

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

骨関節分野 関節疾患の原因解明及び発症の予防・治療方法

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 鈴木 登

平成 15 (2003) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	1
主任研究者 鈴木 登	
II. 分担研究報告	
1. 高齢者関節疾患におけるヒト Th1 細胞特異的転写因子 Txk の発現の検討と Txk を用いた新規治療法の開発	9
聖マリアンナ医大 免疫学・病害動物学 鈴木 登	
2. マウス胚性幹細胞からの軟骨細胞の分化誘導と軟骨細胞を用いた新規治療法の開発	15
聖マリアンナ医大 免疫学・病害動物学 鈴木 登	
3. コラーゲン誘発性関節炎マウスに対する JunD 遺伝子療法	21
聖マリアンナ医大 免疫学・病害動物学 鈴木 登	
4. $\beta 1$ インテグリン下流シグナル分子 Crk-associated substrate lymphocyte type(Cas-L) の関節リウマチの病態における役割について	27
東京大学医科学研究所 森本幾夫	
5. 自己抗原 RO52 の T 細胞のアポトーシスにおける役割について	34
東京大学医科学研究所 田中廣尋	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	40
IV. 平成 14 年度班員名簿	44

I. 総括研究報告

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

骨関節分野 関節疾患の原因の解明及び発症の予防・治療方法
(H12-長寿-031)

主任研究者 鈴木 登 聖マリアンナ医科大学免疫学・病害動物学・教授

研究要旨

本格的な長寿・高齢化社会を迎えた本邦においては、高齢者の快適な生活を維持・増進できる施策が望まれている。多発関節痛・関節炎をもたらす関節リウマチ(RA)や変形性関節症(OA)などの関節疾患は高齢者の日常的な活動性を低下させ、介護の必要度を増加させる。高齢者の関節疾患の原因解明と予防・治療法の開発は高齢者の生活の質の改善と高齢者社会の活性化に必須である。

RAではヘルパーT(Th)細胞が関節滑膜に浸潤して発症に関与する。関節炎の発症にはTh1型細胞とTh2型細胞とのアンバランスが存在しその病態を形成する。コラーゲン関節炎ではTh2型細胞の機能過剰により抗コラーゲン自己抗体が産生され関節炎発症に至る。我々の同定したTxkはTh1細胞特異的な転写因子で、txk発現ベクターの遺伝子投与は関節炎マウスのTh1/Th2バランスの是正により関節炎の軽快に働いた。同様にヒト滑膜細胞の活性化の抑制に働くjunD遺伝子の投与は転写因子AP-1の活性を抑制することでモデル動物での関節炎鎮静化に働いた。今後、高齢者関節炎においてjunDやtxk強制発現が実際に治療効果を持つのかを検討する必要がある。

β 1インテグリンシグナル分子であるCas-LのRAでの役割を検討した。関節炎マウスにおいてCas-L蛋白発現とそのチロシンリン酸化がともに亢進していた。Cas-L陽性リンパ球は関節炎を生じたマウスの関節のみならずRA患者においてもCas-L陽性リンパ球は炎症関節に多数が浸潤していた。Cas-LはRAの炎症細胞浸潤に重要な役割を果たしていることが示された。

R052/SS-A自己抗原に対する自己抗体はRAやシェーグレン症候群患者血清中に特徴的に同定される。このR052/SS-A抗原が生体内で果たす役割について検討を行った。R052/SS-A抗原はDISC(Death Induced Signal Complex)でのカスパー8の活性化に関与し、アポトーシス誘導に重要な役割を果たしていた。このようにR052はアポトーシスにも繋がるシグナル経路の新しい構成成分であるという結果は、高齢者の自己免疫病の病態解明や新しい治療法開発のために重要である。

マウス胚性幹細胞からbone morphogenetic proteinを用いて軟骨細胞を分化誘導することができる。変形性関節症マウス膝関節に軟骨細胞を移植すると、膝関節内に移植軟骨細胞が生着した。大腿骨欠損部にこの軟骨細胞を移植すると骨形成が認められた。今後ES細胞から分化誘導した軟骨細胞を用いて高齢者関節障害に対する再生医療の検討が可能になった。

分担研究者

森本 幾夫

東京大学医科学研究所・教授

田中 廣壽

東京大学医科学研究所・助教授

研究目的

本邦では本格的な長寿・高齢化社会を迎え、高齢者の快適な生活を維持・増進できる施策が望まれている。多発関節痛・関節炎をもたらすRAやOAなどの関節疾患は高齢者の日常的な活動性を低下させ、介護の必要度を増加させる。高齢者の関節疾患の原因解明と予防・治療法の開発は難治性疼痛の緩和につながり、高齢者の生活の質の改善と高齢者社会の活性化に必須である。

これまでの内科的治療ではRAのみならずOAにおいても関節病変は確実に進行する。本研究ではこれらを克服するために新たな治療的アプローチを確立し、さらに各種薬剤でRA、OAの治療法の確立をめざす。

RAでは免疫異常として関節に浸潤するヘルパーTリンパ球が特徴的である。ヘルパーT細胞は、産生するサイトカインの種類によってTh1型とTh2型に分類される。Th1細胞はインターロイキン(IL)-2、腫瘍壊死因子(TNF)- β 、インターフェロン(IFN)- γ などを産生し、細胞性免疫に関わる。一方、Th2細胞はIL-4、IL-5、IL-10、IL-13などを産生しB細胞の抗体産生をもたらす。Th1/Th2細胞は、それぞれのサブセットの細胞が産生するサイトカインにより互いの活性を制御し合いながら生体の免疫応答のバランスを取るように働く。Th1/Th2細胞のバランスの崩れが

RAをはじめ自己免疫性疾患の発症や病態形成に関与する。新規治療法の開発のためには、Th1/Th2細胞の分化を制御する機構を明らかにすることが重要であり、我々はこのTh1/Th2細胞の分化に重要な鍵を持つTxkに着目し研究を続けている。TxkはTec familyチロシンリン酸化酵素の一つで主にTリンパ球に発現する。ヒトTh1、Th0細胞に特異的に発現し、IFN- γ の産生を誘導し、Th1細胞の機能発現に重要な転写因子として働く。

昨年度にTxkの発現を抑制する目的でドミナントネガティブTxkの作製を行った。本年度は関節炎モデル動物としてコラーゲン誘発関節炎を作成しTxk発現ベクター投与の治療応用の可能性を検討した。この遺伝子治療はRAの慢性化を阻止できる最も有望な治療法と期待される。

