

- 寿治, 持田讓治. 積層化軟骨細胞シートが産生する液性因子に関する検討. 第10回日本再製医療学会総会, 2011年3月, 東京
- 12) 高久裕子, 村井邦彦, 小久保舞美, 持田讓治, 佐藤正人. 細胞シート膝関節移植後のBioluminescensImagingを用いた移植細胞の追跡. 第10回日本再製医療学会総会, 2011年3月, 東京
- 13) 伊藤聡, 佐藤正人, 小久保舞美, 鵜養拓, 長井敏洋, 三谷玄弥, 持田讓治. 家兎膝軟骨損傷モデルを用いた積層化軟骨細胞シートと滑膜細胞移植による治療効果の検討. 第10回日本再製医療学会総会, 2011年3月, 東京
- 14) 小久保舞美, 佐藤正人, 内山善康, 繁田明義, 伊藤聡, 鵜養拓, 持田讓治. 軟骨細胞初代培養時におけるアスコルビン酸の影響とその添加時期の検討. 第9回再生医療学会 2011年3月, 福岡
- 15) 加藤玲子, 佐藤正人, 小久保舞美, 持田讓治, 松岡厚子. *in vivo*における培養軟骨細胞の免疫反応におよぼす影響. 第9回再生医療学会 2011年3月, 福岡

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

培養軟骨細胞の免疫調節効果に関する研究

研究協力者 加藤 玲子 国立医薬品食品衛生研究所・医療機器部・主任研究官
研究分担者 小久保 舞美 東海大学医学部外科学系整形外科学・特定研究員

研究要旨：東海大学医学部整形外科佐藤正人准教授らによって、温度応答性培養皿で作製した積層化軟骨シートによる関節軟骨修復再生効果を明らかにされてきているが、この技術を用いた再生治療の将来的な普及には同種細胞移植が必須になると考えられる。しかしながら、同種軟骨細胞が宿主内で、特に免疫反応においてどのような挙動を示すかの詳細な報告はない。そこで本研究で、培養軟骨細胞が *in vitro* でリンパ球の活性化（細胞増殖）におよぼす影響を検討した。その結果、同種軟骨細胞が免疫反応を惹起しないだけでなく、活性化リンパ球の増殖を抑制したことから、関節軟骨損傷の治療に同種軟骨細胞を使用出来る可能性が示唆された。

A. 研究目的

関節軟骨再生修復をめざして、これまでに積層化軟骨シートを用いた動物実験が行われてきており、ラット、ウサギ、ミニブタにおいて、未処理群と比較していずれも修復成績が良いことが示されている。特にラットを用いた実験では、移植三ヶ月後も、移植細胞が残っており、移植細胞が拒絶されていないことが示唆されている。しかしながら、移植した細胞が生体内で免疫反応においてどのような挙動を示すかは不明である。そこで本研究ではまず、移植に用いる細胞が *in vitro* において免疫反応にどのような影響を与えるかを検討することを目的とした。

間葉系幹細胞 (MSC)は数々の報告から、免疫原性が低く、免疫細胞 (T細胞、B細胞、NK細胞、樹状細胞) の活性化や成熟を抑制する効果があることが示されている。実際、白血病の治療において骨髄幹細胞の移植時に懸念される副作用である移植片対宿主病

(GVHD)の治療に、その免疫抑制効果を期待してMSCが用いられている。一方、軟骨細胞は間葉系幹細胞から分化した細胞であることから、免疫抑制効果を維持している可能性がある。これまでに、*in vitro*でMSCから分化させた軟骨細胞が免疫抑制効果を維持していることが示されているが、生体内ですでに分化している軟骨細胞が同種異系 (アロ)反応にどのような挙動を示すか確認した報告はない。

そこで今年度は、まず *in vitro* において軟骨細胞が同種リンパ球の活性化に及ぼす影響を検討した。さらに異種 (ヒト・ウサギ) 軟骨細胞が異種 (マウス) リンパ球の増殖反応にどのような影響を及ぼすかの検討もおこなったのであわせて報告する。

B. 研究方法

細胞の培養

マウス軟骨細胞 C57BL/6 (H-2^b)及びウサギ軟骨細胞(日本白色家兎)は東海大学医学

部整形外科学教室より譲渡してもらった。いずれも、DMEM/F12 (GIBCO 社) に 20% fetal bovine serum (FBS; GIBCO 社), 1% antibiotics-antimycotic (GIBCO 社) および 50 μ g/ml ascorbic acid (和光純薬工業社) を加えた培地で培養した。

