

A 研究目的

MSC の多分化能は多くの実験結果から明らかにはあるが、MSC を用いた組織再生治療を Evidence Based Medicine として確立するためには、その増殖・分化能の基本的現象を分子レベルで把握する必要がある。このような背景のもと、前年度の研究に続き、MSC の増殖能に関しては細胞周期進行制御遺伝子、特に p16 遺伝子の持続的発現阻害による MSC の不死化及び一過性発現阻害による増殖促進法の開発を目指した。分化能に関しては前年度までの研究により単離されたと分化能の異なる MSC クローンを用いて、特定の分化方向決定因子の単離を試み、まず軟骨分化決定遺伝子群の単離同定を目指した。更に MSC を用いた難治性骨軟骨病態の治療法の開発を目的として、大を用いた骨壊死病態モデルを作成し、MSC を用いた治療法の開発を試みた。

B 研究方法

1) MSC の増殖・分化能の解析

1-1 不死化 MSC の樹立

前年度までの研究により、テロメラーゼ逆転写酵素 (telomerase reverse transcriptase, TERT) とヒトパピローマウイルス E6/E7 遺伝子の導入により不死 MSC を樹立した。更に細胞周期進行制御遺伝子に標的をしぼり、ヒト細胞において最も増殖制御に関与していると考えら

れている p16 遺伝子を不活化する目的で Bmi-1 遺伝子を導入することで不死化を試みた。樹立した不死化 MSC から E6/E7 遺伝子導入に場合と同様にクローンを単離し、その分化能を解析した。

1-2 p16 遺伝子を標的とした増殖法の試み

MSC の増殖法として、p16 遺伝子に対する siRNA による一過性発現阻害の増殖に対する効果を検討した。ヒト及びイヌ腸骨より MSC を採取し、培養の各段階において siRNA を導入し、細胞数の変化を検討した。ヒト MSC に関する実験は京都大学医の倫理委員会に申請、承認されたプロトコールに基づき、インフォームドコンセントを取得し、連結不可能匿名化を行った上で施行した。イヌの実験に関しては京都大学再生医科学研究所動物実験委員会に申請、承認されたプロトコールに基づいて施行した。

1-3 クローン化不死化 MSC の分化能の解析

不死化 MSC より単離したクローンのうち、骨、軟骨、脂肪に分化できるクローン (以下 AOC クローン) と骨、脂肪にのみ分化できるクローン (以下 AO クローン) を用いて、軟骨分化決定因子の単離を試みた。それぞれのクローンを 2 系統より、平板培養による定常状態での RNA、微小塊培養法による三次元培養下での RNA、及び更に TGF β 等の軟骨分化誘導刺

激を加えた状態での RNA を抽出し、Affimetrix 社製のオリコマイクロアレイシステムを用いて遺伝子発現プロファイルを比較した。

2) MSC を用いた壊死骨再建

2-1 壊死骨モデルの作成

治療標的として月状骨無腐性壊死（キーンヘノク病）を想定し、イヌを用いて病態モデルを作成した。麻酔下に舟状月状骨を露出し、これを穿孔し、内部の海綿骨を軟骨下骨が露出するまで完全に搔爬し、更に液体窒素による凍結処理を 2 回行うことで無細胞状態とした。

2-2 イヌ腸骨よりの骨髄間葉系細胞の単離・増殖

イヌ腸骨より骨髄液を採取、血球成分を除去した後、単層培養を行った。培養の種々の段階で p16 遺伝子に対する siRNA を投与し、増殖に対する影響を検討した。

2-3 人工骨基質との複合体形成と細胞移植

培養細胞を有孔人工骨基質（b-TCP 製剤）に吸着させたものを、作成した壊死骨へ充填した。同時に橈骨遠位端より血管柄付骨膜を挙上し、壊死骨へ移植した。

（倫理面への配慮）

ヒト MSC に関する実験は京都大学医の倫理委員会に申請、承認されたプロトコール（受付番号 第 515 番）に基づき、

インフォームトコンセントを取得し、連結不可能匿名化を行った上で施行した。

イヌの実験に関しては京都大学再生医科学研究所動物実験委員会に申請、承認されたプロトコール（受付番号 平成 15 年度 P-10）に基づいて施行した。

C 研究結果

1 MSC の増殖及び分化能の解析

1-1 Bm1-1 遺伝子導入による不死化 MSC の樹立と分化能解析

E6/E7 による不死化と同様に、hTERT 導入 MSC に Bm1-1 遺伝子を導入することで不死化 MSC の樹立に成功した。親株である hMSC/hTERT/Bm11 は骨・軟骨・脂肪の三方向へ分化する能力を維持していたか、それより樹立した 100 個のクローンの分化能は hMSC/hTERT/E6E7 からのクローン同様に、分化能において heterogeneous な集団であった。この事実は E6/E7 を用いて不死化した hMSC において観察された分化能の多様性が E6E7 によるものではないことを確認する結果となった。

