

# 博士論文

論文題目 培養軟骨細胞の生体内移植に伴う成熟現象の生物学的基盤

氏 名 松山 真理子

## 目次

1. 要旨	5
2. 序論	6
3. 方法	16

試薬と抗体

ヒトおよびマウス耳介軟骨細胞の単離と培養

マウス再生軟骨組織の作製と移植

ヒト再生軟骨組織の作製と移植

組織学的、免疫組織化学的評価

培養軟骨細胞の増殖速度の検討

FACS Ariaによるヒト軟骨細胞の分取

ヒト耳介軟骨細胞を用いたコラーゲン 3 次元包埋培養

遺伝子発現の検討

Glycosaminoglycans (GAGs) の定量

腹水上清および腹水細胞を用いた培養

Gene chipによる遺伝子発現の網羅的解析

統計

#### 4. 結果 32

再生軟骨組織を構成する培養軟骨細胞に含まれる循環型細胞の検索

再生軟骨組織を構成する培養軟骨細胞の軟骨基質能に関する

形態計測学的解析

培養軟骨細胞に含まれる軟骨再生前駆細胞の検索

軟骨再生前駆細胞による軟骨再生の検証

軟骨再生前駆細胞に対する移植母床からの成熟誘導因子の検索

マクロファージから分泌される成熟誘導因子の評価

成熟誘導因子の解析と検証

#### 5. 考察と結論 46

#### 6. 謝辞 58

7. 参考文献	59
---------	----

図説	67
----	----

## 要旨

近年、患者から少量の細胞を採取しin vitroで培養して、欠損や機能不全に陥った組織に移植する再生医療への期待が高まってきている。しかし、現在、臨床で使用されている軟骨再生医療は、採取した患者由来細胞を培養して増殖させるものの、in vitroでの基質産生や組織化を促すものではない。

移植前にin vitroで再生組織を成熟させるためには、移植細胞の改善と成熟促進因子の解明の2つのアプローチが必要であると考ええる。そのため、軟骨細胞からなる最小再生単位をマウス皮下に移植し、生体内で再生組織を形成する細胞ポピュレーションを推計し、分裂速度の違いを活用し再生前駆細胞を分取することとした。さらに最小再生単位をマウス腹腔内に移植し、腹水から成熟促進因子の検索、同定を行った。

## 序論

腫瘍切除や外傷などにより軟骨や骨を喪失することがあるが、特に口腔顎顔面領域の場合、顎、鼻や顎関節などの硬組織が切除されると、審美的および機能的な障害が大きく、患者のQuality of Lifeは著しく低下する。これに対し、近年のマイクロサージャリーによる血管柄付き組織移植により大型硬組織再建が可能となったが、顎顔面は形態的に複雑であり、同時に多くの機能を有しているため、これらを元のように再建するのは未だ困難で、完全に満足すべき結果を得るには至っていない。採植部位における侵襲性についても多くの課題が残る。また、若年者が罹患する口唇口蓋裂やヘミフェイスアルマイクロソミアなどを始めとする先天異常、あるいは外傷などにおいても、しばしば鼻や顎関節などの再建が必要となるが、これらを再建するための軟骨組織の採取部位は、耳介や肋軟骨などに限定されている。幼少期においては、いずれも量的に採取量が限られ、逆に15歳以降になると肋軟骨は骨化し始め、軟骨特有の弾性が失われてしまう。すなわち、現時点では、量的にも

質的にも自家軟骨組織移植を用いて再建する事には、大きな制限がある。軟骨を量・質ともに効率的に再生・再建することは、口腔顎顔面外科における重要な課題である。

この目的のため、患者から少量の軟骨細胞を採取しin vitroで培養して、欠損や機能不全に陥った組織に移植する再生医療への期待が益々高まってきている。しかし、現在、臨床で使用されている軟骨再生医療は、採取した患者由来細胞を培養して増殖させるものの、in vitro での基質産生や組織化を促すものではない。過去には、培養自家軟骨細胞を鼻背に注入し鼻の隆鼻術を行った報告がある [1]。しかし、実際には、未熟・未分化のまま直接患部に移植し、生体内に元来備わっている修復力・再生力が働いて再生組織を成熟させて、本来目的とした組織再生に至るものである。現在最も多く臨床に用いられているものの1つである軟骨再生医療の多くは、こうしたメカニズムを利用したものである。従って、移植時には形や機能を維持することができないため、適応できるのは局所的な欠損に限られる。

これに対し、著者らはpoly-L-lactic acid (PLLA)足場素材を導入し、移植前の段階で既に力学強度や3次元形態を獲得している再生軟骨を開発した。

現在、この3次元再生軟骨を口唇口蓋裂の鼻変形の治療に活用している[2]。

しかし、この3次元再生軟骨も移植時の力学強度は足場素材の力学強度に依存するものであり、移植する軟骨細胞に関しては基質産生を行っていない未熟・未分化な細胞を移植している。移植後、力学強度を維持していたPLLA足場素材が徐々に生体内で分解吸収され消失し、それに同期して、移植した未熟・未分化な細胞が基質産生能を獲得し、基質産生を始め、徐々にこの基質が蓄積することによって恒久的な力学強度と3次元形態を獲得するに至る。

したがって、PLLA足場素材の吸収と移植細胞による基質産生という異なる現象が同時にかつ円滑に起こらないと、移植後の形態維持や力学強度の保持が困難になる可能性は否定できない。移植後に潜在する変形や脆弱化の危険性は、力学的強度と3次元形状の維持を本質的な役割とする軟骨再生医療においては根源的な課題である。



そのため、再生軟骨の成熟の唯一の方法である生体内への移植、すなわち生体内に元来備わっている修復力・再生力を活用した再生組織の成熟機序を解明し、この知見をもとに移植後の変形や脆弱化といった再生医療に伴うさまざまなトラブルを回避することは非常に重要である。しかし、現在、生体内に備わっている再生組織を成熟させる生体内の機構は全くわかっていない。

たとえば、移植した培養軟骨細胞のうち、どのような細胞集団が再生軟骨の組織形成に直接関与しているのかという点について、明確に示した報告はない。ヒト耳介軟骨において、軟骨膜細胞のうち軟骨幹/前駆細胞のマーカーであるCD44 とCD90 の2重陽性細胞が約6%存在することを示した報告がある[3]。しかしこれはあくまでも初代培養時の軟骨膜細胞に限った結果であり、実際にはCD44 とCD90 の2重陽性を示す軟骨幹/前駆細胞が継代培養後も幹細胞特性を維持していくのか、もしくは喪失していくのかということは明らかになっていない。ヒトの軟骨から単離可能な細胞の数は限られているため、現時点での再生医療技術では、軟骨再生に必要な量の細胞を継代培養して大

量に増殖させてから移植しなければならない。そのため、軟骨再生に直接寄与すると考えられる細胞集団のみを効率よく増殖させる培養技術があれば、確実な軟骨再生を実現できるが、現在のところはまだ明らかになっていない。

また、移植後の培養軟骨細胞は周囲組織からの刺激を受けて基質産生や組織としての成熟を促進させるが、この周囲組織からの成熟誘導因子については全く分かっていない。関連する因子としては、軟骨の修復に関わる因子について報告があり、現在のところTransforming growth factor  $\beta$  1 (TGF- $\beta$  1)、bone morphogenetic protein 2 (BMP-2)、Insulin-like growth factors (IGF-1)、Fibroblast growth factors 18 (FGF-18)などが検証されている[4]。

TGF  $\beta$  ファミリーは、コラーゲン、フィブロネクチンなどの細胞外マトリックス (ECM) を構成するタンパク質の産生を促進するとともに、プロテアーゼの産生抑制などにより、ECMの分解を抑制することによってECMの蓄積を促進する、つまり軟骨基質の合成を刺激する能力があると報告されている[5]。BMP2 は、マウス膝に注入した場合に、遺伝子解析、免疫化学染色の結果より、プロテ

オグリカンの発現上昇を認めた[6]。また、BMP2 を含浸させたコラーゲンスポンジをウサギ軟骨欠損部に移植すると軟骨修復を促進させることも報告されている[7]。ウマ大腿膝蓋関節の軟骨欠損モデルにおける、移植前にIGF-1遺伝子を導入した軟骨細胞の移植は、in situハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学染色においてⅡ型コラーゲンの発現上昇を認めた[8]。FGF18 のラットosteoarthritis (OA)モデルにおける関節腔への投与は、滑膜の厚さや軟骨形成を増強させる[9]。

いずれの因子も生体内での軟骨修復に関与すると報告されているが、軟骨再生を目的としてin vitroで培養軟骨細胞に作用させても軟骨基質に関わる遺伝子発現は上げるものの[10]、タンパク定量評価や組織学的評価において再生軟骨を成熟、組織化するような効果までは認められない。従って、実際には現時点で報告されている因子や刺激よりも、生体内での現象を再現できるような、さらに強力に基質産生や組織化を誘導する因子が存在しているはずである。培養軟骨細胞の基質産生に対しては、骨形成因子(BMP-2)及びインス

リンが効果的な組み合わせ (BI) であり、少量の培養軟骨細胞塊 (20  $\mu$  L程度) においてグリコサミノグリカンの発現を促進させることが報告されている [11]。しかし、BIには軟骨細胞の肥大分化を促進する欠点もある。そこで、トリヨードサイロニン (T3) を添加すると (BIT)、再分化軟骨細胞のBI誘発性肥大分化を防ぐことも明らかにされた。可溶性因子の最適な組み合わせを検討した結果、BITにおけるGAGレベルは、天然の軟骨と同等であり、BITの組み合わせは再生軟骨形成を促進する可能性があると報告されている。しかし、BIT-処理された軟骨の機械的強度は向上するものの、生体内の軟骨組織に比較すると依然、約 10 分の 1 程度である。また分化誘導できる再生軟骨のサイズも 20  $\mu$  L程度であり、実際に再生させなければいけない軟骨のサイズ、すなわち数mL以上のサイズよりもはるかに小さいため、不十分な点があると言わざるを得ない。