ヒト膝関節軟骨細胞(NHAC-kn)は Lonza Walkersville, Inc. (以下 Lonza 社) より購入し, Chondrocyte Basal Medium (CBM) に Supplements and Growth Factors (CGM) を加えた培地で培養した。

マウスリンパ球は日本チャールズリバー(株)より購入した C3H (H-2^k) の脾臓をすりつぶし溶血させた後、Advanced PRMI (GIBCO 社) に 1% FBS を加えた培地に懸濁したものを実験に用いた。

マウス骨髄由来樹状細胞(BMDC)は日本チャールズリバー(株)より購入した BALB/c (H-2^d) から骨髄細胞を回収し、溶血させた後 Granulocyte/Macrophage colony-stimulating factor (Peprotech 社) を入れた Advanced PRMI に 1% FBS を加えた培地で一日おきに培地交換をし、培養 6 日目に 100 ng/ml Lipopolysaccharides (Sigma 社) で刺激を与え一晚培養した後、洗浄しガンマセル 40 イグザクターを用いてガンマ線照射をおこない細胞分裂阻害したものを実験に用いた。

全ての培養は 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 下で行った。

軟骨染色

トルイジンブルー染色、サフラニン O 染色は Cartilage Staining Kit (TAKARA 社) を用いて使用法に従い、それぞれ染色した。

軟骨細胞の前処理

96 well plate の各ウェルに 2 x 10⁴ の軟骨細胞を播種し、張り付いたのを確認してから (数時間後)、ガンマセル 40 イグザクターを用いてガンマ線照射をおこない細胞分裂を阻害した。

混合リンパ球培養反応 (MLR)

96 well plate の各ウェルにマウス脾臓細胞 (2 x 10⁵) と BMDC (3.3 x 10⁴) を共培養した。

リンパ球と軟骨細胞の共培養

ガンマ線照射した軟骨細胞が播種された各ウェルに 2 x 10⁵ の刺激していないリンパ球を撒き、共培養を行った。アロ反応の陽性反応がみられる MLR をコントロールとした。(図 1-1)

MLR と軟骨細胞の共培養

ガンマ線照射した軟骨細胞が播種された各ウェルに上述した条件の MLR を共培養した。MLR のみをコントロールとした。(図 1-2)

細胞増殖測定

細胞増殖 ELISA, 5-Bromo-2-deoxyuridine 化学発光キット (Roche 社) を用いて測定した。培養 3, 4, 5 日目に各ウェルに BrdU を加え 8 時間培養した後、リンパ球の DNA 合成中の BudU 取り込み量を測定し、細胞増殖を評価した。各反応系での細胞増殖は同一条件を 3 ウェル行い、統計的有意差を Student's T 検定により確認した。

C. 結果

1. マウス軟骨細胞の確認 (図 2)

マウス軟骨細胞は膝及び股関節から軟骨

組織から採取された細胞であるが、実際に軟骨細胞であるかの確認をトルイジンブルー染色及びサフラニンO染色で行ったところ、いずれも陽性であった。このことから単離した細胞が軟骨細胞であることが確認された。

2. 軟骨細胞が同種リンパ球に及ぼす影響の検討

アロ反応陽性である MLR では高い細胞増殖能が観察されたのに対して（図3: 青色バー）、マウスリンパ球とマウス軟骨細胞を共培養した系では、MLR の細胞増殖活性を100%とした場合、その約12%の活性しか観察されなかった。（図3: 黄色バー）

3. 同種軟骨細胞によるマウス MLR 効果の検討

MLR とマウス軟骨細胞を共培養した結果、コントロールの MLR でのリンパ球の増殖率を100%とした場合、培養3日目および4日目は共に約1%になっていた。それぞれの日の MLR のみの写真ではリンパ球が芽球形成（リンパ球増殖）しているのに対して、MLR と軟骨細胞の共培養の写真ではほとんどリンパ球が増殖している像は観察されなかった。（図4）

4. 異種軟骨細胞によるマウス MLR の抑制効果の検討

1) ヒト軟骨細胞の場合

マウス MLR とヒト軟骨細胞を共培養した結果、コントロールの MLR でのリンパ球の増殖率を100%とした場合、培養3日目で20%まで抑制されており、4日目および5日目では10%以下まで抑制されていた。

