

論文の内容の要旨

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

鼻や顎関節などに存在する軟骨組織は、口腔・顎顔面の機能や審美性を担う重要な組織である。また、近年、顔面の耳介軟骨や鼻中隔軟骨が、気管や関節など他臓器の軟骨再建の細胞源として注目されている。これらの軟骨を量・質ともに高効率に再生・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。近年、この課題を解決するべく再生医療に対する期待が高まっている。しかし、現在臨床に導入されている軟骨再生組織は、移植前には軟骨基質が蓄積されていない未熟な組織に過ぎない。すなわち、現在の再生医療は移植後に生体内の修復力・再生力が働いて組織成熟を図るものである。このため、修復できる欠損の範囲が極めて限定される上に、未解明の生体内成熟作用を活用しているため移植後の成績が安定しない懸念が残る。本研究の目的は、生体内で再生組織を構成する再生前駆細胞を同定して選別するとともに、生体内の修復力・再生力のメカニズムを明らかにし、両者を活用して軟骨再生組織の移植前成熟を実現し、再生組織の特性を飛躍的に向上させることである。

まず、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。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が全ての臓器において、陽性細胞は見られなかった。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。

ついで、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。これらの再生軟骨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。

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 で蛍光標識し、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。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。

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、分裂速度の速い細胞集団（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 II 型コラーゲン遺伝子発現や 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 II 型コラーゲン遺伝子の発現は、分裂速度の遅い群にくらべ、速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速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

度の速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。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トルイジンブルー染色を行い、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。

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。軟骨の増殖、基質産生に関与する $\text{TGF } \beta$ 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。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。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。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。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、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 *G-CSF* 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。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。腹腔内移植で、再生軟骨の形成が観察された。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、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。腹水細胞との共培養においても、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。そのため、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、IGFBP4 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、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。心筋では、IGFBP4 は Frz8 や LRP6 というウィント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、IGFBP4 はウィント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。

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、この両者を活用して軟骨再生組織の移植前成熟を実現し、再生組織の特性を飛躍的に向上させたいと考えている。