx2 の発現がコントロール系に比べて増加していること、さらに Oct4 の発現が減少していることから、静水圧刺激はマウス ES 細胞の骨・軟骨系への分化を促進することが示唆された。一方で、骨分化マーカーであるアルカリフォスファターゼの産生は、染色においてコントロール系と差が見られなかった。これらのことから静水圧刺激は ES 細胞を軟骨細胞、骨芽細胞いずれの細胞へも分化誘導する可能性があり選択性は高くないが、軟骨細胞への分化を比較的強く誘導することが示された。今回の結果は、静水圧によって幹細胞を軟骨細胞へ分化させることが可能であることを示しており、幹細胞から再生軟骨組織を創製するための基盤技術としての静水圧負荷技術の可能性を示した。

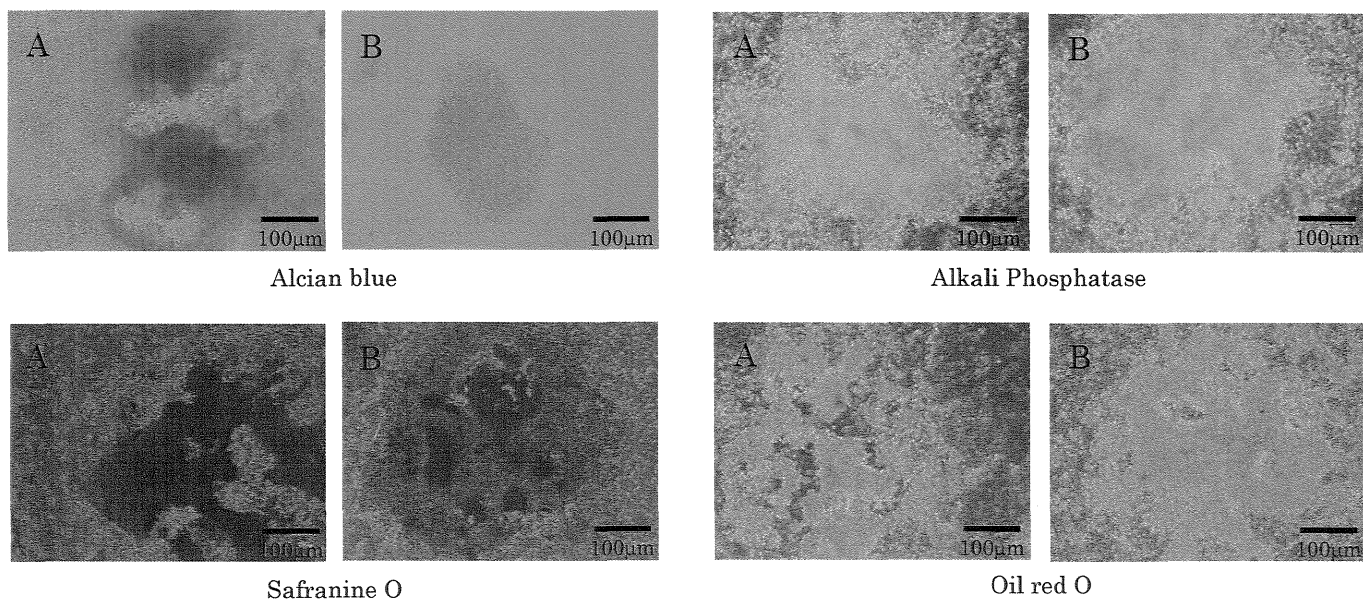


Fig. 1 Stained ES cells: hydrostatic pressured ES cells (A) and controls (B)