（図5）

2) ウサギ軟骨細胞の場合

マウス MLR とウサギ軟骨細胞を共培養した結果、コントロールの MLR でのリンパ球の増殖率を100%とした場合、培養3日目および4日目で数%以下まで抑制されていた。（図6）

D. 考察

まず、マウスリンパ球に対する同種軟骨細胞の影響をみたところ、陽性コントロールである MLR の細胞増殖活性に対して軟骨細胞と共培養したリンパ球の細胞増殖活性は有意に低かった。（図3）このことから、マウス軟骨細胞は同種リンパ球の活性化（細胞増殖）をほとんど誘発しないことが示唆された。さらに、MLR と軟骨細胞の共培養の結果から、軟骨細胞は活性化したリンパ球の細胞増殖も抑制できることが分かった。（図4）以上のことから同種軟骨細胞を移植しても、宿主の免疫細胞の活性化を惹起しない可能性が示唆される。

一方、MSC は異種のリンパ球の活性化抑制効果を有するとの報告があり、我々もマウス MLR をヒト MSC が抑制することを確認できている。そこで、軟骨細胞でも異種リンパ球の活性化を制御可能であるか検討してみた結果、マウス MLR をヒトおよびウサギの軟骨細胞が抑制出来ることが分かった。（図5,6）今回の結果より、軟骨細胞は同種だけでなく異種リンパ球の活性化も抑制することが確認できたが、その作用機序は不明である。MSC の免疫抑制効果には

IL-10, HGF, TGF- β , PGE₂, IDO などの液性因子や細胞同士の接触が関わっているとの報告がある。中でも TGF- β は軟骨分化に重要な役割を果たす因子であるが、積層化軟骨細胞シートで、その発現上昇が観察されていることから、軟骨細胞の免疫抑制効果には TGF- β が関与している可能性が考えられる。今後、共培養系の上清中の TGF- β 量を測定してみる必要がある。

E. 結語

同種軟骨細胞が免疫反応を惹起しないだけでなく、活性化リンパ球の増殖を抑制したことから、関節軟骨損傷の治療に同種軟骨細胞を使用出来る可能性が示唆された。

今後、シート化した細胞で、同様の効果が維持されているか検討を行う予定である。

F. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

G. 研究発表

学会発表

加藤玲子、佐藤正人、小久保舞美、持田讓治、松岡厚子. *in vitro* における培養軟骨細胞の免疫応答におよぼす影響. 第24回日本軟骨代謝学会 2011年3月、福岡.