生体内における再生軟骨周囲の組織反応も重要であるが、現在のところ軟骨再生に促進的な作用については殆ど研究されていない。従来はむしろ抑制

的な反応、免疫応答について検証されてきた。例えば、足場素材に基づく再生軟骨組織に対する異物反応の際には再生軟骨周囲に多数のマクロファージを認めると報告がされている[12]。マクロファージによって分泌されるサイトカインまたは液性因子としては、マクロファージは積極的にマクロファージ遊走阻止因子(MIF)、Fasリガンド(FasL)などの免疫特権に関連する因子を誘導するとされている。しかしマクロファージはあくまでも再生軟骨組織の成熟を抑制する役割を果たすとされており、再生軟骨の成熟を高めるものではなく、結局現在のところ再生軟骨周囲から発現している軟骨成熟に寄与する因子はわかっていない。

本研究の目的は、従来の軟骨再生医療で使用されている培養軟骨細胞の生体内動態を検索することにより再生軟骨組織形成の主体となる細胞群を明らかにし、これらの細胞群に対する生体内の成熟促進因子を検索することにより、培養軟骨細胞の生体内移植に伴う成熟現象の生物学的基盤の解明の一助とする事である。

そのため本研究ではまず、移植後生体内においてどのような軟骨細胞が再生軟骨を形成しているのかということを検討するために、軟骨細胞の特性を検索することとした。間葉系幹細胞のような非常に分裂速度の早い、循環型の細胞が存在しているか否かを検討するため、移植した培養軟骨細胞の移動や転移の検索を行った。

さらに、移植部位に存在し続ける軟骨細胞について、再生軟骨を形成する細胞（軟骨再生前駆細胞）としない細胞集団とが実際に存在するのか否かを検証するため、定形のプラスチックディッシュに平面に単層で培養軟骨細胞を播種した移植体（最小再生単位）を移植し追跡した。その最小再生単位の移植の結果を勘案し、軟骨再生前駆細胞の割合を推計した。

また、その推計結果をもとに、フローサイトメーターによって再生前駆細胞を分取する試みを行い、その特性を検討した。すなわち、再生前駆細胞のような幹細胞特性の高い細胞は低密度細胞培養において増殖速度（分裂速度）が早いという過去の報告をふまえ、[3]分裂速度の早い細胞集団と遅い細胞集

団の軟骨への分化能を比較検討した。

ついで、軟骨再生に直接的に貢献する軟骨再生前駆細胞は、実際どのような刺激因子を周囲から受けて再生軟骨を形成するのかということを検索するために再生軟骨周囲を詳細に観察した。さらに、ごく初期から再生軟骨の成熟を誘導する因子として特に重要と推察されたマクロファージについて、より詳細な検討を加えるため、最小再生単位をマウスの腹腔内に移植するモデル（マウス腹腔内移植モデル）を確立し、検証を行った。最小再生単位を腹腔内に移植後、回収した腹水の液性成分、細胞成分と軟骨細胞との共培養を行い、遺伝子発現を評価した。また、gene chipによる遺伝子発現の網羅的解析を行い、再生成熟誘導因子の候補遺伝子を検討した。

## 方法

### 試薬と抗体

Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 HAM

(DMEM/F12)、ペニシリン - ストレプトマイシン溶液、Human Serum、Fetal

Bovine Serum (FBS) およびトリプシン - EDTA溶液はSigma Chemical Co. (St.

Louis, MO, USA) から購入した。Clostridium histolyticum由来のコラゲナ

ーゼは和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) から、3%アテロコラーゲンゲ

ルは株式会社 高研 (Tokyo, Japan) から購入した。その他の試薬は次の通

りである。Insulin (MP Biomedicals Inc., CA, USA)、ポリ-L-乳酸 (PLLA) 多

孔性足場素材 (KRI, Kyoto, Japan)、Fibroblast growth factor-2 (FGF-2)

(Fiblast Spray Kaken Pharmaceutical co., LTD, Tokyo, Japan)、Bone

morphogenetic protein-2 (BMP-2, Astellas Pharma Inc., Tokyo, Japan)、

3,5,3' -triiodothyronine (T3; EMD Bioscience, San Diego, CA)、10%ヤ

ギ正常血清 (ニチレイバイオサイエンス株式会社, Tokyo, Japan)、anti-EGFP



antibody (Invitrogen, Japan)、anti-human type I collagen antibody (LSL Inc., Japan)、anti-human type II collagen antibody (LSL Inc., Japan)、anti-sox9 antibody (abcam, United Kingdom)、anti-PCNA antibody (abcam, United Kingdom)、anti-F4/80 antibody (BMA Biomedicals, Switzerland)、anti-RUNX2 antibody (novus biological, USA)、anti-G-CSF antibody (abcam, United Kingdom)、anti-TGF- $\beta$  antibody (Santa Cruz Biotechnology, USA)、anti-BMP2 antibody (abcam, United Kingdom)、anti-ihh antibody (abcam, United Kingdom)、anti-PTH/PTHrP-R antibody (Bioworld, China)、anti-HOX7/MSX-1 antibody (IMGENEX, USA)、anti-Msx2/Hox8 antibody (Bioss, USA)、anti-CD44 antibody (Gene Tex, USA)、anti-Thy-1/CD90 antibody (Bioss, USA)、anti-green fluorescent protein rabbit IgG fraction (Invitrogen, Japan)、Biotinylated anti-Rabbit IgG (H+L)made in goat (Vector Laboratories, Inc., CA, USA)、Biotinylated anti-rat IgG (H+L) made in rabbit (Vector Laboratories, Inc., CA, USA)、VECTASTAIN Elite ABC

Standard Kit、DAB Substrate Kit for Peroxidase (Vector Laboratories, Inc., CA, USA)、1%アテロコラーゲンゲル(KAWAKEN, Tokyo, Japan)、ウシ血清アルブミン (BSA) (Sigma-Aldrich Co. LLC., ST. Louis, MO)、ISOGEN (Nippon gene, Tokyo, Japan)、SYBR Green (Invitrogen, Carlsbad, CA) 、anti Rabbit IgG, HRP-linked whole Antibody (GE health care ,Japan)、DCTM protein assay (Bio-Rad Lab, Inc., USA)、アルシアンブルー結合アッセイ (Wieslab AB, Lund, Sweden)、100 mm/Collagen-Coated Dish Collagen Type I (IWAKI brand SCITECH DIV. AGCテクノグラス株式会社 Chiba, Japan)、12 well Collagen Type I -coated MICROPLATE(IWAKI brand SCITECH DIV. AGCテクノグラス株式会社 Chiba, Japan)、Cell Culture Insert 12-well 0.4  $\mu$ m pore size(日本BD, Japan)、Thermanox Plastic Coverslip (Thermo Fisher Scientific K. K, Japan)、PKH26GL(SIGMA ALDRICH, Japan)。

ヒトおよびマウス耳介軟骨細胞の単離と培養

本実験全ての手順は、世界医師会ヘルシンキ宣言に準拠し、また東京大学医学部附属病院の倫理委員会から承認を受けた(承認番号 622)。インフォームドコンセントのもと、小耳症患者から、手術時に摘出された遺残耳介軟骨組織の供与をうけた。メスを用いて軟骨膜を剥離して 1 mm<sup>3</sup>程度にまで細切し、0.3%コラゲナーゼ溶液で、37℃で 18 時間、恒温槽で振とう処理を行った。得られた溶解液を 100 μmポアサイズのセルストレイナー (BD Falcon, Bedford, MA) で濾過して残渣を取り除いた後、500×gで 5 分間遠心し、ヒト耳介軟骨細胞を単離した。単離したヒト耳介軟骨細胞を、10 cm径の I 型コラーゲンコート培養ディッシュに 2000 cells/cm<sup>2</sup>の密度で播種し、5% Human Serum、100 ng/ml FGF-2、5 μg/ml insulinを含むDMEM/F12 培地にて、37℃/5% CO<sub>2</sub> のインキュベーター内で培養した。1 週間後細胞がコンフルエントに達したところで、トリプシン - EDTA溶液で細胞を回収し、以下の項で記載するカバースリップやフローサイトメトリーを用いた検討に用いた。

動物実験に関しては、国の「動物の保護及び管理に関する法律」等の法令

に基づき、動物愛護の観点に十分に配慮して行われた。

C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)C14-Y01-FM1310sb マウス (6 週齢、雄) (以下、グリーンマウス) は理研バイオリソースセンターから購入した。グリーンマウスから耳介および耳道の軟骨組織を採取し、軟骨膜を剥離した後、0.15%コラゲナーゼ溶液中で、37℃恒温槽で 8 時間、振とう処理を行った。ヒト耳介軟骨細胞の単離手順に従い単離したマウス耳介軟骨細胞を、10 cm 径のcoll coat dish内に 6000 cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種し、5 %FBS、5  $\mu$ g/ml insulin、100 ng/ml FGF-2 を含むDMEM/F12 培地にて、37℃/5% CO<sub>2</sub> のインキュベーター内で培養した。ヒト耳介軟骨細胞と同様、トリプシン - EDTA溶液を用いて回収し、継代を行った。

#### マウス再生軟骨組織の作製と移植

PLLA多孔性足場素材 (縦 5 mm×横 5 mm×厚さ 3 mm) は、使用前に 70%エタノール浸漬および、紫外線照射 12 時間により滅菌処理を行った。グリーンマ

ウス由来耳介軟骨細胞（第2継代）を、1%アテロコラーゲン溶液中に  $1 \times 10^8$  cells/mlの密度で混和し、PLLA多孔性足場素材に播種し、その後 37°Cのインキュベーター内で2時間静置し、足場素材内に細胞・コラーゲン混和物をゲル化させ、マウス再生軟骨組織を作製した。作製したマウス再生軟骨組織を、ネンブタール麻酔下にて同系マウスのC57BL/6Jマウス（6週齢、雄）（以下、野生型マウス）の背部皮下に移植した。移植手技は、背部皮膚を約 1.5 cm正中切開し、皮下線維性組織で剥離し、作製した再生軟骨組織を移植した。