高齢者における関節疾患では関節軟骨に異常をきたす場合が大多数で、外科的治療法を除けば、臨床的にはこれら軟骨の異常に対する有効な治療法はないといっても過言ではない。実際、高齢者関節病変の治療には難渋するケースが多い。さらに近年の再生医学・医療の進展に伴い、再生医療の骨・関節疾患での応用を目指して、マウス胚性幹細胞より軟骨細胞を分化誘導した後、これを変形性関節炎のモデル動物に投与し、その生着と治療効果を検討する。

RA滑膜細胞では転写因子の発現に異常があり、AP-1過剰活性化がRA病態の進行、悪化に関与する。JunDがヒト滑膜細胞においてAP-1過剰活性化を抑制できることを報告した。本年度はコラーゲン関節炎モデルマウスを用いてJunD発現の是正が関節病変の沈静化に

結びつくのかを検討する。これら転写因子の異常活性化機構を解明し、転写因子活性を効率よく抑制する手法を開発する。

R052/SS-A 自己抗原に対する自己抗体は関節リウマチやシェーグレン症候群患者血清中に特徴的に同定される。この R052/SS-A 抗原が生体内で果たす役割については全く分かっていない。そこで RA やシェーグレン症候群患者のアポトーシス異常に R052/SS-A 抗原が果たす役割について検討を行なう。 β_1 インテグリン下流のシグナル分子であり、T 細胞の活性化に続く IL-2 産生および細胞遊走能に重要な Crk-associated substrate lymphocyte type (Cas-L) の RA での病態なかでも炎症細胞浸潤における意義を明らかにする。

本研究では高齢者 RA と OA を対象に関節局所での免疫異常の解析および滑膜細胞増殖異常に関わる転写因子の解析を行なう。その知見に基づいてそれらの是正方法の確立を目指して研究を進める。さらに最近の再生医学の進歩にも配慮した研究を行う。

研究方法

1. マウス胚性幹細胞からの軟骨細胞の分化誘導と軟骨細胞を用いた新規治療法の開発

マウス ES 細胞は胎児線維芽細胞と leukemia inhibitory factor (LIF) と共培養することで多分化能を維持したまま継代できる。この ES 細胞をグラチンコートディッシュ、あるいはフィブロネクチンコートディッシュ上で様々な濃度の BMP-2、BMP-4 とともに培養した。軟骨細胞を特異的に染色するアルシアンブルー染色は常法に従って行った。II 型 collagen の蛋白発現は免疫組織染色を行った。

変形性関節症のモデルとして、膝関節内へ 1 規定塩酸 10 μ l を注入した。注入後 3-7 日目に膝関節を回収し、組織学的に検討した。更に、一部の実験では ES 細胞より分化誘導した軟骨細胞 1×10^6 個を関節内に移植した。移植後 2 週間後、同様に組織学的検討を行った。

マウス大腿骨にドリルを用いて直径 1 mm の骨欠損部を作成した。ここに ES 細胞より分化誘導した軟骨細胞 1×10^6 個を移植し、経時的に X 線写真を撮影した。

2. 高齢者関節疾患におけるヒト Th1 細胞特異的転写因子 Txk の発現の検討と Txk を用いた新規治療法の開発

野生型 Txk 発現ベクターを鋳型として突然変異体を作成した。それぞれの突然変異について目的とする変異がプライマーの中央に位置するようにデザインしたプライマー一組(センス鎖とアンチセンス鎖)と Pfu Turbo DNA ポリメラーゼを用いて Txk 発現ベクターを増幅した。増幅した産物を DpnI 制限酵素で処理し、鋳型とした野生型 Txk 発現ベクターを完全消化し、目的とする変異型ベクターを回収した。目的とする突然変異がベクターに導入されたことは DNA シークエンス解析から確認した。

DBA1J(6 週令雌)に牛 II 型コラーゲン 100 μ g を完全フロイトアジュバントとともに尾根部皮内に投与し、3 週後に同様の追加免疫を行い、コラーゲン誘発性関節炎モデルマウスを作成した。コラーゲン誘発性関節炎モデルマウス作成過程の免疫前後、すなわち免疫前 24 時間、免疫後 24 時間および 72 時間に 20 μ g の野生型 txk 発現ベクターあるいはドミナントネガティブ Txk 発現ベ

クターを筋肉内投与した。

四肢関節の腫脹を肉眼的に計測し関節炎を評価した。各肢ごと全く変化のないものを0点とし、1指の腫脹を1点、2指以上の腫脹あるいは足全体の僅かな浮腫を2点、足全体の激しい腫脹を3点と評価し、四肢関節の点数の合計(12点満点)を関節炎スコアとした。

3. コラーゲン誘発性関節炎マウスに対する JunD 遺伝子療法への検討

コラーゲン誘発性関節炎モデルマウス作成過程の免疫前後、すなわち免疫前24時間、免疫後24時間および72時間に20 μ gのpRSV-CATあるいはpRSV-junDを筋肉内投与した。その他は上記と同様の方法を用いた。

β_1 インテグリンを始めとする細胞表面分子の発現はマウス脾細胞を蛍光ラベル抗体で免疫染色後、フローサイトメーターにより陽性細胞率を解析した。

4. 自己抗原R052のT細胞のアポトーシスにおける役割

R052のN末端のGFPタグ型をPCR法にて作成した。Large Tを発現するJurkat LT細胞へのトランスフェクションはX-tream GENE Q2トランスフェクション試薬にて行った。

アポトーシスの評価のためにフォスファチジルセリンの細胞外露出を検討した。T細胞へのPE標識Annexin Vの結合をFACSキャリバーにて解析した。FAS抗体刺激によるCaspase-3、Caspase-8、Caspase-9、Bcl-2、Bcl-XL、cytochrome-C、Bid、Baxの発現はウエスタンブロット法にて解析した。

5. β_1 インテグリン下流シグナル分子 Cas-L の関節リウマチの病態における役割

HTLV-I Tax transgenic mouse および対照群として Littermate Control マウ

ス (Ct) を各群3匹ずつ用いた。

細胞遊走能は各群のマウスより脾細胞を分離し、マウス内皮細胞を単層に撒いたケモタキシスチャンバーに無刺激下で遊走した細胞数を測定した。

蛋白質発現及びチロシンリン酸化は各群のマウスより脾細胞、脾臓、リンパ節、胸腺を採取しライセートを作製後、免疫沈降に続くウエスタンブロット法により解析した。

6. 倫理面での配慮

血液、関節液、滑膜組織を含む生体サンプルの実験について患者には研究目的や趣旨を十分説明し、インフォームドコンセントを得た上で行った。さらに患者のプライバシーに関する情報の守秘義務を徹底するため個々の研究者は検体とID番号のみを用いて解析し、患者のプライバシーに関する情報が守られるように注意した。動物実験に関しては、実験前の飼育、実験中、実験後にいたるまで科学的かつ倫理的に対処し、動物の苦痛を排除するための麻酔による安楽死等の手法を用いた。