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

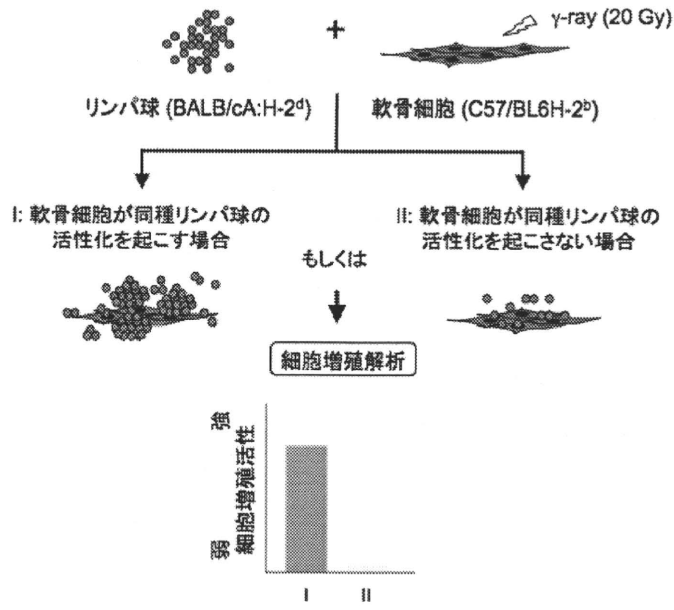


図1-1 実験概要-1

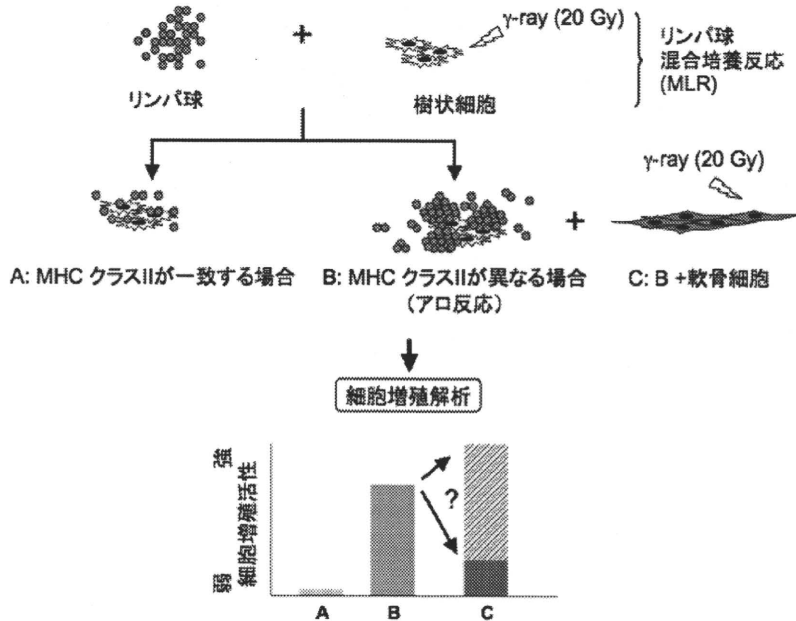


図1-2 実験概要-2

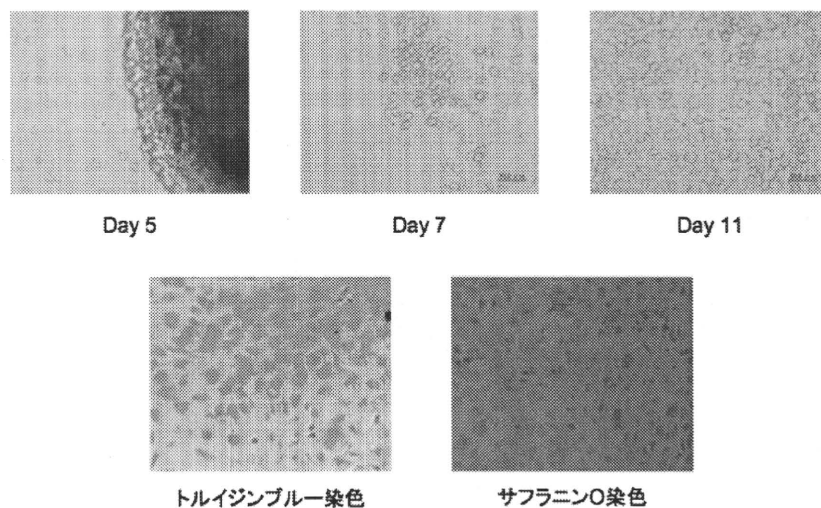


図2 マウス軟骨細胞

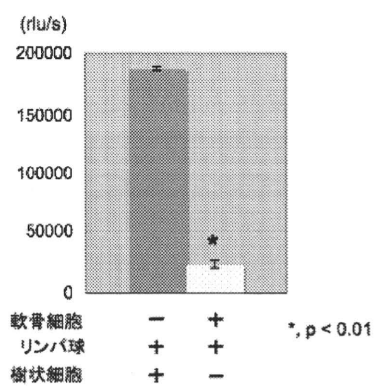


図3 マウス軟骨細胞は同種リンパ球を活性化しない

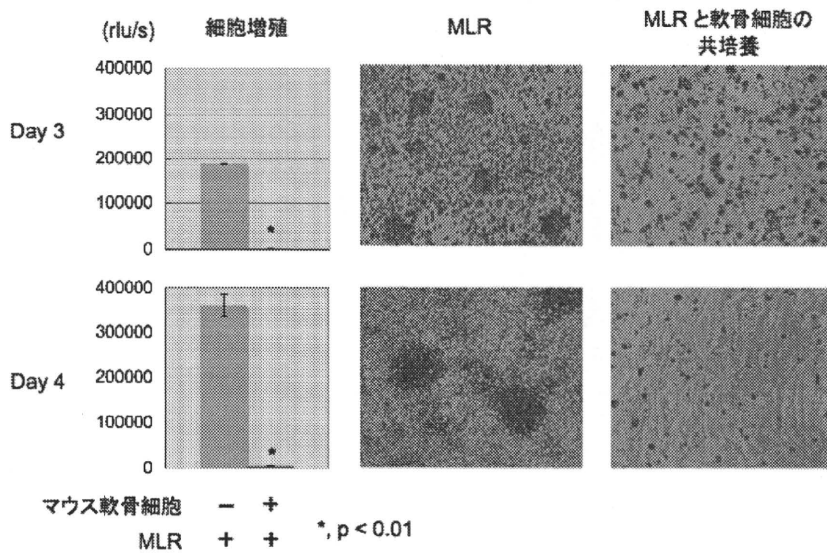


図4 マウス軟骨細胞はMLRの反応を抑制する

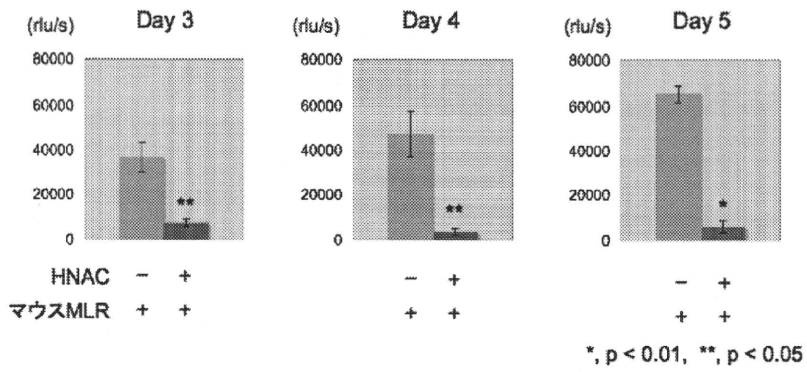


図5 ヒト軟骨細胞は異種MLRの反応を抑制する

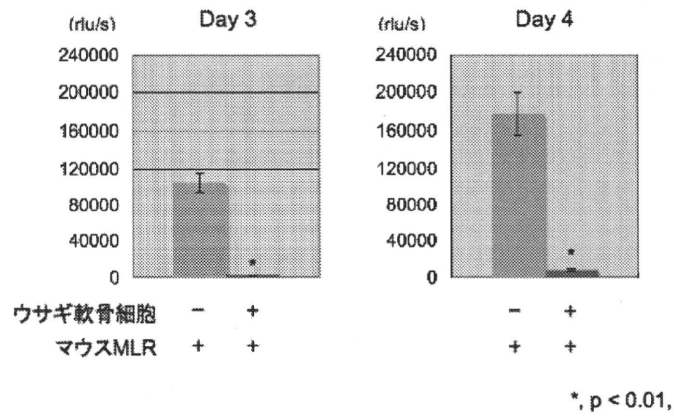


図6 ウサギ軟骨細胞は異種MLRの反応を抑制する

自己細胞処理と安全性評価に関する研究

研究分担者 加藤 俊一 東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学・教授