移植したマウス再生軟骨組織から逸脱し、血流を介して遠隔主要臓器へ移動や転移する細胞の有無を、移植細胞のEGFP蛍光を指標として検証した。移植したマウス再生軟骨組織、および評価対象をして定めた主要8臓器（大脳、肺、肝臓、脾臓、腎臓、耳介、腓腹筋、大腿骨）を、再生軟骨移植後8週、24週で摘出した。

コントロールとして、グリーンマウス（6週齢、雄）、野生型マウス（6週齢、雄）の8臓器も同様に摘出した。回収した再生軟骨組織は、全体像と半割像を

撮影した後、0.1 Mリン酸緩衝 4%パラホルムアルデヒド溶液 (pH 7.4) で常温 1.5 時間固定した。大脳、肺、肝臓、脾臓、腎臓、耳介、腓腹筋、大腿骨は、0.1 Mリン酸緩衝 4%パラホルムアルデヒド溶液 (pH 7.4) で常温 1.5 時間固定した。大腿骨は、固定後PBSにて洗浄し、70%エタノールにて常温 20 分間脱脂後、モース液にて 4 °C で 3 日間脱灰を行った。組織をパラフィン包埋後、厚さ 5  $\mu$ m で切片を作製し、各臓器から非連続 10 切片を選択した。各臓器における陽性細胞数の計測は、HSオールインワン顕微鏡 BZ-9000 (株式会社キーエンス, Osaka, Japan) にて強拡大下観察により行った。

## ヒト再生軟骨組織の作製と移植

移植した培養軟骨細胞のうち、どのような細胞集団が再生軟骨の形成に関与するかということを詳細に検討するため、カバースリップ (直径 13 mm) に播種したヒト耳介軟骨細胞 (第 2 継代) を用いて検討を行った。P2 継代時、1 カバースリップ辺り  $1 \times 10^5$  細胞を播種し、播種後 5 日目のカバースリップ

を移植に用いた。カバースリップに播種した軟骨細胞の移植に際しては、ネブタール麻酔下にて、BALB/cSlc-nu/nu(6週齢、雄)の背部皮下、背面筋肉内、頭蓋骨膜下、腹腔内に移植した。1週、2週、8週、16週で摘出し、0.1Mリン酸緩衝4%パラホルムアルデヒド溶液(pH 7.4)で常温1.5時間固定し、組織学的、免疫組織化学的に評価を行った。

#### 組織学的、免疫組織化学的评价

4%パラホルムアルデヒド溶液にて固定後のサンプルは、PBSで置換後、脱水、パラフィン包埋を行った。ミトクロームを用いて、厚さ5  $\mu$ mで切片を作成し、HE染色、Toluidine blue染色、免疫組織化学染色を行った。免疫組織化学染色は、3%過酸化水素を加えたメタノールにて内因性ペルオキシダーゼを除去し、10%ヤギ正常血清にてブロッキング処理を行った。一次抗体として、anti-human type I collagen antibody、anti-human type II collagen antibodyを、2次抗体としてBiotinylated anti-Rabbit IgG (H+L) antibody

を添加し反応させた。酵素試薬としてVectastain® Elite® ABC Kit、基質溶液としてDAB Substrate Kit for Peroxidaseを用いた。対比染色は、ヘマトキシリンにて染色した。

### 培養軟骨細胞の増殖速度の検討

ヒト耳介軟骨細胞にPKH26 で蛍光標識し、蛍光強度の減弱を指標に増殖速度を検討した。蛍光標識は、ヒト耳介軟骨細胞をP2 継代時、細胞を回収してペレット状にしたところに 2000 細胞あたりPKH26 のPKH solutionCを 1 ml加え懸濁し、PKH色素 4  $\mu$  lをPKHのsolutionCを 1 mlに懸濁したものを加えて室温で 5 分静置して行った。蛍光標識をしない細胞をcontrol群とした。播種後 0、3、6 日目に、100 万cells / mlに調整した軟骨細胞浮遊液をFlow cytometer (BD LSR II 3Lsrs B-R、日本BD、488 nm) で解析した。次に、そのPKH蛍光強度の減弱が、細胞の代謝などによる自然消失ではなく細胞分裂によるものであるかを検証するために、ヒト耳介軟骨細胞 (第 1 継代) 培養 7 日目にマイ



トマイシンCを  $10 \mu\text{g/ml}$  加えた後、PKH26 で蛍光標識し、前述と同様に解析を行った。

### FACS Ariaによるヒト軟骨細胞の分取

ヒト耳介軟骨細胞（第2継代）を、培養7日目でトリプシン - EDTA溶液を用いて回収し、PKH26 を用いて蛍光標識した。培養3日後（第2継代）の細胞をFACS Aria（日本BD, Japan）にて、分裂速度の速い細胞集団（rapid, 全体の50%）と遅い細胞集団（slow, 残りの50%）に分取し、コラーゲン3次元包埋培養やマウスへの移植実験に用いた。

### ヒト耳介軟骨細胞を用いたコラーゲン3次元包埋培養

上記の分取したヒト耳介軟骨細胞（rapid, slow）をそれぞれ0.8%アテロコラーゲンに、 $10^7 \text{ cells/ml}$ の濃度で懸濁し、細胞懸濁ゲルを作製した。15 ml コニカルチューブ (BD Falcon, USA) の底面に  $20 \mu\text{L}$  ( $2 \times 10^5 \text{ cells}$ ) の細胞・

コラーゲン混和物を静置し、37℃、1時間ゲル化させた後、2 mlのDMEM/F12  
培地（control培地）を加え、37℃/5% CO<sub>2</sub> のインキュベーターで培養を行っ  
た。分化誘導培養液として、5  $\mu$ g/ml insulin、200 ng/ml BMP-2、100 nM T3  
を含むDMEM/F12 培地を使用した（BIT培地）。培養液の交換は週に2回、半量  
の培養液交換を行った。1週間後にIsogenを用いて3ペレット回収し、培養3  
週間後に3ペレットを組織学的評価、3ペレットをGlycosaminoglycans  
（GAGs）の定量に用いた。

## 遺伝子発現の検討

上記のIsogenを用いて回収したペレットに関して、プロトコールに従って  
total RNAを抽出した。Prime Superscript逆転写酵素キット（Takara Bio,  
Sigma, Japan）を用いて逆転写を行った後、7500 Fast リアルタイムPCRシス  
テムにより遺伝子発現を定量した。初回変性を94℃で10分間の後、94℃、  
15秒および60℃、1分から成るサイクルで40回反応させた。各遺伝子の発

現量は*GAPDH*の発現量で補正した。使用したプライマーは以下の通りである。

*COL1A1*

F : 5' -ATTCCAGTTCGAGTATGGCG-3'

R : 5' -CGACAGTGACGCTGTAGGTG-3'

*COL2A1*

F : 5' - TTCAGCTATGGAGATGACAATC -3'

R : 5' - AGAGTCCTAGAGTGAAGTGAAG -3'

*GAPDH*

F : 5' - GAAGGTGAAGGTCGGAGTCA -3'

R : 5' - GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'

*LRP6*

F : 5' - CCCATGCACCTGGTTCTACT -3'

R : 5' - CTGGAAGTGGGACTCTGAGC -3'

*Frz8*

F : 5' - GACACTTGATGGGCTGAGGT -3'

R : 5' - CAAATCTCGGGTTCTGGAAA -3'

### Glycosaminoglycans (GAGs) の定量

上記で回収したペレットをハサミで細切し、ホモジナイザー (IKA®-T10 basic ULTRA-TURRAX®) にて 20 秒ホモジナイズした後、10 mg/mL のペプシン / 0.05 M 酢酸溶液中で 4°C、48 時間溶解した。続いて 1 mg/mL の膵臓エラスターゼ / 10×TSB 中で 4°C、24 時間溶解処理後、12,000 x g で遠心し、上清をアッセイに用いた。GAG 測定は、アルシアンブルー結合アッセイ (硫酸化グリコサミノグリカン定量キット、seikagaku biobusiness) を用いて、製品のプロトコールに従って行い、吸光度の測定には、分光光度計 (ARVOTMSX 1420 MULTI LABEL COUNTER、Perkin Elmer™) を使用した。サンプル中のタンパク質を DCTM protein assay (BIO-RAD, USA) を用いて定量し、タンパク 1 mg の GAG 量を算出した。

## 腹水上清および腹水細胞を用いた培養

再生前駆細胞の成熟を誘導する因子を検索するため、生体からの液性成分や細胞成分の採取が容易な腹腔内移植で検討した。上記の培養ヒト耳介軟骨細胞（第2継代）を播種したカバースリップをBALB/cSlc-nu/nu（6週齢雄）の腹腔内に移植した。移植後1、2、8週でカバースリップの回収とともに、ヌードマウス腹腔から腹水を回収した。腹水の回収は、マウス腹腔内にMEM 5 mlを注入し、3分間摩擦後27G針を穿刺して行った。腹水上清と腹水細胞を15,000rpm、4℃、15分で遠心分離した。腹水細胞とヒト軟骨細胞との共培養では、セルカルチャーインサート用12 wellプレートに、ヒト耳介軟骨細胞（第2継代）を $2 \times 10^4$ 細胞/1 ml/wellで播種した。腹水細胞を、ポアサイズ0.4  $\mu$ mのセルカルチャーインサートに、 $1 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^4$ 万細胞で加え、共培養を行った。培地にはMEMを用い、培地量は、well内を2 ml、インサート内を0.5 mlとし、播種後3日目にwell内のみ培地交換を行った。比較対象群には、健常免疫不全マウス腹水と、細胞無しカバースリップ移植後の