研究成果および考案

1. マウス胚性幹細胞からの軟骨細胞の分化誘導と軟骨細胞を用いた新規治療法の開発

マウスのES細胞株をbone morphogenetic protein (BMP)-2あるいはBMP-4を添加し、28日間培養した。培養2週間目のEBでは、軟骨細胞に特異的と考えられるアルシアンブルー陽性領域が出現した。それ以降培養を継続することで、EBのアルシアンブルー陽性領域は増大した。この細胞はII型コラーゲン陽性で軟骨細胞と考えられた。

C57BL/6マウスの膝関節内に1規定の塩酸を注入し変形性関節症モデルとし

た。ES 細胞から分化誘導した軟骨細胞を用いて変形性膝関節症モデルマウスの治療研究を行った。塩酸注入によりマウス膝関節は軟骨の脱落した状態になっていた。これに軟骨細胞 1×10^6 個を移入した。移植後 2 週めに関節を回収し、脱灰後 HE 染色を行った。一部の実験では軟骨細胞をコロイド鉄で標識した。移植後には関節面に Berlin Blue 染色陽性の鉄を取り込んだ軟骨細胞の生着を認めた。移入した軟骨細胞は大腿骨関節面や膝蓋部に生着していた。長期間観察した場合にも異所性化骨を認めることはなかった。

マウス大腿骨にドリルを用いて直径 1 mm の骨欠損部を作成した後ここに ES 細胞より分化誘導した軟骨細胞を移植した。PBS のみを移植したマウスと比較し、軟骨細胞移植群では明らかな骨形成を X 線写真上で認めた。

従来の内科的治療では効果が期待できない進行した破壊性の関節病変に対する新たな治療法の開発を目的として、ES 細胞から効率よく軟骨細胞を分化誘導する方法を確立した。これを変形性膝関節症モデルマウスに移植し関節面に生着することが明らかになった。さらにこの軟骨細胞は骨欠損部では骨形成を認めた。関節内では長期間にわたり骨形成は認められないことから、今後この差異をもたらす要因についての検討が必要である。

マウス ES 細胞から BMP 存在下に軟骨細胞を特異的に分化誘導することが可能になった。これを変形性関節症のモデルマウスに移植したところ関節面に移植した軟骨細胞を生着させることが出来、近い将来の変形性関節症の治療に応用可能と考えられた。今後は、より大型の実験動物を用いて関節機能の

検討を行うことが必要と考えられた。

2. 高齢者関節疾患におけるヒト Th1 細胞特異的転写因子 Txk の発現の検討と Txk を用いた新規治療法の開発

マウス関節炎の発症をいずれかの関節の腫脹が初めて観察された時点と定義した。II 型コラーゲンの免疫のみでプラスミドを投与しないコントロール群のマウスでは、最終免疫より 1 週目より関節炎の発症が 100%に観察された。コントロールプラスミド pRSV-CAT 投与群の発症率も同様で 1 週目より関節炎の発症が 100%に観察された。野生型 txk 投与群の発症率は 1 週目で 83%、4 週目で 83%で、野生型 txk 遺伝子の投与により関節炎の発症はやや低下した印象があるものの有意な影響とはいえなかった。関節炎スコアを経時的に観察すると、コントロールプラスミド投与群は 1 週目以降プラスミド非投与群とほぼ同等の関節炎スコアを示した。これに対して、野生型 txk 投与群は 1 週目以降、コントロールプラスミド投与群およびプラスミド非投与群より有意に低いスコアを示した。

今回の II 型コラーゲン関節炎モデルマウスにおいては野生型 Txk 遺伝子投与が関節炎の改善をもたらした。II 型コラーゲン関節炎では Th2 細胞による抗 II 型コラーゲン自己抗体がその病態形成に重要なことが知られている。即ち II 型コラーゲン関節炎モデルマウスは Th2 細胞機能過剰と理解することができる。このような関節炎マウスに対して Th1 細胞機能を増強する野生型の txk 遺伝子投与は著明な関節炎の抑制作用を示した。即ち Th2 細胞機能過剰に基づく関節炎には txk 投与により Th1 細胞機能を是正することが有望な治療法となることが明らかになった。

3. コラーゲン誘発性関節炎マウスに対する JunD 遺伝子療法

II 型コラーゲンの免疫のみでプラスミドを投与しないコントロール群のマウスでは、初回免疫より 7 週目より関節炎の発症が観察され 10 週目で 83%、13 週目で 100%に達した。コントロールプラスミド投与群の発症率は 10 週目で 91%、13 週で 100%であった。junD 遺伝子投与群の発症率は 10 週目で 80%、13 週で 90%で、junD 遺伝子の投与により関節炎の発症はやや低下した印象があるものの有意な影響は与えなかった。関節炎スコアを経時的に観察すると、コントロールプラスミド投与群は 7 週目以降、コントロール群(プラスミド非投与群)と比べ、関節炎スコアが有意に高かった。これに対して、junD 遺伝子投与群は 7 週目以降、コントロールプラスミド投与群より有意に低いスコアを示し、13 週目以降はコントロール群よりも有意に低いスコアであった。組織学的に関節病変部を観察するとコントロール群、コントロールプラスミド投与群と比較して junD 遺伝子投与群では単核細胞浸潤も比較的穏やかであった。さらに滑膜細胞増殖、骨・軟骨破壊ともに軽微であった。さらに免疫組織染色では滑膜細胞における IL-1 アルファと TNF ベータの発現は強く抑制されていた。

今回の検討により、JunD 遺伝子治療がコラーゲン誘発性関節炎マウスの関節病変に改善をもたらすことが明らかになった。AP-1 は免疫担当細胞の活性化機序にも関与することから、免疫系への影響も血清中 IgG 型抗 II 型コラーゲン抗体の力価を指標として解析した。しかし JunD 遺伝子投与の免疫系への影響は認められなかった。即ち投与した