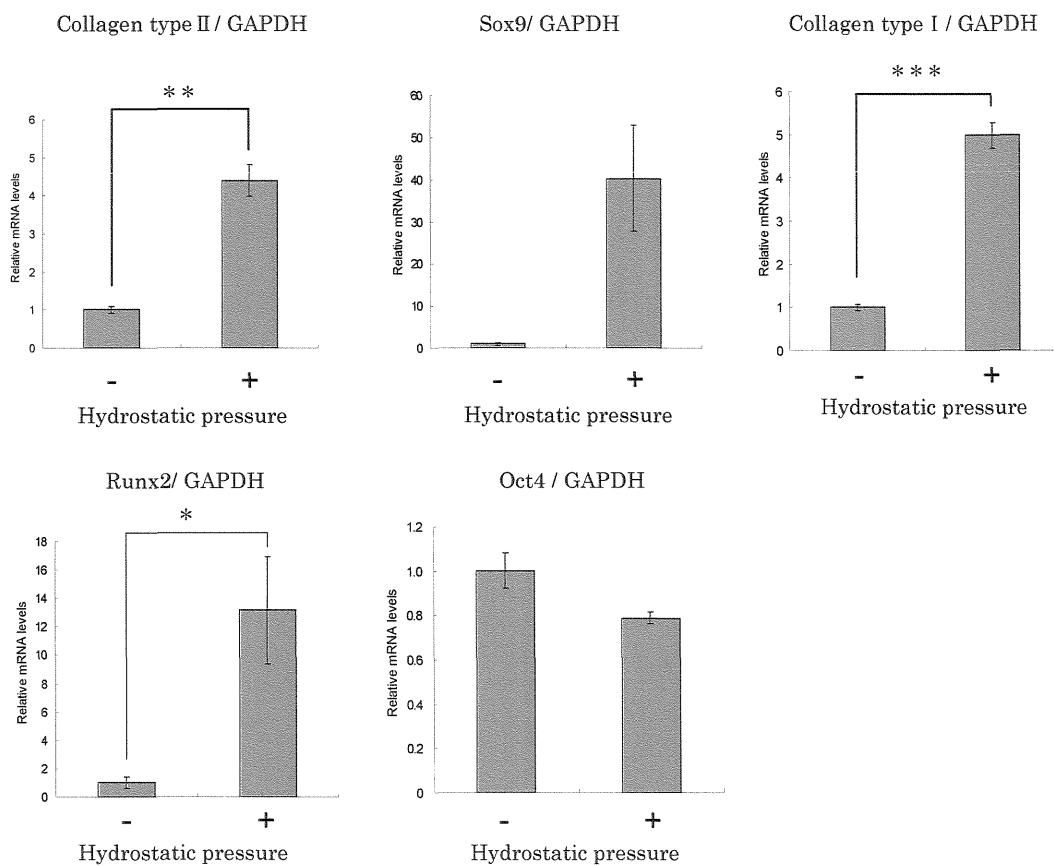


Fig. 2 Relative mRNA expressions of hydrostatic pressured ES cells.

*: P < 0.05 ** : P < 0.01 ***: P < 0.001 Mean ± S.E.M. (n = 4)

コラーゲングル包埋組織の作製

幹細胞を用いた再生医療の実現には、これまでに検討したような幹細胞から目的の細胞へと分化させる技術と共に、細胞の構造を移植後一定の期間保持するための足場へと細胞を呼び込む技術も必要である。また、足場はあくまでも細胞の生体組織の再生誘導を助けるための仮の構造物であるので、炎症・異物反応を起こさずに残存するか、あるいは生体吸収されることが要求される。そこで異物反応を起こさず、実際に軟骨や皮膚、気管などの再生誘導において臨床研究が進められているコラーゲングルを足場として、上述の方法で静水圧を負荷したマウス ES 細胞をさらに 21 日間培養し、そのコラーゲングルへの接着性および分化の有無を評価した。

その結果、組織切片の HE 染色の結果から、コラーゲングルの内部でも細胞が壊死することなく接着、増殖していることが示された。また、マウス ES 細胞に静水圧を負荷した後、コラーゲングルで包埋し再度培養した場合でも軟骨分化が促進されることがトルイジンブルー染色によって明らかになった(Fig. 3)。これらのことから、静水圧を用いて ES 細胞から軟骨細胞を誘導し、臨床に用いる際にはコラーゲングル包埋による移植法が有効である可能性が示された。