腹水を用いた。腹水上清を用いたヒト軟骨細胞の培養では、COL1 coat 12 well プレートに、ヒト耳介軟骨細胞（第2継代）を2万細胞/1 ml/wellで播種後、腹水原液、腹水10%、1%、0.1%をMEMで調整した培地を添加した。比較対象群には、MEMと、BITを用いた。培地交換は、播種後3日目に行った。1週間培養後、Isogenを用いて軟骨細胞を回収し、上記のようにrealtime RT-PCRで遺伝子発現を検討した。

#### Gene chipによる遺伝子発現の網羅的解析

上記の腹水細胞（移植後2週）の遺伝子発現を、マイクロアレイ法（Affymetrix社製Gene Chip Mouse Genome430 2.0 Array）を用いて網羅的に検索した。対照群には細胞なしカバースリップ移植群を用いた（n=2）。それぞれ得られた遺伝子発現の平均値をとり、対照群に対して4倍以上あるいは1/4以下の発現で有意な変化があったと考えた。なお、実験標本数は全てn=6で行い、Gene chipによる解析のみn=2で行った。

## 統計

データは、平均値±SDで表した。統計的有意差の検定には、2群の有意差の検定には、t検定を用いた。P<0.05で有意差があるとみなした。

## 結果

### 再生軟骨組織を構成する培養軟骨細胞に含まれる循環型細胞の検索

再生軟骨組織を構成する培養軟骨細胞において、間葉系幹細胞に見られるような組織修復に関わる循環型の細胞が見られるか否かを検討するため、培養EGFP陽性耳介軟骨細胞から成る再生軟骨組織をマウスに移植し、移植後8週、24週に回収を行った。著者は、EGFPトランスジェニックマウスの耳介軟骨細胞とPLLA多孔体から成る再生軟骨組織を作製し、C57/BL6マウス背部皮下に移植し、8週、24週で回収を行った。肉眼所見では、8週と24週で特に違いは認められず、共に白色滑沢な組織が観察された（図1）。また、8週、24週共に、TB染色では良好なメタクロマジーを認め、HE染色より、細胞の形状が円形で、基質の産生を認める成熟した軟骨領域を観察した。さらに、軟骨領域の割合は8週、24週と両方で殆ど変化は見られなかった。490 nm励起下の観察では、軟骨領域に緑色蛍光を認め、移植細胞由来であることが示唆された。EGFP免疫染色でも、蛍光を示す細胞に一致して、EGFP陽性細胞を認



めた（図 2）。

主要臓器として、大脳、肺、肝臓、脾臓、腎臓、耳介、腓腹筋、大腿骨において、EGFP陽性耳介軟骨細胞の移動や転移を観察した。観察に普遍性を持たせるために各臓器から非連続 10 切片を観察したところ、全ての臓器において、陽性細胞は見られなかった。なお、陰性対照群として定めた移植前のマウスでは 8 臓器において全く EGFP陽性細胞を認めなかった。また、陽性対照群として用いたグリーンマウスでは、8 臓器において全ての細胞が陽性を示した。これらの結果から、再生軟骨を作製する培養軟骨細胞には、間葉系幹細胞にみられるような非常に高い遊走能により積極的に組織修復に関わる循環型細胞は存在せず、血行を介して他臓器へ移動あるいは転移し、異所性に生着、増殖する可能性は極めて低いと推察された（図 3）。

再生軟骨組織を構成する培養軟骨細胞の軟骨基質能に関する形態計測学的  
解析

再生軟骨組織を構成する培養軟骨細胞は生体内への移植後、その場に滞在し再生軟骨を形成するが、移植した培養軟骨細胞のうちどのような細胞集団が軟骨基質を産生し、再生軟骨の形成の本質を担うかということを検索するため、まずは、軟骨再生に直接寄与するような細胞の数を推計することとした。カバースリップに軟骨細胞を単層培養したものを移植して軟骨再生を組織学的に観察したところ、移植時には基質産生を伴わない軟骨細胞が単層で観察されるのみであったが、移植後 1 週では、一部で軟骨基質の産生が観察され、小さな島状の幼弱な再生軟骨が散在性に見られた。移植後 2 週、8 週、16 週と経過するに従い、島状の再生軟骨は次第に拡大し、最終的にはその島状の軟骨が癒合して一連の再生軟骨を形成することがわかった。しかし、一連と思われる軟骨領域を高倍率で観察すると、軟骨細胞の配列に一部不連続な部分が観察され、個々の島状再生軟骨領域が癒合した際の境界領域であることが示唆された。そのため、このような境界領域に留意し、島状再生軟骨領域を定量すると、移植後 1 週から 16 週までその軟骨領域数（島状の数）は

ほぼ一定であった（図 4）。

これらの軟骨再生領域は軟骨細胞が島状に集塊を形成する傾向があることを勘案すると、特定の培養軟骨細胞が生体内でモノクローナルに増殖し、再生軟骨領域を形成すると推測される。このような島状再生軟骨領域を形成する細胞を軟骨再生前駆細胞と仮称し、軟骨再生前駆細胞の存在確率を推計した。培養軟骨細胞の直径を約 0.1 mm と仮定すると、島状再生軟骨領域の平均数が 1 mm あたり 0.8 個であるため、移植時に同領域に存在する培養軟骨細胞が平均 10 個と考えられるため、培養軟骨細胞中、軟骨再生前駆細胞は 8%、すなわち全培養軟骨細胞中 1 割程度が軟骨再生前駆細胞であると推計された（図 4）。

#### 培養軟骨細胞に含まれる軟骨再生前駆細胞の検索

組織学的解析から軟骨再生前駆細胞が生体内でモノクローナルに増殖していたことが示唆されたため、軟骨再生前駆細胞は *in vitro* では増殖速度の速

い細胞として観察されると推測された。培養軟骨細胞の増殖速度の分布を検索するため、培養軟骨細胞をPKH蛍光で標識し、増殖に伴う希釈の分布をflow cytometer測定した。蛍光標識後の培養 0 日目では、標識濃度を示すヒストグラムは鋭い波形を示したが、培養 6 日目まで経時的に蛍光強度は減弱し、ピークは鈍化しヒストグラムが扁平化した（図 5）。

蛍光標識した細胞を培養すると、細胞増殖（細胞分裂）に従い蛍光強度の減弱を示すことが確認されたが、この現象が細胞による標識蛍光の代謝・排泄によるものでないのかということを検証するために、細胞分裂を止めた状態での培養軟骨細胞をflow cytometerで解析した。そのため、培養軟骨細胞にマイトマイシンCを添加した後、PKH26 による蛍光標識を行って培養し、蛍光強度を測定すると、培養 0 日目から 6 日目まで蛍光強度のピークは全く変わらなかった。また、ヒストグラムの波形にも変化は認められなかった。よって、培養に伴うPKH蛍光強度の減弱は細胞分裂によるものであると考えられた。標識細胞群では経時的に波形が徐々に幅広になり、分裂速度の速い細胞

群と遅い細胞群とが存在することを確認した（図 5）。

## 軟骨再生前駆細胞による軟骨再生の検証

軟骨再生前駆細胞の特性を検証するため、前項で検討した軟骨再生前駆細胞の存在確率の推計値約 10%を参考にして、PKH26 による蛍光標識を行って培養し、分裂速度の早い細胞集団（全体の 50%）を分取し、遅い細胞集団（残りの 50%）と比較した。各細胞群の軟骨への分化能を、まずは、*in vitro*の系を用いて分化誘導を行い、real time PCRによるcol2 遺伝子発現やGAGの定量評価、トルイジンブルー染色による組織学的検索などで評価した。分化誘導後のcol2 遺伝子の発現は、分裂速度の遅い群にくらべ、早い細胞群では有意に高かった。また、GAG定量評価においても分裂速度の早い細胞群の方が遅い群より有意に高かった。トルイジンブルー染色組織学的検索においても、分裂速度の早い細胞群の方が遅い群よりメタクロマジーが強い傾向を示した（図 6）。

次いで、in vivoの評価においては、移植後 8 週の再生軟骨組織のHE染色、トルイジンブルー染色を行い、組織像を評価した。HE所見では、分裂速度の早い細胞群、遅い群ともに再生軟骨内部でヘマトキシリン好性の領域が観察され、再生軟骨外周にはエオジン好性の線維性領域で構成される外周線維組織が観察され、組織学的に明らかな違いは認められなかった。しかし、トルイジンブルー所見では、分裂速度の速い細胞群では遅い群と比較し、広範にメタクロマジーが観察され、良好なプロテオグリカンの蓄積と軟骨再生が示された（図 7）。

#### 軟骨再生前駆細胞に対する移植母床からの成熟誘導因子の検索

次に、生体内への移植により再生前駆細胞の成熟を誘導する因子を検索するために、軟骨細胞を移植した周囲組織における各種因子の局在を免疫組織化学染色で評価した。

線維組織の細胞外基質である I 型コラーゲンは移植後 1 週から 2 週、8 週

と経過するに従い再生軟骨外周線維組織に密に局在するようになった（図 8）。

軟骨組織に特異的な細胞外基質であるⅡ型コラーゲンは 1 週では殆ど認めら

れないが、2 週、8 週では再生軟骨と思われる組織に局在するようになった（図

8）。次に、細胞増殖を検討するため PCNA の局在を観察したところ、1、2 週で

は再生軟骨の他、周囲の線維組織においても顕著な局在を認め、8 週では減

少傾向を示した（図 8）。軟骨組織や線維組織などの各領域が移植母床（ホス

ト）由来なのか、移植細胞（ドナー）由来なのかということを検討するため、

EGFP の発現を評価した。EGFP は、1 週から 8 週において軟骨と思われる領域

とその外周の軟骨膜に局在を認めた（図 8）。軟骨膜に存在する組織幹細胞で

発現しているマーカーと報告されている CD44、CD90 の局在を観察したところ、

8 週で再生軟骨の辺縁部分に CD90 陽性細胞が観察されたが、軟骨再生前駆細

胞を直接表示するマーカーではないことが示唆された（図 8）。

次に軟骨細胞に関連する転写因子の局在を検討した。Ⅱ型コラーゲンなど

の軟骨特異的遺伝子の転写を誘導し、軟骨細胞への分化を決定づけるといわ

れるSOX9 は、1 週の再生軟骨領域において既に局在が認められ、2 週以降局在は減少傾向を示した（図 9）。顔面の器官形成を司る転写因子であるMSX1、MSX2 については、2 週で軟骨膜に局在が観察された（図 9）。軟骨細胞の後期分化マーカーであるRUNX2 は、1-8 週で再生軟骨の辺縁部および軟骨膜部において局在が見られた（図 9）。