JunD 遺伝子は病変局所の滑膜細胞に取り込まれ、直接的に滑膜細胞の機能を制御しているものと考えられた。

4. RA やシェーグレン症候群患者の T リンパ球活性化異常に Ro52/SS-A 抗原が果たす役割の検討

自己抗原 Ro52 がアポトーシスに関与しているかどうか調べるため、様々なアポトーシス刺激後の Annexin V の細胞表面への結合を検討した。Fas 抗体刺激、抗 CD3 抗体刺激や γ -ラディエーション照射では Ro52 の過剰発現は T 細胞のアポトーシスへの感受性を増加させた。さらに Ro52 の過剰発現下ではカスパー 8 の活性化フォームが Fas 抗体刺激後早期から検出された。カスパー 8 の活性化はカスパーの活性化経路の最も上流に位置するので、これらの成績は Ro52 がカスパー 8 の活性化フォームの産生に関与していることを示唆した。そこで Fas 抗体で Fas を免疫沈降させ、その沈降物からのカスパー 8 の活性化フォームについて検討した。DISC (Death Induced Signal Complex) 中のカスパー 8 が切断された中間フォームは Ro52 の存在下ではより早期から検出された。即ち Ro52 は DISC でのカスパー 8 の活性化に関与していた。以上から Ro52/SS-A 分子は T 細胞のアポトーシス誘導に関与していることが明らかになった。

Ro52/SS-A を強発現した T 細胞は IL-2 産生も亢進することから Ro52/SS-A を強発現した T 細胞は局所に浸潤し、IL-2 や IFN- γ などの Th1 型サイトカインを産生し、さらにアポトーシスに陥り、Ro52/SS-A 抗原が血清中に放出される。また上皮細胞の障害が生じて、MHC class II の発現を高め、またアポトーシスにより細胞外に出た

SS-A/Ro52 が CD4T 細胞に抗原提示され、最終的に Th2 型サイトカインや炎症性サイトカインなどが産生され、自己抗体の SS-A/Ro52 抗体が産生されるものと考えられた。

このように Ro52/SS-A の構造と機能の関係を解析することにより自己免疫病の病態を理解することが可能になり、老化に伴う関節炎・自己免疫疾患の新しい治療法の開発が可能と思われる。

5. β_1 インテグリン下流シグナル分子 Cas-L の関節リウマチの病態における役割

ここではリウマチモデルマウスの Tax transgenic mouse を用いて脾細胞遊走能、脾臓、リンパ節における Cas-L 発現およびチロシンリン酸化、関節における Cas-L 発現を検討した。関節炎発症前及び関節炎発症後において脾細胞遊走能の亢進、Cas-L 蛋白質の発現及びチロシンリン酸化の亢進を認めた。Cas-L 蛋白質の発現が亢進した理由として、臓器へのリンパ球浸潤による可能性が考えられたが、関節炎を発症したマウスにおいて Cas-L mRNA 発現が亢進していたことから、単一細胞レベルで Cas-L 発現が亢進していたと考えられる。 β_1 インテグリンを始めとする接着分子の発現及び T 細胞マーカーの発現は炎症の有無に関わりなく変化が認められなかったことから Cas-L の発現亢進が関節炎の発症及び炎症反応の遷延に関与したと考えられる。

Cas-L 蛋白質は β_1 インテグリンから FAK または Src family チロシンキナーゼよりチロシンリン酸化を受けて下流へシグナルを伝達する。関節炎を発症したマウスでは Cas-L 蛋白質のチロシンリン酸化が認められ、これは主として Src family チロシンキナーゼにより

チロシンリン酸化を受けたと考えられた。関節炎症部位における Cas-L 蛋白質発現を検討した結果、浸潤した全ての細胞が Cas-L 陽性細胞ではなく、むしろ小結節性集簇が認められる部分や関節腔と思われる部位に浸潤した細胞で特に Cas-L 陽性反応が認められたことから炎症部位への細胞浸潤に Cas-L が重要であると考えられた。

関節リウマチの滑膜における Cas-L 蛋白質の発現を検討した結果、滑膜に浸潤した CD3 陽性 T 細胞に Cas-L 蛋白質の発現が認められた。このことから、ヒトにおいても Cas-L 蛋白質は RA において関節部位への細胞浸潤や炎症の増悪、遷延に関与していると考えられた。今後 Cas-L 遺伝子アンチセンスの治療効果の検討、また野生型及びドミナントネガティブ Cas-L 遺伝子トランスジェニックマウスや Cas-L 遺伝子ノックアウトマウスの解析等の更なる検討を行い、RA の病因、病態を解明するのみならず、Cas-L 分子に基づく新しい治療法、治療薬の開発等臨床応用を検討する。

本年度の研究成果を要約すると次のとおりである。

コラーゲン関節炎を junD と Txk の過剰発現は抑制することができた。今後 junD や txk 発現の調節がヒトにおいても関節炎の治療に応用できるのかを検討する必要がある。

R052/SS-A 自己抗原に対する自己抗体は RA やシェーグレン症候群患者血清中に特徴的に同定される。R052/SS-A 抗原は T リンパ球のアポトーシスのシグナル経路の新しい構成成分であり高齢者免疫異常の解明に重要な分子と考えられた。

マウス胚性幹細胞から BMP を用いて

軟骨細胞を分化誘導し軟骨細胞移植を行なった。その結果、膝関節内での移植軟骨細胞の生着と骨形成能が確認できた。今後の軟骨細胞を用いて高齢者関節障害に対する再生医療の検討を行う。

Cas-L は RA の関節滑膜への炎症細胞の浸潤に重要と考えられた。CasL を介する T 細胞のシグナル伝達機構を修飾することで RA の新しい治療薬の開発が可能と考えられた。

II. 分 担 研 究 報 告

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

高齢者関節疾患におけるヒト Th1 細胞特異的転写因子 Txk の発現の検討と
Txk を用いた新規治療法の開発

主任研究者 鈴木 登（聖マリアンナ医大 免疫学・病害動物学）

高齢者における関節リウマチ(RA)や変形性関節症(OA)などの関節疾患の原因解明と予防・治療法の開発を目指してヒト Th1 細胞特異的転写因子 Txk の発現を検討した。これまでに RA 滑膜浸潤リンパ球では IFN- γ の産生と Txk の発現亢進を認め、疾患対照として検討した OA 滑膜では IFN- γ の産生も Txk の発現も認められなかった。RA 滑膜浸潤リンパ球 Txk の発現亢進を是正する目的で、ドミナントネガティブ Txk 発現ベクターを作成した。本年度はドミナントネガティブ Txk 発現ベクターの関節炎への影響を実験動物で検討した。ドミナントネガティブ Txk 発現ベクター投与では関節炎は改善を認めなかった。一方、コラーゲン関節炎マウスでは野生型 Txk 発現ベクター投与で関節炎は軽快した。今回の検討ではコラーゲン関節炎マウスはむしろ抗コラーゲン自己抗体産生に基づく Th2 疾患であり、このような患者においては Th1 細胞細胞を誘導する野生型 Txk 発現ベクター投与が関節炎の治療に応用できることを示している。