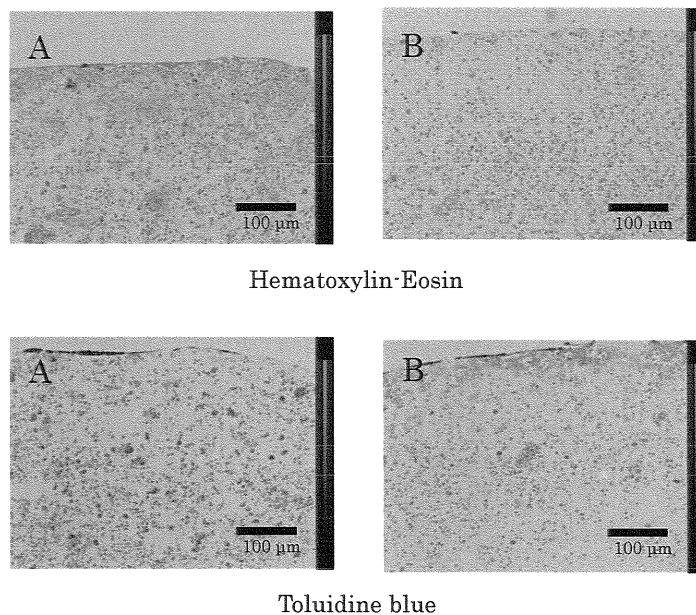


Fig. 3 Stained ES cells in collagen gel: hydrostatic pressured ES cells (A) and controls (B)

静水圧を用いた iPS 細胞の分化誘導実験

ES 細胞には、免疫拒絶の問題や倫理的問題があるが、iPS 細胞の出現によりそれらは乗り越えられようとしている。そこで、マウス iPS 細胞株 iPS-MEF-Ng-20D-17 に前述と同様の方法で静水圧を負荷し、リアルタイム RT-PCR を用いてその分化を評価した。

その結果、静水圧刺激により、Sox9 の mRNA の発現が約 1.4 倍上昇し、また、Collagen type II の mRNA の発現は、有意差は示されなかったものの ($P \approx 0.08$) 上昇傾向を示した。その一方で Collagen type I, Runx2, および Oct4 の mRNA の発現は静水圧刺激の有無による大きな変化は観察できなかった (Fig. 4)。

このことから、静水圧刺激はマウス iPS 細胞においては骨芽細胞への分化を誘導しない一方で、軟骨細胞への分化を若干ではあるが誘導する可能性が示された。一方で、Oct4 の発現がコントロール系と差が無かったこと、Collagen type II の発現においても有意差が示されなかったことから、マウス ES 細胞に比べてマウス iPS 細胞は今回の実験方法では静水圧によって軟骨細胞へ分化誘導されにくいことが確認された。これまでに、化学的刺激を用いた分化制御において、同様の方法で刺激を負荷した場合 ES 細胞と iPS 細胞ではその分化能力が異なるということが平滑筋細胞への分化や心筋細胞への分化において確認されている。これらのことから、将来の臨床応用が期待されている iPS 細胞であるが、その分化制御においては化学的な刺激によるものであれ、物理的な刺激によるものであれ、ES 細胞と同一の刺激を負荷するのではなく、負荷条件を検討する必要があると考えられた。