軟骨細胞の分化に関する成長因子について検討を行った。軟骨の増殖、基質産生に関与するTGF  $\beta$  は、2 週以降で再生軟骨組織内部の軟骨細胞に局在を認めた（図 10）。軟骨細胞の増殖の促進因子であるIhhは、1 週で多数の軟骨細胞に陽性を示し、2 週以降になると再生軟骨の辺縁に存在する小型の軟骨細胞ならびに再生軟骨周囲の細胞に局在を認めるようになった（図 10）。一方、軟骨細胞の増殖を抑制し分化を促進する因子であるPTHrPにおいても、1 週で再生軟骨領域の中央部に存在する軟骨細胞に陽性を示し、2 週以降は、再生軟骨の辺縁の小型細胞ならびに再生軟骨周囲の細胞に局在を認められた（図 10）。軟骨細胞の後期分化を促進するBMP2 は 8 週で再生軟骨の辺縁の小



型細胞ならびに再生軟骨周囲の細胞に局在を認めるようになった（図 10）。

最後に血球系の細胞の関与を検討した。マクロファージの局在は、1 週より再生軟骨の周囲に見られ（図 10）、マクロファージと軟骨細胞の相互作用において重要な役割を果たす顆粒球コロニー刺激因子であるGCSFは、1 週から再生軟骨の細胞や周囲の細胞に局在が観察された（図 10）。

軟骨細胞の分化に関する因子はいずれも 2 週以降、再生軟骨周囲の移植母床の細胞に観察されたが、実際に再生軟骨組織の成熟は 1 週より始まっており、再生軟骨の成熟を誘導する因子として該当するものはなかった。一方、1 週から再生軟骨の周囲に存在するものはマクロファージであるため、再生軟骨周囲に局在し、軟骨の成熟を誘導する、移植母床側から産生される因子はマクロファージより分泌されるものと推測された。

#### マクロファージから分泌される成熟誘導因子の評価

マクロファージの軟骨成熟に対する作用をより詳細に検討するため、腹水

中の液性成分や細胞を回収して評価しやすい腹腔内移植を検討した。軟骨細胞を腹腔内に移植することによって、従来行っていた皮下移植と同様に軟骨再生が認められるかを検討するために腹腔内移植、加えて比較検討のため背面筋肉、頭蓋骨膜下への移植も行った（図 11）。その結果、いずれの部位でも再生軟骨の形成が観察された。背面皮下では、1 週の段階ですでに軟骨基質の産生を認め、軟骨細胞様の円形細胞も観察した。一方、腹腔内移植と背面筋肉、頭蓋骨膜下でも、2 週以降で良好な軟骨基質産生が観察され、8 週にいくに従って基質産生は徐々に増加傾向を示した。再生軟骨を形成する領域に関しては、腹腔内は他の 3 部位と比較して軟骨領域の面積が小さい傾向を認めたが、強拡大で観察すると軟骨基質の産生が見られ、腹腔内においても他 3 部位と比較して同様に軟骨成熟が観察された（図 12, 13）。

I 型コラーゲンは、いずれの部位においても 1 週では広く局在を観察したが、2 週以降、徐々にその局在は減少傾向を示した（図 14）。II 型コラーゲンは、1、2 週から 4 部位いずれの再生軟骨領域において局在が認められ、2 週

以降ではその局在は経時的にやや増加傾向にあった（図 15）。従って、腹腔内移植においても再生軟骨組織を形成することが示された。そのため、軟骨細胞を腹腔内に移植し、移植後に回収した腹水中の液性成分と細胞成分の、軟骨分化における効果を検索することとした。

腹水上清ならびに腹水細胞と軟骨細胞との共培養を行った。腹水上清との共培養においては、Ⅰ型コラーゲンは移植後 1 週、2 週、8 週といずれの腹水においても発現が認められた。一方、Ⅱ型コラーゲンは移植後 1 週から 2 週にかけて発現上昇を認め、特に 2 週の腹水濃度が 0.1-1 %において、軟骨基質産生促進培地 (BIT) と同様に、コントロール群 (健常免疫不全マウス腹水、細胞なしカバースリップ移植群) に対して有意に高い発現を認めた。従って、培養軟骨細胞は、移植後 2 週回収の腹水上清との共培養によって成熟が促されることが示唆された（図 16）。

腹水細胞との共培養においても、Ⅰ型コラーゲンは移植後 1 週、2 週、8 週の腹水細胞で常に発現が見られたが、いずれにおいても細胞数が減少する

に従い発現は上昇する傾向を示した。Ⅱ型コラーゲンは移植後 1 週、2 週における 1-5 万細胞数の共培養時に発現増強を認め、特に移植後 2 週における 1 万細胞数との共培養時に著明に高い発現を示した (図 17)。移植後 8 週の腹水上清、腹水細胞との共培養では、いずれもⅡ型コラーゲンの発現増強は観察されなかった (図 16, 17)。

## 成熟誘導因子の解析と検証

軟骨細胞と腹水細胞との共培養後、Ⅱ型コラーゲンの遺伝子発現量が最も高かった 2 週のサンプルに関し、gene chipによる遺伝子発現の網羅的解析を行った。対照群には細胞なしカバースリップ移植群を用いた。その結果、対照群に対して有意に発現上昇が見られる遺伝子 10 個、発現低下が見られる遺伝子 26 個を同定した。このうち、IGFBP-4 は、従来の報告から、古典的ウィントシグナルを抑制することにより心筋発生を促進することが知られているため[13]、軟骨再生前駆細胞の特異的な成熟誘導にも関与すると推測し、こ

の分子に着眼した（図 18）。心筋では、IGFBP-4 はFrz8 やLRP6 というwntシグナルに関わるようなファクターに直接作用して心臓発生を制御している。

培養軟骨細胞の場合、再生前駆細胞にこれらのファクターが高発現しており、特異的に働いている可能性がある。そのため、IGFBP-4 はwntシグナルを介して再生前駆細胞に特異的に作用している可能性があると考えられた（図 19）。

## 考察

著者は本研究において、移植した軟骨細胞の体内動態を検証するため、移植軟骨細胞が再生軟骨組織内に留まっているか否かを検討したうえで、移植後に生体内で再生軟骨組織を形成する細胞を再生前駆細胞と仮称し、移植した細胞の全てではなく、この特定の細胞集団が軟骨再生に有利に貢献していることを示した。そして、この再生前駆細胞が、移植母床から分泌される成熟促進因子によって分化するということを明らかにした。

まず著者は、EGFP陽性耳介軟骨細胞から成る再生軟骨組織をマウスに移植し、移植後 8 週、24 週に他臓器への軟骨細胞の移動がないことを組織学的に確認した。過去の論文では、移植母床から再生軟骨組織内にマクロファージが侵入していると報告されている[12]。本論文からも、再生軟骨組織内にホスト由来の細胞が存在していることは推測される（図 2、EGFP）。従って、再生軟骨組織の外から中に入ってくる細胞は散見されるが、再生軟骨組織内から外に行くという現象はこれまで確認されていなかったため、本検討を行っ

た。臓器間を細胞が移動する現象として、一般に、癌の遠隔転移が知られている。転移とは、一つの器官または領域から別の隣接した器官または部位への細胞の広がりとして定義されている[14]。細胞移植後の局所転移には、以下に記すように過去にも様々なモデルが報告されており、癌転移の分子機構としては、接着分子[15, 16]、蛋白分解酵素[17, 18]、増殖因子[19, 20]、血管新生[21, 22]、ケモカイン[23, 24]などが複雑に相互作用し、癌転移を引き起こすと推測されている。

たとえば、U14 扁平上皮癌細胞をICRマウスに腹腔内注射すると、15-20 日で 53%の割合で頸部リンパ節転移を認めた[25]。この報告では、腫瘍細胞のリンパ節転移は辺縁部の洞への浸潤に始まり、その後皮質と髄質に侵入することでリンパ節が破壊される、と考察していた。この腫瘍形成や転移に重要な役目をしているものの一つがMMPであった。MMPはすべての細胞外基質を実質的に切断することができる。この細胞外基質の分解は腫瘍細胞の転移に大きく関わっていた。MMPファミリーの中でも、特にMMP-2、MMP-9 は転移に重

要なファクターとなっていると考えられた。また、ヒト肺癌細胞MDA-MB-231 cellsをヌードマウス左心室に注入すると5週で51.8%の骨転移を認めた[26]。

この報告では、肺癌細胞と破骨細胞の生成物の刺激によって分泌された多くの局所因子や成長因子が、2次的に破骨細胞の作用を促進し、骨転移を進行させると推測していた。また、ヒト肺癌細胞MT-1をヌードマウス尾部より静注すると6週で100%肺転移を認めた[27]。

上記の例は、いずれも腹腔内、心注、静注といったような、細胞が遠隔へと移動しやすい環境に移植する方法で、転移が起きていた。一方、皮下移植モデルは、遠隔転移を起こしにくいとされている。例外的に、ヒト肝癌細胞MHCC97-H, MHCC97-L cell linesは、ヌードマウス背部皮下への移植で、5-6週後に37%-58%の割合で肺転移を生じるが[28]、この細胞はトランスフォーミング増殖因子 $\beta$  (TGF  $\beta$ ) を多く産出することが知られており、このような増殖因子の過剰な産生が癌細胞の転移を促進するひとつの要因とされている。