研究協力者 河毛 知子 東海大学医学部外科学系整形外科学・研究員
田中麻衣子 東海大学医学部外科学系整形外科学・研究員
渡部 綾子 東海大学医学部外科学系整形外科学・研究員

研究要旨：東海大学で開発された培養軟骨細胞シートによる軟骨再生技術を安全かつ効果的に臨床応用するために、培養軟骨細胞シートの安全性を確認した。

ヒト細胞シートの安全性評価として、培養により目的外の形質転換を起こしていないことを明らかにするため、培養期間を超えて培養した細胞について、細胞形態観察、CGH解析、及び、培養軟骨細胞シートを免疫不全マウスに移植することにより造腫瘍性の確認試験を検討した。その結果安全性に問題ないことが確認された。

A. 研究目的

ヒト幹細胞臨床研究を厚生労働省へ申請のするため、培養軟骨細胞シートの安全性を確認することを本研究の目的とした。薬食発法第0208003号第4章「細胞・組織加工医薬品等の非臨床試験」に係る項目「培養期間を超えて培養した細胞について、目的外の形質転換を起こしていないことを明らかにすること。」を確認するために Comparative Genomic Hybridization (CGH)解析を行った。また、免疫不全 mouse を用いて移植した培養軟骨細胞シートが生体内で腫瘍化しないことを確認する為に造腫瘍性否定試験を行った。