A. 研究目的

本格的な長寿・高齢化社会を迎えた本邦においては、高齢者の快適な生活を維持・増進できる施策が望まれている。多発関節痛・関節炎をもたらす RA や OA などの関節疾患は高齢者の日常的な活動性を低下させ、介護の必要度を増加させる。高齢者の関節疾患の原因解明と予防・治療法の開発は難治性疼痛の緩和につながり、高齢者の生活の質の改善と高齢者社会の活性化に必須である。

これまでの内科的治療では RA のみならず OA においても関節病変は確実に進行する。本研究ではこれらを克服するために新たな治療的アプローチを確立し、さらに各種薬剤で RA、OA の治療法の確立をめざす。RA では免疫異常として関節に浸潤する Th1 リンパ球が特徴的である。

ヘルパーT細胞は、産生するサイトカインの種類によって Th1 型と Th2 型に分類される。Th1 細胞はインターロイキン(IL)-2、腫瘍壊死因子(TNF)- β 、インターフェロン

(IFN)- γ などを産生することでマクロファージを活性化し、細胞傷害性リンパ球を誘導し、おもに細胞性免疫に関わる。これに対し、Th2細胞はIL-4、IL-5、IL-10、IL-13などを産生しB細胞の増殖と分化を誘導し、抗体産生をもたらす。Th1/Th2細胞は、それぞれのサブセットの細胞が産生するサイトカインにより互いの活性を制御し合いながら生体の免疫応答のバランスを取るように働く。

Th1/Th2細胞のバランスの崩れが様々な感染症、自己免疫性疾患やアレルギー疾患の発症や病態形成に関与している。例えば、代表的なヒトの全身性自己免疫疾患であるRAは関節滑膜を病変の主座とする慢性疾患である。そのためには、Th1/Th2細胞の分化を制御する機構を明らかにすることが重要であり、主任研究者はこのTh1/Th2細胞の分化に重要な鍵を持つTxkに着目し研究を続けている。

Txkは、itk、Rlk、Btk、Bmxなどが属するTec familyチロシンリン酸化酵素の一つで

主に T リンパ球に発現する。ヒト Th1、Th0 細胞に特異的に発現し、IFN- γ の産生を誘導し、Th1 細胞の機能発現に重要な役割な転写因子として働く。

昨年度に Txk の発現を抑制する目的でドミナントネガティブ Txk の作製を行った。本年度は関節炎モデル動物としてコラーゲン誘発関節炎を作成し Txk 発現ベクター投与の治療応用の可能性を検討した。

B.研究方法

(1)ドミナントネガティブ Txk ベクターの作成

野生型 Txk 発現ベクターを鋳型として以下に示す突然変異体を作成した。それぞれの突然変異について、目的とする変異がプライマーの中央に位置するようにデザインしたプライマー一組（センス鎖とアンチセンス鎖）と PfuTurbo DNA ポリメラーゼを用いて Txk 発現ベクターを増幅した。増幅した産物を DpnI 制限酵素で処理し、鋳型とした野生型 Txk 発現ベクターを完全消化し、目的とする変異型ベクターを回収した。目的とする突然変異がベクターに導入されたことは DNA シークエンス解析から確認した。

(2)コラーゲン誘発性関節炎モデルマウスの作成：DBA1J(6週令雌)に牛 II 型コラーゲン 100mg を完全フロイトアジュバントとともに尾根部皮内に投与し、3 週後に同様の追加免疫を行い、関節炎を誘導した。

(3)txk 遺伝子治療：コラーゲン誘発性関節炎モデルマウス作成過程の免疫前後、すなわち免疫前 24 時間、免疫後 24 時間および 72 時間に 20mg の野生型 txk 発現ベクターあるいはドミナントネガティブ Txk 発現ベクターを筋肉内投与した。

④関節炎の評価：四肢関節の腫脹を肉眼的に評価した。各肢ごと全く変化のないものを 0 点とし、1 指の腫脹を 1 点、2 指以上の腫脹あるいは足全体の僅かな浮腫を 2 点、足全体の激しい腫脹を 3 点と評価し、四肢関節の点数の合計（12 点満点）を関節炎スコアとした。

(4)倫理面の配慮

血液などの生体サンプルを用いた実験については正常供血者に研究目的や趣旨を良く説明し、インフォームドコンセントを得た上で行なった。個人のプライバシーに関する情報の守秘義務を徹底するため、個々の研究者は検体と標識番号のみを用いて解析し、プライバシーに関する情報が守られるように注意した。動物実験に関しては、実験前の飼育、実験中、実験後に至るまで科学的かつ倫理的に対処し、動物の苦痛を排除するための麻酔による安楽死等の方法を用いた。

C.研究結果

(1)ドミナントネガティブ Txk の作成

Jurkat 細胞に IFN- γ プロモーター+ルシフェラーゼプラスミドと共に、野生型や種々の変異体 Txk を導入した。マイトゲンである PHA 刺激後に誘導されるルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、txk-K299E は内因性の Txk 活性を抑制できることが明らかになった。同様に txk-K299E は IFN- γ 産生を抑制した。

(2) txk 遺伝子投与のマウス関節炎の発症率に与える影響：いずれかの関節の腫脹が初めて観察された時点を発症と定義した。II 型コラーゲンの免疫のみでプラスミドを投与しないコントロール群のマウスでは、最終免疫より 1 週目より関節炎の発症が 100%に観察された。コントロールプラスミド pRSV-cat 投与群の発症率も同様に 1 週目より関節炎の発症が 100%に観察された。野生型 txk 投与群の発症率は 1 週目で 83%、4 週目で 83% で、野生型 txk 遺伝子の投与により関節炎の発症はやや低下した印象があるものの有意な影響とはいえなかった。