1-2 p16 遺伝子発現阻害による MSC の増殖促進効果

ヒト及び大から単離した MSC は継代 9 回目（PD30-40）程度で増殖能が著しく低下し、この低下は bFGF 添加によっても回避できなかった。その継代 9 回目の細胞に p16 遺伝子に対する siRNA の導入

すると、遺伝子発現の抑制とともに、増殖が促進された。阻害効果が消失するとともに増殖は停止したことより、p16 遺伝子発現阻害は MSC の増殖に対して促進的效果があることが判明した。

1-3 クローン化不死化 MSC の分化能の解析

AOC クローン 2 系統と AO クローン 2 系統の細胞より、平板培養による定常状態での RNA、微小塊培養法による三次元培養 24 時間後の RNA 及び三次元培養に加えて TGF β 等の軟骨分化誘導処理を行って 24 時間後の RNA を抽出し、Affimetrix 社製のオリゴマイクロアレイシステムを用いて遺伝子発現プロファイルを比較した。コントロールでは 4 系統の細胞間で著しい相違は認められなかった。一方三次元培養のみの状態を比較すると AOC、AO の 2 系統は同等の遺伝子発現変化を示し、両者は明らかな相違を示し、更に軟骨分化誘導刺激によりその差は顕著となった。最終的に軟骨分化誘導刺激後に 2 群間で明確な相違を示した遺伝子群を約 30 種類同定した。これらのうちの既知の遺伝子のいくつかについて通常の RT-PCR 法により、発現パターンがマイクロアレイによる解析結果と一致することを確認した。現在、個々の遺伝子について解析中である。

2 MSC を用いた壊死骨再建

2-1 壊死骨モデルの作成

海綿骨搔爬と液体窒素処理により、組織学的に舟状月状骨は軟骨細胞層と軟骨下骨の一部を除いて無細胞状態となることを確認し、壊死骨モデルとして妥当であると考えられた。

2-2 大腸骨よりの骨髄間葉系細胞の単離・増殖

イヌ腸骨より単離した MSC はヒトと同様に、比較的初期に p16 遺伝子の発現が亢進し、増殖速度が低下した。現在、指摘な siRNA の投与スケジュールを検討中である。

2-3 人工骨基質との複合体形成

ヒト及びイヌ MSC を b-TCP に吸着させヌードマウス皮下に埋入し、骨組織形成を組織学的に検討している。

2-4 壊死骨への移植

siRNA 下に培養したイヌ MSC を b-TCP に吸着させた複合体を液体窒素処理した舟状月状骨に移植し、観察中である。

D 考察

現在 MSC の増殖方法として、増殖因子、特 bFGF を添加して培養する方法が用いられているか、現行の方法で単離した MSC が多様な細胞集団であることを考慮すると、bFGF 添加によって増殖してきた細胞群か、真の MSC であるかについては検討されていない。これまでの諸家の細胞表面の解析から、多様な細胞集団であることか指摘されている。siRNA を用いた増

殖方法は、基本的な細胞増殖の基本的因子を制御するもので、継代数に関係なく、増殖出来る可能性がある。軟骨分化決定遺伝子の候補としては SOX9 が知られているか、今回用いた AOC 及び AO クローンはともに軟骨分化誘導刺激 SOX9 を発現しており、SOX9 の発現は必要条件ではあるか、十分条件ではない。誘導後 24 時間という比較的早期に変動を示した遺伝子群は、転写因子、クロマチンリモテリング因子、イオンチャンネル遺伝子等であり、これらの遺伝子の反応の相違が軟骨へ分化できるかどうかを決定していると考えられた。イヌを用いた治療実験は現在進行中であるが、臨床病態に類似した状況を作成することか出来ており、実験モデルとしては妥当なものであると考えている。今後は更に細胞-人工骨基質複合体に bFGF 等の増殖因子の添加も含めて検討していく予定である。

E 結論

MSC の増殖において、細胞周期進行制御因子、特に p16 遺伝子の発現は重要であり、その発現阻害によって MSC の増殖を促進できることか判明した。分化能の異なる不死化 MSC を用いて、軟骨分化決定に関連する候補遺伝子群の同定に成功した。無腐性骨壊死に体する治療の動物モデルを作成し治療実験を行った。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

Nakamata, T, Aoyama, T, Okamoto, T, Hosaka, T, Nishijo, K, Nakayam, T, Nakamura, T, Toguchida, J In vitro demonstration of cell-to-cell interaction in growth plate cartilage using chondrocytes established from p53-/- mice J Bone Miner Res 18 97-107, 2003

Ushio, K, Oka, M, Hyon, S H, Yura S, Toguchida J, Nakamura, T Partial hemiarthroplasty for the treatment of osteonecrosis of the femoral head An experimental study in the dog J Bone Joint Surg Br 85 922-30, 2003

戸口田淳也、岡本健、青山朋樹 間葉系幹細胞の分化制御機構 骨・軟骨の再生を目指して 細胞工学 22 548-551、2003

岡本健、戸口田淳也、中村孝志 骨・軟骨を対象とした再生医療 日本臨床 61 432-438、2003

2 学会発表

青山朋樹、岡本健、松崎尚志、西庄功一、石部達也、安良興、中山富貴、中村孝志、戸口田淳也 p53-/-マウス由来関節軟骨細胞株を用いたプロスタグランジン E2 の関節軟骨に対する作用の解析 第 16 回日本軟骨代謝学会 2003 3 7 岡山