われわれが検討している培養軟骨細胞にも、MMP [29]やFGFなどの成長因子 [30]を産生する能力がある。しかし、培養軟骨細胞は基本的には分化誘導刺激に反応して、細胞周期が停止する機能が温存されている [31]。さらには、皮下移植という比較的転移を起こしにくい移植方法を採用していることもあって、本再生軟骨における培養軟骨細胞は、転移（細胞の臓器間移動）を起こさないものと推察される。

一方、同じ間葉系細胞である骨髄由来間葉系幹細胞は血中に動因されると、心筋などの他臓器に生着することが報告されている [32]。同系列の細胞として培養軟骨細胞も、万が一血中に動因された場合、間葉系幹細胞の同様な現象が観察される可能性を議論する必要があるかもしれない。しかし、間葉系幹細胞は非常に接着能力が高い特殊な細胞であり [33]、また他の細胞と融合し多分化能を発揮する特異的な細胞であるため [34]、培養軟骨細胞の場合他臓器に生着する可能性は極めて少ないと考えてよいと思われる。よって、現在著者らが用いている培養軟骨細胞は移植部位にのみ存在しうると考

えた。

生体内における軟骨再生医療を行う際には、継代培養を行い大量の細胞数を  
得ることが必要である。大量の培養軟骨細胞が得られても、分裂速度の早  
いもの、遅いもの、さらには増殖能や基質産生能の高いもの、低いものなど  
様々な一群の細胞があると考えられる。過去には、分裂速度の早い、高い細  
胞運動性を持つVCAM-1 陽性ヒト間葉系幹細胞はRapidly expanding clones  
(RECs)と呼ばれ、この分裂速度の早い細胞群は、強力な多分化能と自己複製  
能力を持つという報告がある[35]。そこで本研究では、移植後に生体内で再  
生組織を形成する細胞ポピュレーションの推計を行ったところ、培養軟骨細  
胞中、再生前駆細胞は約 8%であるという結果を示した。著者は蛍光強度の減  
弱を利用してFACsによる再生前駆細胞の濃縮を行い、軟骨再生の検証をした  
ところ、分裂速度の早い細胞群が、一般の組織幹細胞と同様に、in vitroで  
は高い増殖能をもつことを示した。なお今回は、相反分取とはなるが、軟骨  
細胞の生存性が安全に維持できるよう、分裂速度の違いで細胞数が 50%ずつ

になるところで分取を行った。今後は、さらに分画を細かく絞って解析を行う予定である。In vivoの評価においても、分裂速度の早い細胞群のほうが、より軟骨再生を促進する結果となった。従って、軟骨細胞においても分裂速度の早いある特定の一群の軟骨細胞を集めれば、より効率よく、成熟した軟骨再生可能になるかもしれないと推察した。

しかしながら、分裂速度の早い細胞集団だけを容易に濃縮して再生軟骨に応用することは難しいのが現状である。継代培養するほど、分裂速度の速い細胞集団だけが、すなわち幹細胞特性の高い細胞が集まってくるはずである。

しかし、実際には培養を重ねるだけでは簡単に集めることができない。それは、ある時点から軟骨細胞の増殖能は止まり、脱分化という現象がおきるからであろう。軟骨細胞を組織から単離、単層培養すると、細胞は細胞周期に入って増殖する。約 1～3 週間で細胞は脱分化し始め、線維芽細胞様の表現型を示す。このことは、Ⅱ型コラーゲンの減少やⅠ型コラーゲンの増加、並びに線維芽細胞マーカーThy-1/CD90 の出現によって検出される。また、現在遂

行している培養条件が、分裂速度の早い細胞群の細胞特性を維持するのに十分でないことも考えられる。さらに、分裂速度の早い細胞群が幹細胞特性を有するといっても、細胞分裂回数には制約があり、細胞老化の問題もある。

よって著者は培養軟骨細胞を蛍光標識し、分裂速度の早い細胞は蛍光が早期に希釈されるという原理を活用してFACSによる再生前駆細胞の濃縮を行った。

つぎに、移植軟骨細胞の転移はないものの、異所性移植をすると軟骨形成を認めることは確認したので、移植母床からは軟骨成熟を誘導させるどのような因子が分泌されているかということを検証した。移植軟骨細胞の転移と異所性移植とは、基本的には両者に関連性はないと考える。

細胞集団が移植母床から如何なる刺激を受けて増殖し、基質を産生し、組織化するのかということについて検討を行った。軟骨細胞移植を行うと、生体内で特異的に基質産生を認め、経時的に軟骨基質が蓄積される。生体内で特異的に基質産生をする理由としては、細胞から分泌される液性因子の影響や、細胞が液性因子を介して刺激をしていることが考えられる。過去には、

へパリン結合IGF-1 (XP-HB-IGF-1)を作製し、軟骨における有効性を検討した報告がある[36]。IGF-1 は、循環において 99%はIGFBP1-6 に結合しているが、IGFBPsを介して細胞外マトリックスに結合することができる[13]。ラット心筋細胞にXP-HB-IGF-1 を添加して培養すると、XP-HB-IGF-1 は、選択的に軟骨に保持され、持続的に軟骨細胞の生合成を刺激することが報告されている。

IGF-1 は軟骨の細胞外マトリックスの合成を促進し、軟骨の分解を抑制する。しかしながらIGF-1 を軟骨に送達する実践的な機序はまだわかっていない。

なぜ生体内においては移植軟骨細胞の軟骨分化が認められ、現在のところ *in vitro*においては不可能であるかということについては、腹水共培養の結果より、生体内の細胞成分と細胞から分泌される因子が関係していると推察した。現時点で著者は、その主体はマクロファージの可能性があると考えた。

移植後 1 週から再生軟骨周囲組織に観察された因子は唯一マクロファージであったため (図 10、F4/80)、今回はマクロファージに着眼して腹腔内モデルにおける検討を行った。本研究では十分に検討されていないが、勿論T cell、

B cellなど他の細胞の関与の可能性も否定できない。しかしながら、マウス皮下移植においてはマクロファージが軟骨成熟の主体を担うと推測されたため、今回はマクロファージに注目した。

自然免疫において、炎症や生体の防御反応の中心的役割を担っている単球-マクロファージ系の細胞には、多様性や可塑性があることが知られている。

細菌感染などにより局所に流入してくる単球-マクロファージは、 $\text{IFN}\gamma$  や TLRリガンドなどにより活性化され、M1 マクロファージとなる (classically activated macrophages)。M1 マクロファージは、 $\text{TNF}\alpha$ 、IL-6、IL-12 などの炎症性サイトカインや活性酸素などを産生し、Th1 型の免疫応答を誘導する。

一方、Th2 細胞、好塩基球、マスト細胞や自然リンパ球などが産生したIL-4やIL-13により活性化された場合には、M2 マクロファージとなる

(Alternatively activated macrophages)。M2 マクロファージはアルギナーゼやマンノース受容体などを発現し、組織修復、血管新生、腫瘍増殖の促進、免疫抑制機能などを有している。

生体内におけるマクロファージの特性は多様であり、サブクラス分類には必ずしも当てはまらないとする報告もあるものの、機能的に異なるマクロファージのサブクラスは、様々な疾患の病態形成に関与しており、M1-M2のバランスを変えることが新たな治療法となる可能性も示唆されている[37]。

再生軟骨移植においては、移植後早期にはM1 マクロファージが優位であるが、その後M2 マクロファージの局在が増加することが観察されている。本実験において、軟骨細胞の腹腔内移植で観察されたマクロファージは、軟骨細胞の成熟を促進する特性を有することから、組織修復に関与するM2 マクロファージに類似した特性を有するものと推察された。過去にはマクロファージは再生軟骨組織の成熟を抑制する役割を果たすとされており、再生軟骨の成熟を高めるものではないと考えられていた[38]。しかし、近年ではM1、M2のサブクラスの存在(ポラリゼーション)が報告されており[37]、M1 マクロファージは、Th1 型の免疫応答を誘導し、M2 マクロファージは組織修復、血管新生などの免疫抑制機能を有していることがわかっている。本論文において、

移植早期から再生軟骨組織周囲に認められるマクロファージは、軟骨成熟を誘導し、M2 マクロファージに類似するものであると推測した。

今後は、軟骨細胞の腹腔内移植で局在するマクロファージのサブクラスの検討や、サブクラスのバランスシフトのメカニズムなどを、詳細に検討していく予定である。

軟骨細胞は移植後に生体内の修復力・再生力が働いて軟骨組織の成熟が起きる。生体内で再生組織を構成する再生前駆細胞を同定し選別、濃縮するとともに、生体内の修復力・再生力のメカニズムを明らかにすることは非常に重要である。今後は、分裂速度の違いで分取したヒト耳介軟骨細胞の各細胞群にIGFBP-4 を添加してin vitroによる評価を行うこと、ヒト耳介軟骨細胞を用いて作製した再生軟骨組織をIGFBP-4 ノックアウトマウスに移植後、in vitroでの評価を行うこと等を検討する予定である。

現在、再生軟骨は生体内で成熟させているが、今回分裂速度の違いで分取した再生前駆細胞と、候補にあげたIGFBP-4 などの成熟誘導因子によってin



vitroで成熟できるようになれば、より高度な再生軟骨形成が可能になると考えられる。本研究では、再生前駆細胞に関しては分裂速度で分類し、また成熟促進因子についてはIGFBP-4 を候補にあげたが、更に詳細なマーカーや因子の同定を進めていき、生体外で成熟させる方法確立して、より高度な再生軟骨の形成につながるような技術確立していきたい。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、一方ならぬご指導、ご鞭撻を賜りました指導教官の東京大学大学院医学系研究科 外科学専攻 感覚・運動機能医学分野 口腔外科学講座 高戸 毅教授に、厚く御礼申し上げます。また、研究・実験を進めていくにあたり、常日頃より多大な御助言、御指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科 軟骨・骨再生医療寄付講座 星 和人特任准教授に、大変感謝申し上げます。そして軟骨・骨再生医療寄付講座の皆様、口腔外科学教室の皆様、家族、友人、といった自身の周りの全ての方々に本当に支えていただきました。本稿を終えるに当たり、心より深く御礼申し上げます。

## 参考文献

1. Yanaga, H., et al. Generative surgery of cultured autologous auricular chondrocytes for nasal augmentation. *Aesthetic Plast Surg.* 33.6 (2009): 795-802.
2. Hoshi, K., et al. Recent trends of cartilage regenerative medicine and its application to the oral and maxillofacial surgery. *Oral Sci Int.* 10.1 (2013): 15-19.
3. Kobayashi, S., et al. Reconstruction of human elastic cartilage by a CD44<sup>+</sup> CD90<sup>+</sup> stem cell in the ear perichondrium. *PNAS.* 108.35 (2011): 14479-14484.
4. Fortier, L., et al. The Role of Growth Factors in Cartilage Repair. *Clin Orthop Relat Res.* 469.10 (2011): 2706-2715.
5. Du, M., et al. Regulation of human mesenchymal stem cells differentiation into chondrocytes in extracellular matrix-based

hydrogel scaffolds. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 114C (2013): 316–323.