(3)txk 遺伝子投与のマウス関節炎スコアに及ぼす影響：関節炎スコアを経時的に観察すると、コントロールプラスミド(pRSV-cat)投与群は 1 週目以降コントロール群(プラスミド非投与群)とほぼ同等の関節炎スコアを示した(図 1)。これに対して、野生型 txk 投与群は 1 週目以降、コントロールプラスミド(pRSV-cat)投与群およびプラスミド非投与群より有意に低いスコアを示した。

D. 考察

免疫応答の中核に位置する T 細胞の中でも、特にヘルパーT細胞は免疫応答の調節に重要な役割を果たしている。Th1 細胞は細胞性免疫に関わり、一方 Th2 細胞は抗体産生に代表される液性免疫を担う。Th1 細胞と Th2 細胞は相互に調節しあいながら生体の免疫応答を調節する。一方、RA をはじめ自己免疫疾患において Th1/Th2 バランスの偏りが認められており、疾患の発症や病態形成に大きく関与している。

この Th1/Th2 細胞のバランスの崩れが様々な疾患の原因となっており、RA では Th1 細胞の過剰な活性化によって病態が形成される。Txk は Tec family チロシンキナーゼの一つで、Th0, Th1 細胞に特異的に発現し、Th1 サイトカインである IFN- γ の産生を選択的に調節し、Th1 細胞特異的転写因子として働く。

今回の II 型コラーゲン関節炎モデルマウスにおいては野生型 Txk 遺伝子投与が関節炎の改善をもたらした。II 型コラーゲン関節炎では Th2 細胞による抗 II 型コラーゲン自己抗体がその病態形成に重要なことが知られている。即ち II 型コラーゲン関節炎モデルマウスは Th2 細胞機能過剰と理解することができる。このような関節炎マウスに対して Th1 細胞機能を増強する野生型の txk 遺伝子投与は著明な関節炎の抑制作用を示した。一方、ドミナントネガティブ Txk 発現ベクターの投与は関節炎の発症率および重症度に対して有意な影響を与えなかった。即ち Th2 細胞機能過剰に基づく関節炎には txk 投与により Th1 細胞機能を是正することが有望な治療法となることが明らかになった。

E. 結論

関節炎のモデル動物において野生型 Txk 遺伝子の投与により抗原非特異的な様式で Th1/Th2 バランスを是正し、関節炎の治療効果を示すことが示された。今後、ヒト関節炎での応用に向けた研究を行う必要がある。

F. 健康危機情報

特記事項なし

G. 研究発表

英文原著 (original)

1. Kasiwakura J, Suzuki N, Takeno M, Itoh S, Oku T, Sakane T, Nakajin S, Toyosima S: Evidence of auto phosphorylation in Txk:Y91 is auto phosphorylation site. Biol Pharm Bull 25(6); 718-721, 2002.
2. Takeba Y, Nagafuti H, Takeno M, Kasiwakura J, Suzuki N: Txk, a member of non-receptor tyrosine kinase of Tec family, acts as a Th1 cell specific transcription factor and regulates IFN- γ gene transcription. J Immunol, 168:2365-2370, 2002.
3. Mihara S, Suzuki N, Takeba Y, Soejima K, Yamamoto Y: Combination of molecular mimicry and aberrant auto antigen expression is important for development of anti-Fas ligand auto antibodies in patients with SLE. Clin Exp Immunol 129;359-369, 2002.
4. Nagafuchi H, Takeno M, Takeba Y, Miyagi T, Chiba S, Sakane T, Suzuki N: Aberrant expression of Fas ligand on anti-DNA autoantibody secreting B lymphocytes in patients with systemic lupus erythematosus; "immune privilege" like state of the auto reactive B cells. Clin Exp Rheumatol 20;625-631, 2002.
5. Wakisaka S, Mihara S, Takeba Y, Takeno M, Yamamoto S, and Suzuki N: Aberrant fas ligand expression on lymphocytes in patients with Behcet's disease. Int Arch Allergy Immunol 129(2);79-84, 2002.
6. Miyagi T, Takeno M, Nagafuchi H, Takahashi M, and Suzuki N: Flk1 positive cells derived

from mouse embryonic stem (ES) cells reconstitutes hematopoiesis in vivo in SCID mice. *Exp Hematol* 30(12);1444-1453, 2002.

7. Nagafuchi H, Shimoyama Y, Kashiwakura J, Takeno M, Sakane T, and Suzuki N: Preferential expression of B7.2 (CD86), but not B7.1 (CD80), on B cells induced by CD40/CD40L interaction is essential for the anti-DNA autoantibody production in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 21;71-77,2003

8. Suzuki N, Takeno M, Inaba, G: Bilateral subdural effusion in a patient with neuro-Behcet's disease. *Ann Rheum Dis*, in press, 2003.

9. Chiba S, Iwasaki Y, Sekino H, Suzuki N: Motoneuron enriched neural cells derived from mouse ES cells reconstitute neural network to improve motor function of hemiplegic mice, a model of cerebral vascular diseases. *Cell Transplant*, in press, 2003.

和文原著

1. 鈴木登、山本仁、小坂橋靖: 孤発性と考えられる進行性化骨性筋炎の一例. *炎症・再生* 22(6);555-559, 2002.
2. 宮城司、千葉俊明、鈴木登: 再生医学. 聖マリアンナ医科大学雑誌 30;121-129, 2002.
3. 千葉俊明、関野宏明、鈴木登: レノイン酸を用いたマウス胚性幹細胞における神経上皮型幹細胞への分化誘導. *炎症・再生* 22(6);543-549, 2002.

英文著書 (book)

1. Suzuki N: The pathogenic role of prolactin in patients with rheumatoid arthritis. *Neuroimmune Biology*, vol.3: Growth and lactogenic hormones (Ed by R Rapaport and Matera) pp.297-304, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 2002.
2. Sakane T, Suzuki N: Behcet's syndrome. *The Molecular Pathology of Autoimmunity Second Edition* (Ed by A N Theofilopoulos and C A Bona), pp.828-840, Gordon and Breach Science Publishers, Pennsylvania, USA, 2002.
3. Suzuki N, Takeno M, Takeba Y, Nagafuchi H, Sakane T: Autoimmunity in Behcet's disease. *Immunology of Behcet's disease* (Ed by M Zierhut, S Ohno) Swets & Zeitlinger, Lisse, The Netherlands, in press, 2003.
4. Takeno M, Shimoyama Y, Nagafuchi H, Suzuki N, Sakane T: Neutrophil hyperfunction on Behcet's disease. *Immunology of Behcet's disease* (Ed by M Zierhut, S Ohno) Swets & Zeitlinger, Lisse, The Netherlands, in press, 2003.
5. Sakane T, Suzuki N: Neuro- endocrine-immune axis in human rheumatoid arthritis. *Autoimmunity* Kluwer Academic Publishers, Wroclaw, Poland, in press, 2003.

