

## 論文の内容の要旨

論文題目 耳介軟骨細胞の細胞分裂速度と基質形成能との関連性についての検討

氏名 石橋 牧子

軟骨組織は無血管性の組織で自己修復能に乏しく、軟骨損傷や変性に対する治療として再生医療の発展が期待されている。軟骨再生医療は再生医療の中でも比較的早くから臨床応用が進んでいる領域で、1994年にBrittbergらが、膝関節の健常部位から採取した軟骨細胞を増殖培養し、局所的な軟骨欠損へ移植する自家軟骨細胞移植(ACI; autologous chondrocyte implantation)を報告している。わが国においても自家培養軟骨が再生医療等製品として承認され、2013年には保険適用になるなど、目覚ましい発展を遂げている。

このように、臨床導入が進んでいる軟骨再生医療では、通例、自家組織から採取した軟骨をin vitroにて継代し、大量培養することで、移植に必要な細胞数を確保する。その際、軟骨細胞は、単層培養することで細胞形態に変化を生じ、基質産生が低下するという脱分化が起きる。この脱分化した軟骨細胞を移植すると再分化が起こり、軟骨組織が再生することを本研究室では確認した。しかしながら、生理的な軟骨と同等な様な構造を有する再生軟骨組織を構築することは、いまだ不可能であるのが現状である。この原因の一つとして、組織より採取した初代軟骨細胞が複数の細胞型を含んでいるために不均一な再生軟骨に至る可能性が考えられる。先行研究において、ヒト耳介軟骨細胞による再生軟骨組織の経時的観察により、ある特定の細胞集団が軟骨再生に寄与していることを示唆する所見が得られている。これらのことから、脱分化した軟骨細胞中には、軟骨基質産生の高い能力を有する細胞が存在すると考えられた。

組織には、体性幹細胞と呼ばれる幹細胞が存在していることが報告されている。体性幹細胞は自己複製能を持つとともに、組織が損傷を受けるとその修復のために前駆細胞または分化細胞を供給する細胞である。軟骨成熟細胞に存在する、基質産生能の高い細胞集団を体性幹細胞様の特性を有した細胞群と仮定し、その同定、濃縮による基質産生能の変化を検討することで、軟骨領域の再生医療における細胞源としての有用性を検討した。

最初に、耳介軟骨から単離した直後のヒト耳介軟骨膜細胞における軟骨幹・前駆細胞マーカーとして報告があったCD44(+)CD90(+)について、ヒト耳介軟骨細胞およびヒト耳介軟骨膜細胞の継代培養に伴う発現変化を検討した。ヒト耳介軟骨細胞では、単離直後のP0(o)で、CD44(+)CD90(+)は5.4%であったのに対し、dishに播種培養すると82%へと大幅に増加した。本研究室で移植細胞として使用しているP2では、CD44(+)CD90(+)は95%以上であったことを明らかにした。しかし、本研究室により行われている軟骨細胞のpoly-L-lactic acid scaffolds (PLLA)足場を用いた移植では、CD44(+)CD90(+)細胞が大多数を占めていると考えられるP2の細胞を移植しても、再生軟骨は不均一な島状を呈しており、必ずしも基質産生の高い再生軟骨を得られていない。つまり、CD44(+)CD90(+)は、細胞を大量培養した後の軟骨幹・前駆細胞を濃縮する

マーカーとしては不適當であることが示唆された。

そこで、成熟細胞から軟骨再生に関与する細胞を同定、濃縮する他の方法について検討した。幹細胞特性として、*in vivo* においては増殖がしばしば抑制されている一方、*in vitro* では増殖が速いという特徴が報告されている。そこで、体性幹細胞様の特性を有した細胞が分裂速度の速い細胞群に含まれると想定し、分裂速度の違いを検出する方法を検討した。培養軟骨細胞の細胞分裂を追跡するために、CFSE (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) を用いて蛍光標識を行い、flow cytometry にて CFSE 蛍光シグナル分布の経時的变化を観察した。その結果、CFSE による蛍光標識は細胞形態・増殖に影響を与えず、蛍光強度の減弱は細胞分裂による蛍光色素の希釈と推測され、培養軟骨細胞の分裂速度の分布を評価することが可能であることが示された。加えて、経時的にヒストグラムの幅が広くなることから、様々な蛍光強度の細胞が存在し、細胞分裂の速い細胞と遅い細胞が存在すると示唆された。

CFSE を用いることで培養軟骨細胞の細胞分裂を追跡することが可能であるという結果が得られたことから、CFSE を利用した細胞分取が可能であるかを検討した。CFSE ヒストグラム幅が広がる P2 day4 の細胞を sorting に使用し、速い細胞群 (CFSE ヒストグラム左側 45%、30%) と遅い細胞群 (右側 45%、30%) を分取した。設定した sort 領域と、sorting した後のヒストグラムを比較したところ、同様の波形を示し、目的の細胞集団を分取していることを確認した。Sorting 後の cells viability は、どの群も >90% であり、rapid と slow 間では有意差がなく、いずれの群も、死細胞または細胞片の集団でないことが示された。