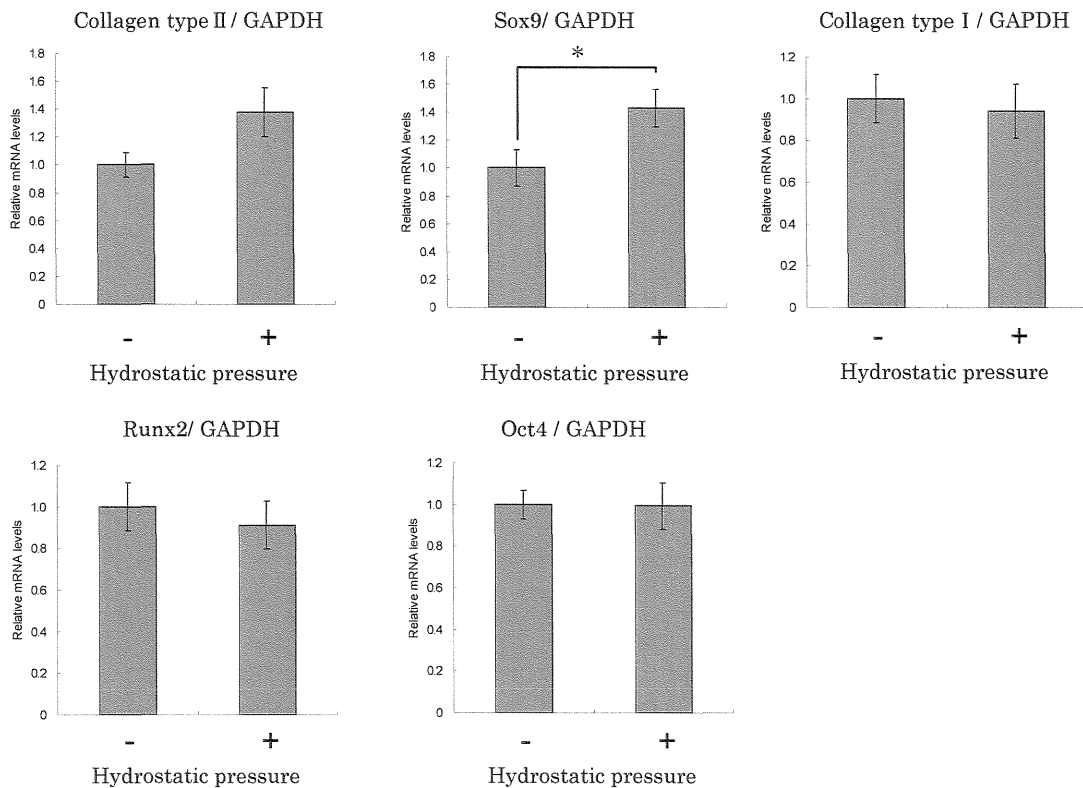


Fig. 4 Relative mRNA expressions of hydrostatic pressured iPS cells.

*: $P < 0.05$ Mean \pm S.E.M. (n = 8)

静水圧負荷による ES 細胞のシグナル伝達のリアルタイムイメージング

マウス由来 ES 細胞株 CCE を 3 日間浮遊培養し EB を作製した後に、あらかじめゼラチンでコーティングしたサファイアガラスに播種し、さらに 1 日間静置培養した。その後、細胞を Ca^{2+} 蛍光指示薬 Fura-2 で染色した後に 20MPa の静水圧を約 5 分間負荷し、その際の 340nm 励起波長における蛍光量と、380nm 励起波長における蛍光量の相対値 (ratio) を計算する事によって、静水圧負荷下における ES 細胞の Ca^{2+} 挙動を計測した。

その結果、静水圧刺激を停止した直後に ratio 上昇を観察した (Fig. 5)。

これまでに、ES 細胞に物理的な刺激を負荷した際の Ca^{2+} 挙動を計測した報告はされていないが、血管内皮細胞などの成熟細胞へ物理的的刺激を負荷した際には Ca^{2+} 濃度が急激に上昇した後に、次第にゆるやかになるように下降するということが報告されており、また、軟骨細胞に静水圧刺激を負荷した際にはその Ca^{2+} 濃度の上昇は静水圧負荷後に発生するということが報告されている。今回の実験結果でも、静水圧負荷後に ratio が上昇し、次第にゆるやかに下降していることから、静水圧負荷後の ratio 上昇はピントのずれによるものではなく、 Ca^{2+} 濃度の上昇によるものだと考えられた。これらのことから、ES 細胞へ静水圧を負荷すると、負荷後に Ca^{2+} 濃度が上昇することが示され、最も未分化な細胞である ES 細胞にも成熟軟骨細胞と同様の静水圧負荷感受機構がすでに存在することが示唆された。

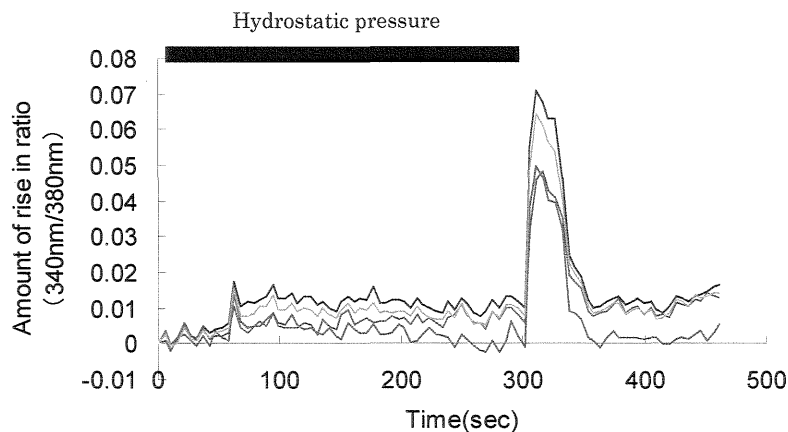


Fig. 5 Amount of rise in ratio caused by hydrostatic pressure