岡本健、青山朋樹、西庄功一、安良興、石部達也、中山富貴、中村孝志、戸口田淳也、清野透 不死化ヒト間葉系幹細胞株を用いた多分化能の研究 第 16 回日本軟骨代謝学会 2003 3 8 岡山

青山朋樹、岡本健、西庄功一、青山朋樹、石部達也、安良興、中山富貴、坪山直生、中村孝志、戸口田淳也 骨肉腫におけるコントロモテュリン-I 遺伝子発現のエピジェネティック制御機構 第 36 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会、

2003 7 11 神戸

戸口田淳也 間葉系幹細胞の増殖分化制御機構 第 25 回骨・カルシウム代謝研究会、2003 9 19 京都

戸口田淳也 間葉系腫瘍と組織再生の接点 第 253 回 MOC、2003 9 22 福岡

青山朋樹, 岡本健、西庄功一、石部達也、安良興、柴田弘太郎、嶋靖子、長山聡、中山富貴、中村孝志、戸口田淳也 骨肉腫におけるコンドロモテュリン-I 遺伝子発現のエピシェネティック制御機構 第 62 回日本癌学会総会、2003 9 27 名古屋

戸口田淳也 患肢温存治療へ向けた再生医学の展望 第 18 回日本整形外科学会基礎学術集会、2003 10 17 北九州

青山朋樹, 岡本健、松崎尚志、西庄功一、石部達也、安良興、中山富貴、中村孝志、戸口田淳也 p53-/-由来関節軟骨細胞株を用いたプロスタグランシン E2 の関節軟骨に対する作用の解析 第 18 回日本整形外科学会基礎学術集会、2003 10 17 北九州

柴田弘太郎, 岡本健、青山朋樹、安良興、中村孝志、戸口田淳也 p16 遺伝子不活化による間葉系幹細胞の不死化 第 24 回日本炎症・再生学会 2003 11 26、京都

青山朋樹, 岡本健、西庄功一、石部達也、安良興、柴田弘太郎、嶋靖子、中山富貴、中村孝志、長山聡、戸口田淳也 骨肉腫におけるコンドロモテュリン-I 遺伝子発現のエピシェネティック制御機構 第 26 回日本分子生物学会年会、2003 12 10 神戸

神戸任鮮英, 加藤元新規 HAC ヘクター系の構築 間葉系幹細胞の遺伝子再生医療への応用を目指した基礎的検討 第 26 回日本分子生物学会年会、2003 12 11 神戸

H 知的財産権の出願・登録状況

1 特許取得

なし

2 実用新案登録

なし

3 その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）

分担研究報告書

足場への細胞応用、細胞分化誘導

分担研究者 牛田 多加志 東京大学大学院医学系研究科

研究要旨

関節軟骨組織の生体外再構築のためには、適切な3次元培養担体を用いて軟骨細胞を3次元培養することにより軟骨組織を再生させる必要がある。また関節軟骨様組織を再生するためには軟骨細胞の形質を維持し、マトリックス産生をコントロールする必要がある。本研究では、PLGAメッシュにコラーゲンマイクロスポンジをハイブリッドした3次元培養担体を開発し、そこで軟骨細胞を3次元培養したところ、軟骨細胞はコラーゲン type II の発現を維持しながら厚さ 200 μ m の関節軟骨様組織を形成した。この軟骨組織エレメントを重ねて、さらに培養を続けることにより生体の関節軟骨の厚さに近い軟骨組織を再構築することかてきることかわかった。

A 目的

関節軟骨細胞の形質を維持しながら関節用軟骨組織を生体外で再構築するためのシート状の3次元培養担体を開発し、その3次元培養担体を基に関節軟骨組織エレメントを構築することを目的とする。また、その関節軟骨組織エレメントを重ねさせ長期培養することにより、細胞壊死を起こすことなく生体軟骨組織と同等の厚さを持つ再生軟骨組織を構築することを目的とする。

B 方法

PLGAニットメッシュを用いて、その編み目の空間にウシ type I コラーゲンからなるマイクロスポンジをフリーストライ法により形成させた。ウシ関節軟骨由来細胞をサスペンションにして、上記の3次元培養担体に播種した。インキュベーターで培養した後、作製した軟骨組織様シートを5層に重ね、さらに培養を続けた。このようにして生体外で再構築させた組織の切片を H&E 染色、safranin-O/fast green 染色、

toluidine blue 染色を行い、マトリックス産生を評価した。また、type II コラーゲン抗体を用いた免疫染色を行った。一方、type I A2 コラーゲン、type I A コラーゲン、アクレカンの遺伝子発現を Northern blotting により検証した。そして、粘弾性測定装置を用いて、培養組織の Dynamic complex modulus (E^*), structural stiffness ($F1/D1$) を測定した。