B. 研究方法

①細胞形態観察、CGH 解析

様々な軟骨細胞、多指症軟骨細胞 8 検体、人工関節置換術の際に採取した軟骨細胞(TKA-AC)4 検体、前十字靭帯再建術

の際に採取した軟骨細胞(ACL-AC)3 検体、骨切り術の際に採取した軟骨細胞(HTO-AC)1 検体を解析に用いた。それぞれの軟骨細胞について、第6継代(P6)まで培養を行い、第2・4・6継代(P2・P4・P6)の細胞からDNAを抽出した。ゲノムDNAコピー数異常を検索するため、第2継代(P2)と第4継代(P4)・第6継代(P6)それぞれについてCGH解析を用いて評価した。また、培養中に細胞形態の観察を実施した。

②第1回目造腫瘍否定試験

免疫不全マウスの皮下に培養軟骨細胞シート(1.6×10^6 cells/sheet/匹)、培養軟骨細胞シート(1.6×10^6 cells/sheet/匹) + 培養滑膜細胞(1.6×10^6 cells /sheet/匹)を200 μ Lの生理食塩水に懸濁した状態で2群に分けて注入した。評価は、9週、12週、24週の期間で観察し、移植部位を病理組織学的に観察した。

③第2回目造腫瘍否定試験

WHOの基準に則り、免疫不全マウスの皮下に培養軟骨細胞(1×10^7 cells/匹)、培養軟骨細胞(1×10^7 cells/匹) + 培養滑膜細胞(1×10^7 cells/匹)を移植した。Sham群も作製し、計3群とした。3週、12週まで観察をし、移植部皮膚、主要臓器、血清を摘出した。移植部皮膚を病理組織学的に評価した。

C. 結果

①細胞形態観察、CGH解析

P2からP6まで培養期間中の細胞形態に異常は認められなかった。

②第1回目造腫瘍性否定試験

移植9週目において外観及び摘出した移植部皮下組織には移植した細胞は確認出来なかった(図2)。

9週、12週、24週いずれの期間においても肉眼的所見で転移や腫瘍形成は確認されなかった。しかし、移植細胞は肉眼的所見においても免疫染色においても確認出来なかった。

③第2回目造腫瘍性否定試験

移植1週目において外観からの観察でも移植部の膨隆が確認できた(図3-1)。しかし移植3週目になると外観からの観察では移植部の膨隆は確認できなかった(図3-2)。しかし、移植後3週目の解剖時に移植部皮下組織を摘出すると肉眼的所見で

も移植細胞は顕著に確認された(図3-3)。移植後12週目の剖検時に移植細胞は、肉眼的所見で確認出来た個体と出来なかった個体があった。しかし、3週、12週とも免疫組織学的に移植細胞の残存は確認されたが、腫瘍形成は認められなかった。移植部皮下組織のSafuraninO染色の結果を図3-4に、トルイジンブルー染色の結果を図3-5に、HE染色の結果を図3-6に示す。

D. 結論

培養期間を超えて培養した細胞の形態に異常は認められなかった。CGH解析の結果については来年度中にサンプル数を増やし、結果の解釈の仕方を確立したい。

造腫瘍性否定試験では、第1回目では実際に臨床応用で移植する培養軟骨細胞シートと同じものを、同じ細胞数で作製し免疫不全マウス皮下へ移植したが、移植後9週目ですでに消失してしまった。それを踏まえた上で、次に第2回造腫瘍否定試験として、WHOの基準に細胞数を合わせて、剖検も3週、12週に実施した。その結果、肉眼的所見で移植した細胞の残存が消失している個体もあったが、残存が確認できる個体もあった。残存が確認出来た個体の移植部皮膚の病理標本をSafuraninO染色およびトルイジンブルー染色することにより残存していた細胞が軟骨細胞であることが確認出来た。また、HE染色により残存した細胞が腫瘍化していないことが確認出来た。この結果によ

り、培養軟骨細胞シートの腫瘍性を持たないことが確認出来た。現在、第2回目造腫瘍性否定試験の移植後24週目までの経過観察を行っている。

以上より、造腫瘍性は本研究では認めなかった。このことから培養軟骨細胞シートを用いた軟骨再生は安全であると示唆される。

来年度にCGH解析の結果と、第2回造腫瘍化否定試験の経過観察である24週目の結果を追加し、培養軟骨細胞シートのより高い安全性を報告したい。

E. 健康危害情報

本研究による健康危害情報はなかった。

F. 研究発表

1. 著書

- 1) 加藤俊一. よくわかる造血細胞移植コーディネート. 医薬ジャーナル社 2010 pp1-2 (編集)
- 2) 加藤俊一. よくわかる小児の造血細胞移植 医薬ジャーナル社 2010 (監修および共著)
- 3) 加藤俊一. ムコ多糖症に対する造血幹細胞移植の現状と課題 (骨髄、臍帯血、末梢血). 「ムコ多糖症 UPDATE」. イーエヌメディックス社 2011 (印刷中).