6. Beuningen, H., et al. Differential effects of local application of BMP-2 or TGF- $\beta$ 1 on both articular cartilage composition and osteophyte

formation. *Osteoarthritis and Cartilage*. 6 (1998): 306–317.

7. Yu, Y., et al. Bone morphogenetic protein 2 stimulates endochondral ossification by regulating periosteal cell fate during bone repair. *Bone*.

47 (2010): 65–73.

8. Goodrich, L., et al. Genetic modification of chondrocytes with insulin-like growth factor-1 enhances cartilage healing in an equine

model. *Bone and Joint Surgery*. 89-B (2007): 672–685.

9. Moore, E., et al. Fibroblast growth factor-18 stimulates chondrogenesis and cartilage repair in a rat model of injury-induced

osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*. 13.7 (2005): 623–631.

10. Ishibashi, H., et al. Effects of transforming growth factor beta 1

on the plasminogen activation system, collagen and integrin synthesis, and proliferation of rabbit mandibular condylar chondrocytes. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2792 (2013): 1-6.

11. Liu, G., et al. Optimal combination of soluble factors for tissue engineering of permanent cartilage from cultured human chondrocytes. *J Biol Chem.* 282.28 (2007): 20407-20415.

12. Fujihara, Y., et al. Immunological response to tissue-engineered cartilage derived from auricular chondrocytes and a PLLA scaffold in transgenic mice. *Biomaterials.* 31.6 (2010): 1227-1234.

13. Zhu, W., et al. IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis. *Nature.* 454 (2008): 345-350.

14. Nguyen, D., et al. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer.* 4 (2009): 274-284.

15. HE, Z., et al. Adeno-associated virus-mediated expression of

recombinant CBD-HepII polypeptide of human fibronectin inhibits

metastasis of breast cancer. Breast Cancer Res Treat. (2013) : Epub ahead of print.

16. Felding-Habermann, B., et al. Integrin activation controls

metastasis in human breast cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 98.4 (2001) : 1853-1858.

17. Matsumoto, Y., et al. Trimeric Tn antigen on syndecan 1 produced by

ppGalNAc-T13 enhances cancer metastasis via a complex formation with

integrin  $\alpha 5 \beta 1$  and matrix metalloproteinase 9. J Biol Chem. 16.288

(2013) : 24264-24276.

18. Kleiner, DE., et al. Matrix metalloproteinases and metastasis. Cancer

Chemother Pharmacol. 43 (1999): 42-51.

19. Stolfi, C., et al. The Dual Role of Smad7 in the Control of Cancer

Growth and Metastasis. Int J Mol Sci. 14.12 (2013): 23774-23790.

20. Giannelli, G., et al. Transforming growth factor-beta1 triggers hepatocellular carcinoma invasiveness via alpha3beta1 integrin. *Am J Pathol.* 161.1 (2002): 183-93.
21. Dondossola, E., et al. CD13-positive bone marrow-derived myeloid cells promote angiogenesis, tumor growth, and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110.51 (2013): 20717-20722.
22. Karnezis, T., et al. VEGF-D promotes tumor metastasis by regulating prostaglandins produced by the collecting lymphatic endothelium. *Cancer Cell.* 21.2 (2012): 181-195.
23. Yoshimura, T., et al. Monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 produced by stromal cells promotes lung metastasis of 4T1 murine breast cancer cells. *PLoS One.* 8.3 (2013): e58791.
24. Sui, P., et al. High expression of CXCR-2 correlates with lymph node metastasis and predicts unfavorable prognosis in resected esophageal

carcinoma. *Med Oncol.* 31.2 (2014): 809.

25. XIN, Z., et al. Clinical value of multi-slice 3-dimensional computed tomographic angiography in the preoperative assessment of meningioma.

*Exp Ther Med.* 6.2 (2013): 475-478.

26. XIN, Z., et al. Clinical value of multi-slice 3-dimensional computed tomographic angiography in the preoperative assessment of meningioma.

*Exp Ther Med.* 6.2 (2013): 475-478.

27. Jeong, J., et al. Preventive Effects of Zoledronic Acid on Bone Metastasis in Mice. *J Korean Med Sci.* 26 (2011): 1569-1575.

28. Ling, F., et al. MiR-93 enhances angiogenesis and metastasis by targeting LATS2. *Cell Cycle.* 11.23 (2012): 4352-4365.

29. Guo-Cai, Li., et al. TGF beta1 and related-Smads contribute to pulmonary metastasis of hepatocellular carcinoma in mice model. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 31.1 (2012): 93.



30. Asawa, Y., et al. Aptitude of Auricular and Nasoseptal Chondrocytes. *Tissue Eng Part A*. 15.5 (2009): 1109-1118.
31. Yamaoka, H., et al. Cartilage tissue engineering using human auricular. *J Biomed Mater Res A*. 78.1 (2006): 1-11.
32. Liu, G., et al. Selection of highly osteogenic and chondrogenic cells from bone marrow stromal cells in biocompatible polymer-coated plates. *J Biomed Mater Res A*. 92.4 (2010): 1273-1282.
33. Israel M, Barbash., et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*. 108.7 (2003): 863-868.
34. Zhang, F., et al. Ox-LDL Promotes Migration and Adhesion of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells via Regulation of MCP-1 Expression. *Mediators of Inflammation*. 691023 (2013): 1-11.
35. Mabuchi, Y., et al. LNGFR(+)THY-1(+)VCAM-1(hi+) Cells Reveal

Functionally Distinct Subpopulations in Mesenchymal Stem Cells. *Stem*

*Cell Reports*. 1. 2 (2013) 152–165.

36. Tokunou, T., et al. Engineering insulin-like growth factor-1 for local delivery. *FASEB J*. 22.6 (2008): 1886–1893.

37. Sica, A., et al. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. 122.3 (2012): 787–795.

38. Brodbeck, W., et al. Lymphocytes and the foreign body response: lymphocyte enhancement of macrophage adhesion and fusion. *J Biomed Mater Res A*. 74.2 (2005): 222–229.

## 図説

図 1： 再生軟骨組織の肉眼所見

EGFPトランスジェニックマウス耳介軟骨細胞とPLLA 足場素材からなる再生軟骨組織（移植時：上段）をC57/BL6 マウス皮下へ同系移植した（移植時：下段）。移植後 8 週、24 週に回収した再生軟骨組織の全体像（上段）と半割像（下段）。両者で特に違いは認められず、共に白色滑沢な組織が観察された。

Scale:1 mm。

図 2： 再生軟骨組織の組織学的評価

(TB) グリーンマウスへ移植された再生軟骨組織のトルイジンブルー染色。移植後 8 週、24 週ともに良好なメタクロマジーが認められた。(HE) 移植後 8 週、24 週の再生軟骨組織のHE 染色像。細胞の形状が円形で、基質の産生を認める成熟した軟骨領域が観察された。(490 nm) 490 nm の励起下で、軟骨領域に緑色蛍光を認めた。(EGFP) 再生軟骨組織のEGFP 免疫組織化学染色。

蛍光を示す細胞に一致して、EGFP陽性細胞が認められた。Scale:1 mm(弱拡大写真)、100  $\mu$ m(強拡大写真)。

### 図 3：主要臓器における軟骨細胞の局在検討

再生軟骨組織を移植したC57BL/6J マウスの移植前、移植後 8 週、24 週の各臓器のEGFP 免疫組織化学染色像。(グリーンマウス) 陽性対照群として用いたグリーンマウスのEGFP 免疫組織化学染色では、8 臓器において全ての細胞が陽性を示した。(移植前、移植後 8 週、24 週) 各臓器から非連続 10 切片を観察したところ、全ての臓器において、陽性細胞は見られなかった。

Scale:1 mm(弱拡大写真)、100  $\mu$ m(強拡大写真)。

### 図 4：再生軟骨領域の面積と領域数の測定

ヒト耳介軟骨細胞を播種したカバースリップを、BALB/cSlc-nu/nu (6 週齢、雄)背部へ皮下移植後、1 週、2 週、8 週、16 週で摘出し、トルイジンブル

一染色 (TB) および HE 染色 (HE) を行った。移植後経時的に、島状の再生軟骨が拡大し、最終的にはそれらが癒合して一連の再生軟骨を形成された。(島状軟骨領域の面積および島状軟骨領域数) 組織切片上における単位長さあたりの島状再生軟骨領域の面積と領域数。移植後 1 週から 16 週までの間、経時的に島状軟骨面積は増加したが、軟骨領域数はほぼ一定であった。Scale: 1 mm (0 週弱拡大写真)、100  $\mu$ m (1 週、2 週、8 週、16 週 TB、HE)。

