

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト培養軟骨細胞の継代培養に伴い発現が減少する
WNT inhibitory factor 1 の糖・脂質同化に及ぼす影響

指導教員 高戸 毅 教授
東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 藤川 由美子

目的

軟骨組織は自己修復能が少なく、軟骨再生医療に対する期待は高い。われわれの目指す再生軟骨組織は、インプラント型の再生軟骨であり、インプラント型の再生軟骨を作製する場合、組織から単離された軟骨細胞を必要数まで増殖させる必要がある。正常組織における軟骨細胞は、基質産生能が高く、自ら作り出した大量の基質によって自身を小腔内に閉じ込め、最終的にはそれぞれの細胞が孤立して独特の三次元環境の中で恒常性を保つ。しかし、軟骨細胞は生理的な三次元環境から取り出されると、直ちにその典型的な表現型とタンパク質合成能を失い、「脱分化」とよばれる現象を生じる。軟骨の脱分化現象は、継代培養に伴いさらに進み、継代培養に伴い、基質産生能の低下だけでなく、増殖能、ストレス反応性の低下などをもたらし、細胞の生存

性を減少させることが知られている。

したがって、継代培養に伴い発現が減少する遺伝子は、培養環境下における生存性や恒常性の維持に重要な役割を果たしている可能性がある。そのため、本研究においては、培養軟骨細胞における生存性や恒常性維持に重要な役割を果たす因子を同定し、その機能を解明することを目的として、軟骨再生医療の細胞源として多用される100-1000増程度の軟骨細胞（第2-3継代、P2-3）と、過度の増殖により細胞増殖能または基質産生能が極端に低下している1億倍増程度のP7-8を遺伝子発現で網羅的に比較して、候補遺伝子を選定した。

さらに、生体内の永久軟骨においては、軟骨基質の改変や軟骨細胞の物質交換はきわめて緩徐である環境にあつて、含まれる軟骨細胞には、特にグリコゲンや油滴が集積する特徴を有している。この事実を勘案し、培養細胞の継代に伴う変動遺伝子の機能を解析する上で、細胞の生存性や恒常性維持に根源的な役割を果たすエネルギー代謝関連に着眼し、軟骨細胞に蓄積が多い糖・脂質の細胞内取り込みや細胞内蓄積に対する作用を検索した。

方法

実験は全て、東京大学医学部附属病院の倫理委員会の承認を受けておこなった（承認番号622）。小耳症患者21名から、インフォームドコンセントを取得のうえ、摘出された遺残耳介軟骨をメスで細切し、0.15%コラゲナーゼ溶液で処理し、ヒト耳介由来軟骨細胞を単離した。5% Human Serum、100 ng/ml FGF-2、insulinを含むDMEM/F12（HFI培地）を用いて培養し、細胞のストックを作製し、実験に供した。培養細胞を、real time PCR、プロモーター領域に対するルシフェラーゼレポーターアッセイ、Methylation Specific PCR（MSP法）、ELISA、培養細胞蛍光免疫染色、培養上清の生化学的な評価などを行った。また、グルコースや脂質の細胞内取り込みを評価するため、2NBDGやオレイン酸の取り込み量の定量および蛍光観察をおこなった。さらに、細胞生存率の定量するため、生細胞数や生存率をヌクレオカウンターで正確に評価した。

結果と考察

P2およびP7の培養軟骨細胞の遺伝子発現の差をマイクロアレイによって解析した結果、両者の発現量に10倍以上という最も大きな差があり、再現性が高かった遺伝子として、WNT inhibitory factor 1（WIF1）が検出された。マイクロアレイの再現性をreal time PCRによって確認したところ、各継代のWIF1の発現は、ヒト耳介軟骨細胞のn=8の細胞すべてにおいて、P3においてP8と比較し有意に高く、生体ヒト耳介軟骨細胞および各継代の遺伝子発現を検証したところ、継代に伴い発現が減少して

いく傾向が確認された。

継代に伴う WIF1 の遺伝子発現の減少はルシフェラーゼアッセイを行ったところ、P3 で活性が高く、WIF1 は転写レベルで発現調節が行われていることが分かった。さらに、MSP を行った結果、すべての DNA において、今回の PCR 増幅領域においては、DNA のメチル化が生じておらず、DNA のメチル化による発現抑制は生じていないことが示唆された。

P3、P8 ともに、細胞密度が高い状態で培養した方が WIF1 の発現が有意に上昇した。細胞密度の増加が細胞に与える影響として、細胞の低栄養、低酸素が挙げられるが、P3 および P8 ともに、酸素分圧 5% の低酸素下において WIF1 の発現が有意に上昇した。培養上清に対する生化学的検討については、P3、P8 ともに、低酸素下において、グルコース消費量および、乳酸産生量が増加することが分かった。しかし、細胞内 ATP 量を測定したところ、P3、P8 ともに通常酸素、低酸素下における産生量に差はなかった。一方、脂質に関しては、培地上清中の総脂質 (TL)、トリグリセロール (TG)、総コレステロール (TC) 量について、P3、P8 ともに低酸素下で 3 者の培地中濃度が減少しており、低酸素下において、細胞内への脂質の取り込み量が増加していることが示唆された。さらに、細胞内糖・脂質蓄積量を PAS 染色、oil red O 染色によって観察したところ、P3、P8 ともに、低酸素下において細胞内糖・脂質蓄積量が増加することが分かった。

WIF1 と糖代謝に対する影響については、WIF1 存在下において、グルコースの消費量、細胞内糖蓄積量が増加した。2-NBDG によって、WIF1 は、GLUT1 を介して糖の細胞内取り込みを増加させることを確認した。脂質代謝については、培地上清中の TL、TG、TC 量の減少、および細胞内脂質の蓄積量の増加が認められた。さらに、WIF1 は細胞内へのオレイン酸の取り込み量を増加させた。

WIF1 を添加した無血清培地で培養した細胞の生細胞数の経時的変化から、WIF1 は細胞の生存性が高めることが分かった。さらに、WIF1 を添加して 7 日間培養した細胞は、低栄養の緩衝液 KRB に培地交換して 3 時間後、6 時間後において、生存率が上昇することが分かった。

これらの結果から、WIF1 は培養軟骨細胞において、エネルギー貯蔵を亢進させる機能を担っているものと思われた。また、WIF1 によって増加した細胞内糖・脂質貯蔵は、低栄養状態に細胞がさらされた際の、細胞の生存性向上に役立っている可能性が示唆された。