C 結果と考察

再生組織切片の組織化学的解析から、培養軟骨細胞は PLGA メノシュにコラーゲンマイクロスポンジをハイブリットした 3 次元培養担体に均一に播種され、関節軟骨特有のマトリックスが産生されていることが示された。200mm の厚さの 3 次元培養担体においては軟骨細胞の壊死は見られなかった。この状態からさらに 5 枚の再生組織を重ねて培養することにより、各層の境界線は組織化学的には認められなくなった。そして 5 層の状態においても軟骨細胞の壊死は見られなかった。これは、関節軟骨細胞としての形質を維持した軟骨細胞では酸素要求性、栄養要求性が低下しているため、このような重層化によっても壊死しないものと考えられた。したがって、200mm という厚さの状態では、軟骨細胞の形質

をコントロールし、酸素要求性、栄養要求性を下げた状態で、生体本来の厚さの組織に重層して、壊死を防止する方法は有効であると考えられる。これは PLGA メノシュにコラーゲンマイクロスポンジをハイブリットした 3 次元培養担体に播種され培養された軟骨細胞の Northern blotting の結果からも示唆された。培養と共に、type I コラーゲンの発現が低下し、一方で type II コラーゲンの発現が増加した。そして aggrecan の発現も培養とともに増加した。これは、いったん脱分化の傾向をもつ軟骨細胞が関節軟骨細胞としての形質を取り戻し再分化したことを示している。一方、Dynamic complex modulus (E^*), structural stiffness については、再生軟骨は生体軟骨に比べてそれぞれ約半分の値に留まった。これは組織化学的には同等であっても、マトリックスの構造化など、微細構造に依然として差異が存在することを示唆している。生体軟骨と同等の機械的特性を有する組織を再構築するための培養方法をさらに検討する必要があると考えられる。

D 結論

PLGA メノシュにコラーゲンマイクロスポンジをハイブリットした

3次元培養担体に軟骨細胞を播種し、培養することにより軟骨細胞の形質が維持され、また軟骨組織様のシート組織が再構築された。また、このシート組織を重層されることにより、壊死を起こすことなく生体組織と同等の厚さをもつ関節軟骨様組織を再構築されることかてきた。

E 健康危険情報

特になし

F 研究発表

The use of a novel PLGA fiber/collagen composite web as a scaffold for engineering of articular cartilage tissue with adjustable thickness, Guoping Chen, Takashi Sato, Takashi Ushida, Rei Hirochika, Yoshio Shirasaki, Naoyuki Ochiai, Tetsuya Tateishi J Biomed Mater Res 67A 1170-1180, 2003

G 知的財産権の出願・登録状況

特になし

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）

分担研究報告書

遺伝子導入効率に対する基盤的研究

分担研究者 渡辺 研 国立療養所中部病院長寿医療研究センター
老年病研究部 運動・感覚機能研究室長

研究要旨

前年度までに、Msx2 を用いた遺伝子導入・活性調節法による最終分化細胞からの多分化能を有する細胞群を誘導することに成功した。本年度においては、遺伝子導入による脱分化・増殖能誘導に対する危険性を考慮して、DNA の導入を介さない、たんぱく質を直接細胞に導入する方法（Protein Transduction PTD）について検討を行った。

A 研究目的

骨髄間葉系幹細胞の細胞寿命の延長に際して、高効率の遺伝子導入法を検討する事により、少量の幹細胞を効果的に増幅させる方法について検討を行う。

B 研究方法

Msx2 の全長 cDNA、もしくは、N 末端側にタンパク質導入配列（TAT）を付したものを pGEX-6P1 ヘクターに挿入し、大腸菌において、GST タンパクと Msx2 もしくは TAT-Msx2 の融合タンパク質として産生させた。グルタチオンセファロースにより精製を行った後、GST タンパク部分を除去するため、Precision プロテアーゼにより 4℃にて反応させ、Msx2 もしくは TAT-Msx2 タンパク質を得た。たんぱく質は SDS-PAGE

法により、純度・濃度を検定した。細胞への導入については、間接蛍光抗体法ならびにウエスタンブロッティング法により検討を行った。

（倫理面への配慮）

当該分担研究課題では、ヒトゲノム・遺伝子解析を対象としておらず、また、材料採取等に伴う動物実験は、国立療養所中部病院長寿医療研究センター動物実験施設指針等に則り、材料、モデルともに、動物愛護上の配慮をしたうえで行った。

C 研究結果

Drosophila Antennapedia などのホメオボックスたんぱく質は、内在性にたんぱく質導入配列(PTD)を有し、細胞膜を透過して細胞内外へ移行することかてきる事か知ら