#### 図 5 : 培養軟骨細胞に含まれる軟骨再生前駆細胞の検索

PKH 蛍光標識したヒト耳介軟骨細胞を、培養 0 日目から 6 日目まで flow cytometer で解析した。コントロール群 (標識無し) と比較し、PKH 蛍光標識したヒト耳介軟骨細胞では、経時的に蛍光強度は減弱し、ピークは鈍化しヒストグラムが扁平化した。マイトマイシン C 処理後に PKH 蛍光標識したヒト耳介軟骨細胞では、経時的に蛍光強度の減弱は認められず、ピークやヒストグラムにも変化は認められなかった。

#### 図 6：軟骨再生前駆細胞による軟骨再生の検証(in vitro)

PKH26 による蛍光標識を行って培養した軟骨細胞を、分裂速度の遅い細胞集団 (slow) と、早い細胞集団 (rapid) に分取し、3 次元包埋培養を用いて分化誘導を行った。培養 7 日後に、real time PCRによる I 型、II 型コラーゲン遺伝子発現 (*COL1A1*、*COL2A1*) を、培養 21 日後に、GAG の定量評価 (GAG) およびトリインブルー染色 (TB) を行った。分裂速度の速い細胞集団由来の再生軟骨 (rapid) では、GAG 量および II 型コラーゲンの発現量が有意に高く、TB 染色において、強いメタクロマジーを呈した。Scale: 1 mm。

#### 図 7：軟骨再生前駆細胞による軟骨再生の検証 (in vivo)

PKH26 による蛍光標識を行って培養した軟骨細胞を、分裂速度の遅い細胞集団 (slow) と、早い細胞集団 (rapid) に分取し、PLLA 足場素材へ播種して再生軟骨組織を作製し、BALB/cSlc-nu/nu (6 週齢、雄) 背部へ皮下移植した。

移植後 8 週で再生軟骨組織を摘出し、組織学的に観察したところ、rapid細胞群由来の再生軟骨では、TB染色において、メタクロマジー領域が増加していた。肉眼所見、HE染色では、両者に明らかな違いは観察されなかった。Scale: 1 mm (TB染色)、100  $\mu$ m (HE染色)。

#### 図 8 : 軟骨細胞を移植した周囲組織における各種因子の局在検討

グリーンマウス再生軟骨組織をBALB/cSlc-nu/nu (6 週齢、雄)へ移植後、1、2、8 週で周囲組織を含めて再生軟骨組織を摘出し、周囲組織における各種因子の局在を検討した。(COL1) I 型コラーゲンは移植後 1 週から 2 週、8 週と経過するに従い再生軟骨外周線維組織に密に局在するようになった。(COL2) II 型コラーゲンは 1 週では殆ど認められないが、2 週、8 週では再生軟骨と思われる組織に局在するようになった。(PCNA) PCNAの局在は、1 週、2 週では再生軟骨の他、周囲の線維組織においても顕著な局在を認め、8 週では減少傾向を示した。(EGFP) EGFPは、1 週から 8 週において軟骨と思われる領域

とその外周の軟骨膜に局在を認めた。(CD44、CD90)CD44、CD90 の局在を観察

したところ、8 週で再生軟骨の辺縁部分にCD90 陽性細胞が観察された。

Scale:100  $\mu$ m。

#### 図 9：軟骨細胞に関連する転写因子の局在検討

グリーンマウス再生軟骨組織をBALB/cSlc-nu/nu (6 週齢、雄)へ移植後、1、2、8 週で周囲組織を含めて再生軟骨組織を摘出し、軟骨細胞に関連する転写因子の局在を検討した。(SOX9)SOX9 は、1 週の再生軟骨領域において既に局在が認められ、2 週以降局在は減少傾向を示した。(MSX1、MSX2)MSX1、MSX2 については、2 週で軟骨膜に局在が観察された。(RUNX2)RUNX2 は、1、2、8 週で再生軟骨の辺縁部および軟骨膜部において局在が見られた。Scale:100  $\mu$ m。

#### 図 10：軟骨細胞分化に関する成長因子の局在検討



グリーンマウス再生軟骨組織をBALB/cSlc-nu/nu (6 週齢、雄)へ移植後、1、2、8 週で周囲組織を含めて再生軟骨組織を摘出し、軟骨細胞の分化に関する成長因子の局在を検討した。(TGF  $\beta$ ) TGF  $\beta$  は、2 週以降で再生軟骨組織内部の軟骨細胞に局在を認めた。(Ihh) Ihh は、1 週で多数の軟骨細胞に陽性を示し、2 週以降になると再生軟骨の辺縁に存在する小型の軟骨細胞ならびに再生軟骨周囲の細胞に局在を認めるようになった。一方、軟骨細胞の増殖を抑制し分化を促進する因子であるにおいても、1 週で再生軟骨領域の中央部に存在する軟骨細胞に陽性を示し、2 週以降は、再生軟骨の辺縁の小型細胞ならびに再生軟骨周囲の細胞に局在を認められた。(BMP2) BMP2 は 8 週で再生軟骨の辺縁の小型細胞ならびに再生軟骨周囲の細胞に局在を認めるようになった。マクロファージの局在は、1 週より再生軟骨の周囲に見られ、顆粒球コロニー刺激因子GCSFは、1 週から再生軟骨の細胞や周囲の細胞に局在が観察された(F4/80、GCSF)。Scale:100  $\mu$  m。

図 1 1 : 各部位へ移植を行ったヒト再生軟骨組織の肉眼所見

ヒト耳介軟骨細胞を播種したカバースリッパを、BALB/cヌードマウス（6週齢、雄）背部へ皮下移植および筋肉移植、頭蓋骨膜下移植、腹腔内移植を行った。Scale:10 mm。

図 1 2 : 各部位に移植したヒト再生軟骨組織の組織学的所見 I

ヒト耳介軟骨細胞を播種したカバースリッパを、BALB/cヌードマウス（6週齢、雄）背部へ皮下移植および筋肉移植、頭蓋骨膜下移植、腹腔内移植を行い、移植後 1、2、8 週で回収して、トルイジンブルー染色を行った。いずれの部位への移植でも再生軟骨の形成が観察された。腹腔内は他の 3 部位と比較して軟骨領域の面積が小さい傾向を認めた。Scale:1 mm。

図 1 3 : 各部位に移植したヒト再生軟骨組織の組織学的所見 II

ヒト耳介軟骨細胞を播種したカバースリッパを、BALB/cヌードマウス（6

週齡、雄) 背部へ皮下移植および筋肉移植、頭蓋骨膜下移植、腹腔内移植を行い、移植後 1、2、8 週で回収して、HE 染色を行った。背面皮下では、1 週の段階ですでに軟骨基質の産生を認め、軟骨細胞様の円形細胞も観察した。腹腔内移植と背面筋肉、頭蓋骨膜下でも、2 週以降で良好な軟骨基質産生が観察され、8 週にいくに従って基質産生は除々に増加傾向を示した。

Scale: 100  $\mu$ m。

#### 図 1 4 : 各部位に移植したヒト再生軟骨組織の免疫組織化学的所見 I

I 型コラーゲンは、いずれの部位においても 1 週では広く局在を観察したが、2 週以降、除々にその局在は減少傾向を示した。Scale: 100  $\mu$ m。

#### 図 1 5 : 各部位に移植したヒト再生軟骨組織の免疫組織化学的所見 II

II 型コラーゲンは、1、2 週から 4 部位いずれの再生軟骨領域において局在が認められ、2 週以降ではその局在は経時的にやや増加傾向にあった。

Scale:100  $\mu$ m。

#### 図 16：腹水上清を用いたヒト耳介軟骨細胞の培養

腹水上清を用いて培養したヒト耳介軟骨細胞において、Ⅰ型コラーゲンは移植後 1、2、8 週といずれの腹水においても発現が認められた。一方、Ⅱ型コラーゲンは移植後 1 週から 2 週にかけて発現上昇を認め、特に 2 週の腹水濃度が 0.1-1 %において、軟骨基質産生促進培地 (BIT) と同様に、コントロール群である健常免疫不全マウス腹水 (normal)、細胞なしカバースリップ移植群 (cell-) に対して有意に高い発現を認めた。移植後 8 週の腹水上清との共培養では、Ⅱ型コラーゲンの発現増強は観察されなかった。

#### 図 17：腹水中細胞とヒト耳介軟骨細胞との共培養

ヒト耳介軟骨細胞を腹水細胞と共培養した際、軟骨細胞におけるⅠ型コラーゲンは移植後 1-8 週の腹水細胞との共培養で常に発現が見られたが、いず

れにおいても細胞数が減少するに従い発現は上昇する傾向を示した。Ⅱ型コラーゲンは移植後 1 週、2 週における 1-5 万細胞数の共培養時に発現増強を認め、特に移植後 2 週における 1 万細胞数との共培養時に著明に高い発現を示した。移植後 8 週の腹水細胞との共培養では、Ⅱ型コラーゲンの発現増強は観察されなかった。

#### 図 1 8 : 成熟誘導因子の網羅的解析

軟骨細胞と腹水細胞との共培養後、Ⅱ型コラーゲンの遺伝子発現量が最も高かった 2 週のサンプルに関し、gene chipによる遺伝子発現の網羅的解析を行った。対照群には細胞なしカバースリップ移植群を用いた。その結果、対照群に対して有意に発現上昇が見られる遺伝子 10 個、発現低下が見られる遺伝子 26 個を同定した。

#### 図 1 9 : 成熟誘導因子の検証

分裂速度の早い細胞群 (rapid) と遅い細胞群 (slow) のヒト耳介軟骨細胞におけるIGFBP-4に関連する遺伝子の発現を検討した。Frz8 とLRP6 いずれも rapidの耳介軟骨細胞ほうがslowより有意に高い発現が確認された。