次に、分裂速度の速い細胞群の、*in vivo* における基質形成能を検討するために、移植条件の検討を行った。移植検討には、PLLA のような 3D-scaffold の利用も考えられたが、2D-scaffold である coverslip を利用した。この理由としては、scaffold 材料による細胞への影響や、scaffold と細胞とをつなぐ基材として使用するコラーゲンの作用を出来る限り排除し、細胞を monolayer で移植することで、細胞本来の軟骨形成能を評価するためである。Coverslip を利用した移植条件検討より、播種細胞密度と培養期間を決定し、異なる分裂速度の細胞群による軟骨再生能の検討に進んだ。

P1 day7 で回収した細胞に CFSE を用いて蛍光標識し、P2 day4 まで培養した後に分裂速度の速い細胞群 (ヒストグラム左側 45%、30%) と遅い細胞群 (右側 45%、30%) を分取した。移植条件検討の結果をもとに、48 well plate に置いた coverslip に対し播種密度  $1.0 \times 10^5$  cells/well で 1 週間培養後、ヌードマウス背部皮下に移植を行った。移植直前の各群における cells viability は >90% であり、coverslip 上の細胞数は  $> 0.7 \times 10^5$  cells で、rapid 群と slow 群に有意差は認めなかった。移植 2 週間後、4 週間後で組織片を回収し、トルイジンブルー染色による軟骨基質の評価を行った。分裂速度の速い細胞群は、*in vivo* において高い軟骨基質の産生を示した。通常の移植では、様々な基質産生能を有する雑多な細胞を同時に移植していたことが推測され、分裂速度の速い細胞群を分取、濃縮することで、より高い軟骨再生能を有する細胞集団の移植が可能であることが示唆された。筆者は、培養軟骨細胞に存在する、軟骨再生に関与する細胞を体性幹細胞様の特性を有した細胞と仮定し、分裂速度の違いによる再生軟骨の比較を行ったが、実際に分裂速

度の速い細胞群のなかに体性幹細胞様の特性を有する細胞が存在するかどうかを検討するために、幹細胞特性の一つであるコロニー形成能を、分裂速度の異なる各群において比較した。その結果、分裂速度の速い細胞群、特に **rapid 30%** でコロニー形成能が高いことを示した。

さらに、分裂速度の異なる細胞群の検出、あるいはその中に存在する軟骨形成に関与する細胞を検出することができる細胞表面マーカーが存在するかどうかを検討するために、**CFSE** と細胞表面マーカーを組み合わせ、**flow cytometry** 解析を行った。検討の結果、分裂速度の速い細胞群に明らかに特異的なマーカーを検出することはできなかったが、細胞分裂速度の違う群において異なる発現傾向を示す 2 つの細胞表面マーカーと、群間での発現傾向に差は見られなかったが二峰性の発現を示した 1 つ、合計 3 つの細胞表面マーカー、**CD26**、**SSEA-3**、**CD90** に注目した。この 3 つのマーカーに対する抗体による多重染色を実施し、これらの発現パターンの違いにより区別される細胞群間のコロニー形成能に違いがあるかどうかを検討した。**Control** より有意に高いコロニー形成能を認めた組み合わせは **SSEA-3 (-) CD26 (-) CD90 (+)** であり、約 2 倍高い結果となった。加えて、その細胞集団は、**CFSE** ヒストグラムの **rapid 30%** に半数が分布していることを確認した。この結果から、細胞分裂速度の速い **rapid 30%** 細胞と **SSEA-3 (-) CD26 (-) CD90 (+)** 細胞が似たような性質を有する細胞集団である可能性が推察された。

この表面マーカーの検討で同定された、高いコロニー形成能を有する細胞が **in vivo** における軟骨形成に関与しているかを判断するためには、分取した細胞について **in vitro**、**in vivo** における軟骨再生能、**GAG** 量や遺伝子発現の検討をすることが今後必要である。また、筆者は、脱分化した培養軟骨細胞の中に存在する、軟骨再生に関与する細胞を体性幹細胞様の特性を有した細胞と仮定したが、実際に幹細胞であるかどうかを判断するためには、その特性である多分化能を検討する必要がある。

本研究は、軟骨基質産生の高い細胞群を同定、濃縮する方法として、細胞分裂速度を利用した分取法が活用できることを実証した。さらに、ヒト耳介培養軟骨細胞の分裂速度の速い細胞群が、軟骨再生医療における有用な細胞源の候補の一つになりうることを示した。