

論文の内容の要旨

論文題目 軟骨細胞の再分化過程に関連する生体内因子についての検討

氏名 山脇 孝徳

軟骨細胞は大量培養の過程で脱分化し、軟骨細胞としての特性を失う。しかし、一旦体内に移植されると多くは再分化し、再び基質を産生して軟骨組織を形成する。一方、*in vitro* において軟骨細胞を再分化させることは非常に困難である。体外で成熟させた軟骨組織を移植することが可能となれば、軟骨再生医療の効果はより確実となる。そのためには生体内における軟骨成熟メカニズムの理解が必要であるが、その詳細はまだ明らかになっていない。

例えば TGF- β 、BMP-2、IGF、HIF-1 α などは代表的な軟骨の分化因子であるが、これらの因子を添加しても *in vitro* で成熟した軟骨組織を作製することは非常に困難である。

生体内での軟骨細胞再分化に影響を与える宿主由来細胞についても報告がある。当教室では、足場に充填された軟骨細胞はマクロファージの侵入を受けるが、成熟が進むにつれ免疫寛容を獲得することを報告した。また、初期のマクロファージの侵入は長期的な軟骨細胞の成熟にとっては促進的に働くことも報告した。武部らは、軟骨細胞移植後早期の血管内皮細胞の浸潤が軟骨再分化に有効であると報告した。このように宿主由来細胞による軟骨再分化への影響が示された一方、メカニズムは未だ不明な点が多い。

そこで本研究では、ヒト耳介軟骨細胞移植後の再分化に影響を与える生体内因子を同定するために、カバースリップ上に播種したヒト耳介軟骨細胞を Balb/c ノードマウスの腹腔内に移植し、軟骨再分化に関連する宿主側の細胞性因子、液性因子についての検討を行った。腹腔内に移植した軟骨細胞を回収する際に、腹腔を基礎培地で洗浄して回収した。その上で、腹腔洗浄液中の宿主由来のサイトカインや腹腔内を浮遊する細胞がどのように軟骨再生に影響するかを検討し、候補因子を決定し、候補因子の軟骨分化に与える影響を *in vitro* で検討することにより、それぞれの因子の経時的な変化や役割について検討した。

最初に、カバースリップ上に培養した軟骨細胞をノードマウスの腹腔内に移植し、軟骨細胞の再分化が起こることを確認した。移植片の組織切片に対するトルイジンブルー染色では、1週目にはメタクロマジー陽性領域を認めなかったが、2週目以降徐々に陽性領域を認め、4週目にはラクナの形成などの成熟軟骨組織像を示した。HE 染色では、1週目では線維性組織のみで軟骨様組織を認めなかったが、2週目には軟骨様組織と管腔構造を認め、軟骨周囲には小型の細胞の集簇を認めた。3週目には軟骨組織と周辺組織の区分別が徐々に明確になり、周辺には赤血球を伴う毛細血

管が観察された。4 週目に入ると、軟骨組織の境界がさらに明確になった。一方、カバースリップのみを移植した群では、初期より宿主由来細胞が集簇して皮膜様構造を形成した。軟骨移植の時に認めた、軟骨組織形成や毛細血管の侵入は認めなかった。以上より、軟骨細胞を移植すると、その周辺では毛細血管形成など宿主由来の細胞が何らかの機能を発揮したことが示唆された。また、透過型電子顕微鏡での観察により、初期には軟骨様細胞と宿主由来細胞が近接し、なかでもマクロファージ様細胞は軟骨細胞と細胞間接着をしていることから軟骨再分化への影響が示唆された。

腹腔内での軟骨再分化に関連する宿主由来細胞成分の関与について検討するため、組織採取時に回収した腹腔洗浄液を遠心分離し、細胞成分を分取して軟骨細胞と接触共培養した。RNA を回収してリアルタイムPCRを行ったところ、*COL2* 発現は1週目の細胞移植群から回収した細胞と共培養した軟骨細胞で多かった。また、細胞移植群においては、4週以外でカバースリップのみを移植した群よりも *COL2* 発現が高い傾向であった。以上より、腹腔内の細胞成分が *COL2* 発現に対し何らかの影響を持っている可能性が示唆された。次に、腹腔内細胞をフローサイトメリーを用いて解析し、マクロファージ、B 細胞、樹状細胞について、細胞数の経時的変化を検討した。マクロファージは2週目において増加する傾向にあったが、細胞移植群の方がカバースリップ移植群と比較し有意に低く、3週目においても傾向は維持された。全ての経過でカバースリップあるいは軟骨細胞を移植した群では移植を行っていない群よりマクロファージのポピュレーションの上昇がみられた。樹状細胞、B 細胞はすべての時期を通して有意差はなかった。以上より、浮遊している腹腔内細胞においてマクロファージは明らかな変化を示していることが示された。マクロファージは自然免疫を担当する貪食細胞で、貪食能と同時に種々のサイトカインを放出することが知られている。移植片上の軟骨細胞の有無によって、腹腔内に浮遊している細胞のポピュレーションに変化が生じたことで、腹腔内細胞の免疫反応が軟骨細胞の有無によって変化したことが示唆された。