和文著書

1. 鈴木登: 免疫不全の分子機構, わかりやすい内科学第2版(井村裕夫編)文光堂,東京, pp.310-313, 2002.
2. 鈴木登、宮城司: 膠原病類縁疾患に伴う関節炎(Behcet病など)「骨・関節疾患」, 朝倉書店 印刷中, 2003.
3. 鈴木登: 全身性エリテマトーデス 病因インフォームドコンセントのための図説シ

リーズ 膠原病, 医薬ジャーナル社 印刷
中, 2003.

和文総説

1. 鈴木登: 検査値異常から読む病態と診断計画 リンパ球芽球化試験. 臨床医 28 巻増刊号 1169-1171, 2002.
2. 武半優子, 岳野光洋, 柏倉淳一, 鈴木登: ヒト Th1 細胞特異的 Tec family チロシンリン酸化酵素, Txk の機能解析と各種自己免疫疾患における発現. 炎症・再生 22(5): 475-479, 2002.
3. 千葉俊明, 鈴木登: 脳梗塞慢性期における移植治療. 救急医学 26(9): 1094-1098, 2002.
4. 本間龍介, 鈴木登: 再生医療. Helth Science 19(1):78-7, 2002.
5. 宮城 司, 本間龍介, 鈴木登: 呼吸器系の生物学. 1. 胚性幹細胞 (ES 細胞) と実験医学. Annual Review 呼吸器 2003 1-9, 2003.

学会発表

国際学会

1. Miyagi T, Takeno M, Takahashi M, Suzuki N: Hemangioblasts derived from embryonic stem (ES) cells can reconstitute hematopoiesis *in vivo* in SCID. The 31th Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology, 2002.7.
2. Takeno M, Takeba Y, Ishigatubo Y, Suzuki N: Administration of Txk gene selectively induces Th1 type immune receptor, American College of Rheumatology: 65th Annual Scientific Meeting, 2002.10.

国内学会

1. 千葉俊明, 岳野光洋, 鈴木登, 関野宏明:

虚血型脳外傷モデルマウスにおける ES 細胞由来神経幹細胞の神経再生・保護効果, 第 25 回日本神経外傷学会, 2002.3.

2. 千葉俊明, 岳野光洋, 鈴木登, 関野宏明: ES 細胞由来神経細胞の脳内移植による神経網修復と機能改善, 第 1 回日本再生医療学会総会, 2002.4.

3. 千葉俊明, 岳野光洋, 鈴木登, 関野宏明: ES 細胞における神経管形成と液性因子による位置制御, 第 1 回日本再生医療学会総会, 2002.4.

4. 鈴木登, 岳野光洋: マウス胚性幹細胞・軟骨細胞を用いた関節炎モデルの治療, 第 46 回リウマチ学会学術集会, 2002.4.

5. 岳野光洋, 武半優子, 鈴木登: Txk 遺伝子治療による Th1 型免疫応答の誘導, 第 46 回リウマチ学会学術集会, 2002.4.

6. 千葉俊明, 岳野光洋, 鈴木登, 関野宏明: ES 細胞由来神経幹細胞・血管内皮細胞の同時移植による虚血型脳損傷モデルの修復・機能改善, 第 27 回日本脳卒中学会総会, 2002.4.

7. 鈴木登, 武半優子, 脇坂秀繁, 中辻憲夫, 仁藤新治: 霊長類 (カニクイザル) 胚性幹細胞 (ES 細胞) からの軟骨細胞分化誘導, 第 23 回日本炎症・再生医学会, 2002.7.

8. 鈴木登, 宮城司, 岳野光洋, 高橋正知: マウス ES 細胞由来の hemangioblast の移植による SCID マウスの骨髄再建能の検討, 第 23 回日本炎症・再生医学会, 2002.7.

9. 武半優子, 金子敦史, 浅井富明, 鈴木登: 慢性関節リウマチ(RA)におけるニコチンが神経ペプチドの産生に与える影響, 第 23 回日本炎症・再生医学会, 2002.7.

10. 千葉俊明, 岳野光洋, 関野宏明, 鈴木登: ES 細胞における神経管形成の模倣と morphogen による位置制御機構, 第 23 回日

本炎症・再生医学会、2002.7.

11. 宮城司、葉俊明、岳野光洋、永瀨裕子、鈴木登：ES細胞の造血系細胞への分化誘導と骨髄移植への応用、第23回日本炎症・再生医学会、2002.7.

12. 千葉俊明、鈴木登、関野宏明：ES細胞における神経分化と神経再生治療、第43回型マリアンナ医科大学医学会・学術集会、2002.7.

13. 本間龍介、上野聡樹、鈴木登：マウス胚性幹細胞（ES）の上皮細胞への分化誘導とその角膜移植への応用、第2回日本再生医療学会総会、2003.3.

14. 宮城司、高橋正知、鈴木登：マウスES細胞から分化誘導した血液血管芽細胞（hemangioblast）の特性、第2回日本再生医療学会総会、2003.3.

15. 濱田真里、千葉俊明、明石勝也、青木治人、鈴木登：マウス胚性幹細胞からの神経幹細胞の分化誘導と脊髄損傷における移植治療の有用性、第2回日本再生医療学会総会、2003.3.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特記事項なし