れている。このことから、ホメオボックスを有す Msx2 は、たんぱく質かそのまま細胞内へ導入することが考えられたので、大腸菌で合成させ、培地に添加して導入を試みたか、数パーセントの細胞にしか導入されなかったため、塩基性の TAT ペプチドを N 末端側に添加した TAT-Msx2 を合成し、293 細胞を対象に PTD を試みた。その結果、培地に添加後、2 時間後にはすでに 70% の細胞が陽性となった。COS7 細胞でも同様に高 PTD 効率が観察された。間葉系細胞である骨芽細胞株 KUSA-A1, 筋芽細胞株 C2C12, 前脂肪細胞株 3T3-L1 においても、導入効率はやや下がるものの、有意 (50%~) に TAT-Msx2 が導入された。脱分化誘導活性について、KUSA-A1 細胞の ALP 活性抑制活性を調べたところ、10 倍量の大腸菌粗抽出液では観察されない抑制活性が TAT-Msx2 導入後、3 日で確認された。

D 考察

先天疾患や癌、難治疾患に対する遺伝子治療が進められているが、実際、発癌などの遺伝子治療独特の副作用の問題が顕在化してきている。本研究では、幹細胞の増幅を目的としていることから、遺伝子による恒常的活性化は問題点も抱えているのか現実である。そこで、タンパク質導入という持続性の点で遺伝子治療に劣るものの、安全性という点で評価できる方法を取り入れ、その導入法について検討を行った。本年度の研究では、ホメオボックスタンパクという比較的高次構造か単純である分子の導入

に成功したか、SS 結合や金属酵素など高次構造が複雑なタンパクの導入に関しては更なる検討が必要であると考えられた。

E 結論

DNA 導入に代わる機能分子導入発現法として、PTD 法もその候補として有効である可能性を示した。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

ME Williams, P Strickland, K Watanabe, & L Hinck "UNC5H1 induces apoptosis via its juxtamembrane region through an interaction with NRAGE" *J Biol Chem.* (2003) 278 17483-17490

T Matsuda H Suzuki, I Oishi, S Kani, Y Kuroda, T Komori, A Sasaki, K Watanabe, & Y Minami "The receptor tyrosine kinase Ror2 associates with the MAGE-family protein Dlx1-1 and regulates its intracellular distribution" *J Biol Chem* (2003) 278 29057-29064

H 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）
分担研究報告書

足場の製剤化に関する研究

分担研究者 久保田 直樹 中外製薬株式会社製品育成研究部 課長

研究要旨

損傷を受けた部位や病変部位を多能性幹細胞で再生させるという再生医療の概念は、胎生幹細胞や胎児あるいは成熟ヒト骨髄由来間質性幹細胞などを用いた試みか広がり、ますます注目を集めつつある。本分担研究では扁平骨あるいは長管骨に人為的に作製した骨欠損部の骨再生について、多孔性材料(デハイス)を包埋させた場合と、細胞を予めデハイスに播種させておいた場合とを比較検討し、デハイスと細胞をあわせて用いることの有用性を明らかにすることを目的としている。本年度は、骨欠損部に存在することか想定される骨髄細胞に着眼し、薬物か骨代謝に影響を及ぼす可能性について検討した。具体的に、我が国の骨粗鬆症治療の基本薬として広く用いられる一方、分化誘導作用か明らかにされているヒタミンD誘導体の、アルファカルシトール(ALF)と、強い骨量増加作用を有するヒタミンD誘導体として開発中の化合物(ED-71)を用いて、動物実験モデルにおいて検討した。その結果、ヒタミンD誘導体は、骨を融解する破骨細胞活性を抑制し、骨を作る骨芽細胞活性を維持することによって骨量を増加させることと、同時に骨髄中に細胞群の変化を引き起こし、脂肪細胞を減少させることか明らかとなった。以上のことから、骨再生の過程において、ヒタミンD誘導体を添加すると、さらに効率よく再生骨形成を促す可能性か示唆された。

A 研究目的

ヒトの骨粗鬆症のモデルとして汎用される、動物モデルを用い、ヒタミンDあるいはその誘導体か骨髄細胞分化に及ぼす影響を検討した。また、ヒタミンD受容体欠損細胞株を用い、ヒタミンDの骨髄細胞分化に及ぼす影響を検討した。

B 研究方法

1-1 卵巣摘除ラットの作成とヒタミンD誘導体投与による骨髄細胞の変化
雌性ラット(Wistar-imamichi、動物繁殖研究所)を10ヶ月令にて入手し、体重を指標としてコンピュータを用いた層別連続的

無作為法により、各実験群の平均体重および分散がほぼ等しくなるように1群7の8群に配分した。投与開始2週間前に、エーテル麻酔下で背部皮膚を切開し、両側卵巣を摘出した(偽手術群は切開のみ)。水は給水器にて自由摂取とし、飼料もCE-2(日本クレア社製、カンマ線滅菌済み)をステンレス製給餌器に入れ自由に摂取させた。

両側の卵巣摘除後14日から12週間、1週間に5日(月～金曜日)、1日1回、8:00～12:00の間に、ティスポーサブル注射筒およびラット用ソルテを用いて、投与液を強制経口投与した。ヒタミンD誘導体のALF [1α -hydroxyvitamin D_3]あるいはED-71 [2β -(3-hydroxypropoxy)- 1α , 25-dihydroxyvitamin D_3]はそれぞれMCT (medium chain triglyceride、日清製油) 溶液とした。投与用量はそれぞれ1 mL/kgで、ALFは0.1, 0.2, 0.4 mg/kg, ED-71は0.05, 0.1, 0.2 mg/kgとなるように、各個体の投与液量は投与日に最も近い体重を用いて算出した。最終投与の翌日に剖検を行い、骨標本、血清および尿を採取した。