細胞およびカバースリップの移植自体の有無、移植後の時間経過や、移植片上の軟骨細胞の有無により腹腔内を浮遊するマウス由来細胞に変化が生じたため、それらの細胞から放出されるサイトカインレベルにも変化が生じていると予想した。そのため各条件における腹腔洗浄液中の液性因子が軟骨再分化に与える影響とその違いについて検討するために、1週から4週までの液性成分を回収し、これらを添加因子として *in vitro* で軟骨細胞ペレット培養を行った。DMEM/F12 のみによる培養を行った細胞と比較し、2 週目の細胞移植群の腹腔洗浄液上清 100%で培養した細胞で最も大きく *hCOL2* 発現が上昇した一方、カバースリップ移植群では 1 週目、2 週目の腹腔洗浄液上清で培養した細胞の *hCOL2* の発現は低く、3 週目、4 週目の腹腔洗浄液上清を用いた培養においてやや *hCOL2* 発現が上昇した。細胞移植群とカバースリップ移植群は軟骨細胞の移植の有無の違いのみであるため、軟骨細胞を移植し、再分化が進むことで、腹水の成分に変化が生じていることがわかった。特に、2週目の細胞移植群とカバースリップ移植群を詳細に比較することで、宿主由来の軟骨再分化因子の抽出が可能であると考えられた。

そのため、腹腔洗浄液上清を試料として、111 種類の因子に対してプロテオムアレイ解析を行った。カバースリップ移植群と比較し、細胞移植群において2倍以上発現しているものを陽性とし、4検体中 2 検体で陽性のもを選択した結果、E-selectin, IL-1 β , IL-1 α , Thrombopoietin, IL-12、FGF acidic、IL-13 が候補因子となった。

次に、これらのサイトカインを添加因子として、市販されている各サイトカインのデータシートに記載の ED50 を参考に濃度を設定し、軟骨細胞のペレット培養を行った。結果、IL-1 β 、IL-12 の添加により、コントロールと比較し4倍以上の *COL2* 発現を認めた。一方で、E-selectin、IL-13 は *COL2* 発現との明らかな関連は見られなかった。IL-1 β については軟骨再生との関連についての報告はないため、さらに詳細に検討することとした。

添加した IL-1 β は低濃度であり、宿主側の細胞が分泌する IL-1 β だけでなく軟骨細胞が分泌する IL-1 β も autocrine に軟骨再分化に影響している可能性も考えられた。そのため、BIT, HFI, 10% human serum, DMEM/F12 に抗ヒト(抗ドナー)IL-1 β 中和抗体を添加培養した時の細胞数の変化、*COL2* 発現の変化を検討した。細胞数はいずれも有意差はなく、IL-1 β 抗体が細胞増殖に影響しないことが示された。一方 *COL2* 発現については DMEM/F12 で培養した時に IL-1 β 抗体を添加した群で有意に低下し、BIT でも有意差を認めないものの、*COL2* 発現は減少傾向であった。このため軟骨細胞が分泌する IL-1 β は軟骨細胞の *COL2* 発現を上昇させる可能性があること示唆された。

さらに、細胞移植群から回収した 2 週目、3 週目の腹腔洗浄液上清に抗マウス IL-1 β 中和抗体を添加し、ヒト軟骨細胞を 1 週間培養したのち *COL2* 発現を検討した。その結果、中和抗体添加により *COL2* 発現が減少する傾向を認めた。これらの結果より、IL-1 β は軟骨細胞再分化に促進的に働いている可能性が示唆された。

IL-1 β は IL-1 受容体と結合し、最終的に NF- κ B や AP-1 が活性化される。IL-1 β は主に炎症性サイトカインと考えられており、マクロファージに作用し NO 産生を誘導することで、自然免疫を賦活化させる。一方で IL-1 β の組織再生における役割についてもいくつか報告がある。Hasegawa らは、ゼブラフィッシュの断尾再生モデルにおいて、上皮細胞からの IL-1 β 放出は組織再生に必須である一方、これが遷延する場合、再生は起きず、マクロファージによって急速に沈静化されると組織が再生することを示した。すなわち、適切な調節を受けた IL-1 β が組織再生に必須であることが示唆されている。また、Lange らはマウスの骨折モデルにおいて骨折断面で IL-1 β が増加することを示し、IL-1 β は in vitro で MSC の分化を抑制するが、前骨芽細胞の増殖を促進することを示した。一方 in vivo の検討では必ずしも、IL-1 β が骨折治癒に不可欠ではなく、TNF- α など他のサイトカインが同様の経路を刺激し骨折治癒を促進していることを示した。我々の検討において、in vitro では低濃度の IL-1 β 投与群で *COL2* 遺伝子が有意に発現し、再分化に向かうことが示された。一方で、腹腔洗浄液上清を用いた培養では、抗体を用いた IL-1 β の抑制により *COL2* 発現は低下する傾向はあるものの、有意差はなく、IL-1 β のみならず他の因子も軟骨細胞再分化を促進している可

能性があることが示された。

以上より、軟骨細胞を含む移植片は移植後、マクロファージやリンパ球などの宿主由来細胞の侵入を受ける。その際に、アップレギュレートした IL-1 β などの因子が軟骨再生のスイッチを押し、軟骨細胞の再分化に寄与することが示唆された。