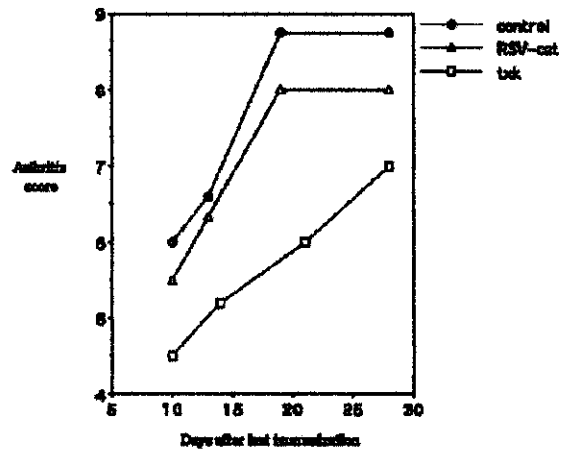


図1. II型コラーゲン関節炎モデルマウスにおける野生型 tkx 遺伝子投与の効果

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

マウス胚性幹細胞からの軟骨細胞の分化誘導と
軟骨細胞を用いた新規治療法の開発。

主任研究者 鈴木 登（聖マリアンナ医大 免疫学・病害動物学）

高齢者における変形性関節症(OA)や関節リウマチ(RA)などの関節疾患の原因解明と予防・治療法の開発を目指して、軟骨細胞の分化誘導とその治療応用をモデル動物を用いて検討した。マウスの胚性幹(embryonic stem cell; ES)細胞を bone morphogenetic protein 存在下に培養することで軟骨細胞を分化誘導することが出来た。この軟骨細胞は、約 50% 程度の純度であったが、残りの細胞も間葉系の細胞と考えられた。変形性関節症のモデルマウス関節内に、分化誘導した軟骨細胞を移植することで、病変部関節面への軟骨細胞の生着が認められた。関節内で奇形種発生や異所性の化骨を認めることは無かった。一方、骨欠損部にこの軟骨細胞を移植すると骨形成が認められた。

この成績は ES 細胞から分化誘導した軟骨細胞そのものが関節疾患の治療に応用可能であることを示している。

A. 研究目的

高齢化社会を迎えた本邦においては高齢者が日常生活において不便なく、健康的に生活できるような施策が望まれている。その中で多発関節痛・関節炎をもたらす変形性関節症(OA)や関節リウマチ(RA)などの関節疾患は高齢者の日常的な活動性を低下させる。さらに進行した場合には手術や介護の必要度を大きく増加させる。

高齢者の関節疾患においては現在用いられている治療法では治癒を期待する事ができないのみでなく、疼痛のコントロールすら難しいことが多い。即ち、高齢者の関節疾患の原因解明と予防・治療法の開発は難治性疼痛の緩和につながり、高齢者の生活の質の改善と高齢者社会の活性化に必須である。

これまでにマウス胚性幹(embryonic

stem cell; ES)細胞から分化誘導した軟骨細胞に発現される転写因子を検討したが、その過程で効率よく軟骨細胞を分化誘導することが可能となった。そこで本年度は、より効率よく軟骨細胞を ES 細胞から分化誘導し、さらに変形性膝関節症モデル動物や骨欠損モデル動物への移植を行いその生着と組織学的評価を行った。

B. 研究方法

マウス ES 細胞は胎児線維芽細胞と leukemia inhibitory factor(LIF) と共培養することで多分化能を維持したまま継代できる。この ES 細胞をグラチンコートディッシュ、あるいはフィブロネクチンコートディッシュ上で様々な濃度の BMP-2、BMP-4 とともに培養した。

軟骨細胞を特異的に染色するアルシアンブ

ルー染色は常法に従って行った。II型 collagen の蛋白発現は免疫組織染色を行った。

膝関節内塩酸投与による変形性膝関節モデルマウスの作成と病変部関節への軟骨細胞移植

変形性関節症のモデルとして、膝関節内へ1規定塩酸 10 μ l を注入した。注入後 3-7 日目に膝関節を回収し、組織学的に検討した。更に、一部の実験では ES 細胞より分化誘導した軟骨細胞 1 x 10⁶ 個を関節内に移植した。移植後 2 週間後、同様に組織学的検討を行った。

骨欠損モデル動物の作成

マウス大腿骨にドリルを用いて直径 1 mm の骨欠損部を作成した。ここに ES 細胞より分化誘導した軟骨細胞 1 x 10⁶ 個を移植し、経時的に X 線写真を撮影した。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては、実験前の飼育、実験中、実験後にいたるまで科学的かつ倫理的に対処し、動物の苦痛を排除するための麻酔による安楽死等の手法を用いた。

C. 研究結果

1. マウスの ES 細胞から軟骨細胞の分化誘導

マウスの ES 細胞株はマイトマイシン C 処理を行ったマウス胎児線維芽細胞上で leukemia inhibitory factor (LIF) と共に培養し継代維持した。20%FCS を含む分化誘導用の培養液中で 2-4 日間培養することで、浮遊状態で球状の ES 細胞塊、embryoid body (EB) を作成することができた。その後、EB を 0.1% グラチンをコートしたプレートに移した後、bone morphogenetic protein (BMP)-2 あるいは BMP-4 を添加し、28 日間培養した。BMP 存在下に数日培養することで、EB の一部はプレートに付着するようになった。培養 2 週間目の EB では、軟骨細胞に特異的と考えられるアルシアンブルー陽性領域が出現した。それ以降培養を継続す

ることで、EB のアルシアンブルー陽性領域は増大した。この細胞は II 型コラーゲン陽性で軟骨細胞と考えられた。この軟骨細胞をマウス大腿筋内に移植した組織像を図 1 に示す。

2. 変形性膝関節症モデルの作製

これまでもマウスを用いて変形性膝関節症モデルが報告されているが、その再現性に問題があり、新しいモデルマウスの作製を試みた。C57BL/6 マウスの膝関節内に 1 規定の塩酸 10 μ l を注入した。注入 3 日後に関節を観察した。アルシアンブルー染色で軟骨を染色すると塩酸注入マウスでは滑膜細胞がほとんど脱落・消失していた(図 1)。この成績から、軟骨組織の変性・摩耗を認め変形性膝関節症のモデルとして適切なモデルと考えられた。

3. 変形性膝関節症モデルマウスを用いた軟骨細胞移入療法

ES 細胞から分化誘導した軟骨細胞を用いて変形性膝関節症モデルマウスの治療研究を行った。塩酸注入によりマウス膝関節は軟骨の脱落した状態になっている。これに軟骨細胞 1 x 10⁶ 個を移入した。移植後 2 週めに関節を回収し、脱灰後 HE 染色を行った。

一部の実験では軟骨細胞をコロイド鉄で標識した。同様に移植を行うと関節面に Berlin Blue 染色陽性の鉄を取り込んだ軟骨細胞の生着を認めた(図 2)。移入した軟骨細胞は大腿骨関節面や膝蓋部に生着していた。長期間観察した場合にも異所性化骨を認めることはなかった。

骨欠損部への軟骨細胞移植による骨形成

マウス大腿骨にドリルを用いて直径 1 mm の骨欠損部を作成した後ここに ES 細胞より分化誘導した軟骨細胞 1 x 10⁶ 個を移植した。PBS のみを移植したマウスと比較し、軟骨細胞移植群では明らかな骨形成を X 線写真上で認めた(図 3)。

D. 考察

従来の内科的治療では効果が期待できな