腰椎L2-L4の平均骨密度は、二重X線骨塩定量装置(DCS-600, アロカ社製)にて測定した。骨吸収マーカーの尿中テオキシピリシノリン排泄量は、絶食下で採取した24時間蓄積尿をオステオリンクス(住友)によって測定した。血清オステオカルシンはrat osteocalcin ELISA kit (アマシャム, RPNJ 404)にて測定した。脛骨近位部の脱灰病理標本を作製し hematoxylin and eosin (HE)染色にて骨髓脂肪と骨梁構造を

検討した。

1-2 ヒタミンD受容体欠損細胞株を用いた、ヒタミンDの骨髓細胞分化に及ぼす影響の検討

ヒタミンDは骨粗鬆症のほか、皮膚炎、慢性腎不全、骨軟化症などの治療薬として使われる。いろいろな細胞に作用して強力な分化誘導作用を示す。また、リンパ球系細胞の増殖・分化への影響を与え、免疫機能を調整している。これらの働きは細胞核内に存在するヒタミンD受容体と結合することによって起こると考えられているか、解明されていない点も多い。

条件的不死化細胞は、トランスジェニックマウスとヒタミンD受容体の遺伝子を欠損したノックアウトマウスを交配させ、SV40T抗原遺伝子を持った同受容体欠損マウスを得られたもので、対照として、抗原遺伝子と受容体を併せ持つマウスを用い、常法に従って細胞株が樹立された。なお、SV40と呼ばれるウイルスのガン抗原遺伝子を持つトランスジェニックマウスは、すべての組織や臓器の細胞が不死化する可能性がある。さらに、本研究のように、温度感受性のSV40T抗原を発現したトランスジェニックマウスを用いると、不死化細胞は培養温度を調節することにより分化形質も制御可能となることから、極めてユニークで有用な実験ツールである。また、増殖性ととともに分化形質の維持された、いろいろな分化段階の細胞の株化が可能である。

実際、両マウスの細胞株とも33°Cで増

殖し、39°Cでは増殖を停止したので、抗原遺伝子か細胞増殖を制御していることが確認できた。

両細胞株を分化の状態にさせるため、培養容器の培養面をほぼすへて覆った後39°Cに培養温度を移行させて、受容体かない細胞株とある細胞株の脂肪細胞への分化能を調べた。さらに、受容体を介したヒタミンDの脂肪細胞分化への影響を調べるために、培養温度を39°Cに移行すると同時に、活性型ヒタミンDを添加した。いずれも、脂肪細胞数を計測するために、オイルレットO染色法で赤色に染まった脂肪細胞を顕微鏡下で計数した。

(倫理面への配慮)

ラットを実験動物として本研究に使用するにあたり中外製薬株式会社動物実験指針を遵守して実施した。

全ての実験の研究内容は、組換えDNA安全委員会に計画書を提出し、適切な計画が基準に従った施設において行われていることが承認されている。

C 研究結果

1-1 卵巣摘除ラットの作成とヒタミンD誘導体投与による骨髄細胞の変化

卵巣を摘出したラットにおいては、閉経後の骨粗鬆症患者に見られる変化と同様に、骨吸収と骨形成のいずれもか亢進した結果、骨量が減少していることが観察された。このとき、2種類のヒタミンD誘導体はいずれも骨吸収を抑制し、骨形成を維持あるいは促進して、その結果として骨量の減少抑

制効果を示すことが明らかとなった。

また、脛骨近位部の病理組織標本を注意深く観察すると、卵巣を摘出してプラセボを投与した動物群に比してALFを投与した群では、骨梁が太く密になったことに加え、骨髄の脂肪細胞の減少が観察された。以上のことから、ヒタミンDは骨代謝関連細胞のみならず、骨髄細胞中の脂肪細胞の数に影響を及ぼした可能性が考えられた。

1-2 ヒタミンD受容体欠損細胞株を用いた、ヒタミンDの骨髄細胞分化に及ぼす影響の検討

脂肪細胞へ分化した細胞数は、ヒタミンD受容体かある細胞株では $1854 \pm 287 \text{ cell/cm}^2$ であったのに対し、ヒタミンD受容体かない細胞株では $7740 \pm 27 \text{ cell/cm}^2$ と明らかに増加していた。さらに、ヒタミンD受容体を介したヒタミンDの脂肪細胞分化への影響を調べるために、培養温度を39°Cに移行すると同時に、活性型ヒタミンDを添加したところ、ヒタミンD受容体かある細胞株では脂肪細胞へ分化した細胞数が $806 \pm 170 \text{ cell/cm}^2$ と著しく減少したか、ヒタミンD受容体かない細胞株では $6934 \pm 1737 \text{ cell/cm}^2$ とほとんど影響を受けなかった。

以上の結果から、ヒタミンDはその受容体を介して脂肪細胞の分化を抑制していると考えられた。

D 考察

本年度、我々は、間葉系細胞にヒタミンDを作用させることによって脂肪細胞分化

か抑制されること、さらに、その作用はヒタミンD受容体を介する可能性を明らかにすることか出来た。骨欠損部における骨形成については、担体に細胞を染み込ませて足場を形成することか重要であると報告してきたか、今回、骨粗鬆症治療薬として広く用いられているヒタミンDに再生骨を形成させる上で有利な細胞種構成を提供できる可能性を認めたことは、興味深い。

今後、他の成長因子や担体および添加物などの検討を継続していくことて、骨石灰化を確実にするための条件の最適化か可能であると考える。

E 結論

ヒタミンDは破骨細胞や骨芽細胞に作用するばかりてはなく、間葉系細胞に作用して脂肪細胞への分化を抑制し、骨量を増加させたことから、骨の形成においては、間葉系細胞の足場とともにヒタミンDのような外来因子か重要な役割をする可能性か示唆された。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

なし

H 知的財産権の出願・登録状況

なし

Ⅲ 研究成果に関する一欄表

Ⅲ研究成果に関する一欄表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Tsuchiya, K	A custom-shaping system for bone regeneration by seeding marrow stromal cells onto a web-like biodegradable hybrid sheet	Cell Tissue Res	in press		
Takeda, Y	Can the life-span of human marrow stromal cells be prolonged by bmi-1, E6, E7, and/or telomerase without affecting cardiomyogenic differentiation?	J Gene Med	in press		
Kato, Y	Developmental totipotency of tissue-specific stem cells from an adult mammal Nuclear transfer of adult bone marrow mesenchymal stem cells	Biology of Reproduction	70	415-418	2004
Gojo S	Plasticity of mesenchymal stem cells--regenerative medicine for diseased hearts	Hum Cell	16(1)	23-30	2003
Sharov, A A	Transcriptome analysis of mouse stem cells and early embryos	PLoS Biology	1	410-419	2003
Imabayashi, H	Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes and chondrogenesis of human bone marrow stromal cells via chondrosphere formation with expression profiling by large-scale cDNA analysis	Exp Cell Res	288	35-50	2003
Gojo, S	In vivo Cardiovasculogenesis by Direct Injection of Isolated Adult Mesenchymal Stem Cells	Exp Cell Res	288	51-59	2003
Allan E H	Differentiation potential of a mouse bone marrow stromal cell line	J Cell Biochem	90 1	158-169	2003
Sindo, K	Osteogenic differentiation of the mesenchymal progenitor cells, Kusa is suppressed by notch signaling	Exp Cell Res	290 2	370-80	2003
Matsushita, K	Islet cell hyperplasia in transgenic mice overexpressing EAT/mcl-1, a bcl-2 related gene	Mol Cell Endocr	203	105-116	2003
Yoneda S	The effects of enamel matrix derivative (EMD) on osteoblastic cells in culture and bone regeneration in a rat skull defect	J Periodontal Res	38 3	333-42	2003
Fukuma, M	Up-regulation of Id2, an oncogenic helix-loop-helix protein is mediated by the chimeric EWS/ets protein in Ewing sarcoma	Oncogene	22 1	1-9	2003
Ochi, K	The use of isolated mature osteoblasts in abundance acts as desired-shaped bone regeneration in combination with a modified poly DL-lactic- co-glycolic acid (PLGA)-collagen sponge	J Cell Physiol	194	45-53	2003
Shibata R	Responsiveness of chemotherapy based on the histological type and WT1 mutation in bilateral Wilms tumor	Pathology international	53	214-220	2003
Shibata, R	Primary carcinosarcoma of the vagina	Pathology Int	53	106-110	2003
梅澤 明弘	骨芽細胞から神経細胞への分化	再生医療	3(1)	61-68	2004
梅澤 明弘	間葉系幹細胞の基礎と臨床	Molecular Medicine	40 (12)		2004
梅澤 明弘	骨髄間質細胞の可塑性	実験医学	22 (1)	12-16	2004
梅澤 明弘	第一章「幹細胞の増殖 分化機構とその制御」3) 骨髄由来の多能性細胞 1 骨髄間質による骨 軟骨形成	実験医学増刊「再生医療へと動き始めた幹細胞研	21 (8)	94-100	2003

		究の最先端」			
梅澤 明弘	再生医療－病理解剖ならびに病理検体から学ぶこと－	病理と臨床 特集「再生医療」	21 (7)	725-731	2003
伊澤 良兼	骨髄間質細胞	Molecular Medicine	40	144-151	2003
竹田 征治	多能性幹細胞としての間葉系幹細胞研究	分子呼吸器病	7 (4)	94-96	2003
梅澤 明弘	再生医療	城西放射線 医療同窓会報	26号		2003
梅澤 明弘	神経幹細胞の供給源 骨髄－骨芽細胞、神経疾患の再生医療－その現状と将来	Clinical Neuroscience	21 10	1127-1130	2003
梅澤 明弘	再生医療の展望 1 細胞移植による再生医療	日本内科学会誌	92 9	1758-1762	2003
森 泰昌	再生医学と幹細胞－成体幹細胞	日医雑誌	129 3	307-312	2003
植谷 宏平	間葉系幹細胞	日本医学会新聞	2523		2003
梅澤 明弘	組織幹細胞と生殖細胞の再生医学	慶應医学部新聞	615		2003
竹田 征治	筋ノストロフィーに対する再生治療	医学のあゆみ	204 3	179-182	2003
Kudoh, A	Reactivation of lytic replication from Epstein-Barr virus latently infected B-cells occurs with high S-phase CDK activity while inhibiting cellular DNA replication	J Virol	77	851-861	2003
Fujita, M	Establishment of latrunculin-A-resistance in HeLa cells by expression of R183A D184A mutant b-actin	Oncogene,	22	627-631	2003
Bruemmer, D,	Atorvastatin inhibits expression of minichromosome maintenance proteins in vascular muscle cells	Europ J Pharmacol	462	15-23	2003
Nagata KI,	Filament formation of MSF-A, a mammalian septin, in mammary HMEC cells depends on interactions with microtubules	J Biol Chem	278	18538-43	2003
Bruemmer D,	Rapamycin inhibits E2F-dependent expression of minichromosome maintenance proteins in vascular smooth muscle cells	Biochem Biophys Res Commun,	303	251-258	2003
Bruemmer D,	Peroxisome proliferator-activated receptor γ inhibits expression of minichromosome maintenance proteins in vascular smooth muscle cells	Mol Endocrinol	17	1005-18	2003
Bruemmer D,	Expression of minichromosome maintenance proteins in vascular smooth muscle cells is ERK/MAPK dependent	Exp Cell Res	290	28-37	2003
Kyo S	Successful immortalization of endometrial glandular cells with normal structural and functional characteristics	Am J Pathol	163	2259-69	2003
清野 透	ヒトパピローマウイルス	新世紀の感染症学 日本臨床社	下巻	562-567	2003
Kitamura, S,	Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Cells Cultured on Alumina Ceramics	Artificial Organs	Vol 28 No 1	72-82	2004
Kotobuki N,	Cultured Autologous Human Cells for Hard Tissue Regeneration Preparation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow	Artificial Organs	Vol 28 No 1	33-39	2004

Shimaoka, H,	Recombinant growth/differentiation factor-5 (GDF-5) stimulates osteogenic differentiation of marrow mesenchymal cells in porous hydroxyapatite ceramics	Journal of Biomedical Materials Research	Vol 68A Issue 1	168-176	2004
Higashiyama, S	Transplantation of Hepatocytes Cultured on Hydroxyapatite into Nagase Analbuminemia Rats	Journal of Bioscience and Bioengineering	Vol 96 No 1	83-85	2003
Ikeuchi, M,	Osteogenic differentiation of cultured rat and human bone marrow cells on the surface of zinc-releasing calcium phosphate ceramics	Journal of Biomedical Materials Research	Vol 67A Issue 4	1115-1122	2003
Uchimura, E,	<i>In-Situ</i> Visualization and Quantification of Mineralization of Cultured Osteogenic Cells	Calcified Tissue International			2003, issued online
Nakamata, T,	In vitro demonstration of cell-to-cell interaction in growth plate cartilage using chondrocytes established from p53 ^{-/-} mice	J Bone Miner Res	18	97-107	2003
Ushio, K,	Partial hemiarthroplasty for the treatment of osteonecrosis of the femoral head An experimental study in the dog	J Bone Joint Surg Br	85	922-30	2003
戸口田淳也	間葉系幹細胞の分化制御機構 骨 軟骨の再生を目指して	細胞工学	22	548-551	2003
岡本健	骨 軟骨を対象とした再生医療	日本臨床	61	432-438	2003
Guoping Chen,	The use of a novel PLGA fiber/collagen composite web as a scaffold for engineering of articular cartilage tissue with adjustable thickness	J Biomed Mater Res	67A	1170-1180	2003
ME Williams	" UNC5H1 induces apoptosis via its juxtamembrane region through an interaction with NRAGE "	J Biol Chem	278	17483-17490	2003
T Matsuda,	"The receptor tyrosine kinase Ror2 associates with the MAGE-family protein Dlx1-1 and regulates its intracellular distribution "	J Biol Chem	278	29057-29064	2003

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Ohgushi, H,	Mesenchymal stem cells and bioceramics strategies to regenerate the skeleton		Novartis Found Symposium 249, TISSUE ENGINEERING OF CRTILAGE AND BONE	John Wiley & Sons Ltd	London	2003	118-127 discussion 127-132, 170-174, 239-241
Ohgushi, H	Biochemical and Biological Analysis of Bone Viability	Usui, M and Yoshizu, T	Experimental and Clinical Reconstructive Microsurgery	Springer - Verlag Tokyo	Tokyo	2003	70-74

20030691

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。