2. 論文発表

- 1) Yabe H, Yabe M, Koike T, Shimizu T, Morimoto T, Kato S. Rapid improvement of life-threatening

capillary leak syndrome after stem cell transplantation by bevacizumab. *Blood*. 2010 Apr 1;115(13):2723-4.

- 2) Hishizawa M, Kanda J, Utsunomiya A, Taniguchi S, Eto T, Moriuchi Y, Tanosaki R, Kawano F, Miyazaki Y, Masuda M, Nagafuji K, Hara M, Takanashi M, Kai S, Atsuta Y, Suzuki R, Kawase T, Matsuo K, Nagamura-Inoue T, Kato S, Sakamaki H, Morishima Y, Okamura J, Ichinohe T, Uchiyama T. Transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells for adult T-cell leukemia: a nationwide retrospective study. *Blood*. 2010 Aug 26, 116(8);1369-76. May 17. [Epub ahead of print]
- 3) Tomita Y, Yasuda Y, Hyodo H, Koike T, Shimizu T, Morimoto T, Hattori K, Matsumoto M, Inoue H, Yabe H, Yabe M, Shinohara O, Kojima S, Minemura T, Kato S. High incidence of fatty liver and insulin resistance in long-term adult survivors of childhood stem cell transplant. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Jun 21 [Epub ahead of print]
- 4) Takanashi M, Atsuta Y, Fujiwara K, Kodo H, Kai S, Sato H, Kohsaki M, Azuma H, Tanaka H, Ogawa A, Nakajima K, Kato S. The impact of anti-HLA antibodies on unrelated

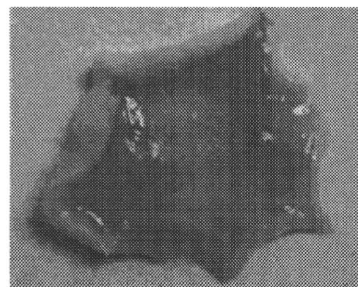
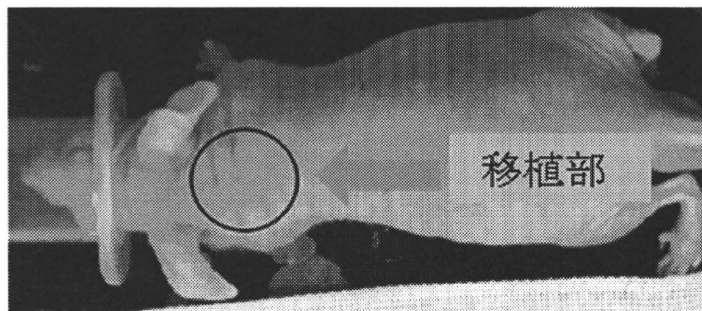
- cord blood transplantations. *Blood*. 2010 Oct 14;116(15): 2839-46. Jul 13. [Epub ahead of print]
- 5) Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, Arakawa S, Kato S, Yabe H. Therapy-related myelodysplastic syndrome of recipient origin in a juvenile myelomonocytic leukemia patient 17 years after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Sep 27. [Epub ahead of print]
- 6) Yabe M, Shimizu T, Morimoto T, Koike T, Takakura H, Suganuma E, Sugiyama N, Kato S, Yabe H. Alternative donor marrow transplantation in children with aplastic anemia using low-dose irradiation and fludarabine-based conditioning. *Bone Marrow Transplant*. 2010 Oct 18. [Epub ahead of print]
- 7) 渡辺修大、足立壮一、堀部敬三、永利義久、加藤剛二、田渕 健、吉見礼美、加藤俊一、矢部普正. 日本小児白血病リンパ腫研究グループ(JPLSG)SCT 委員会小児急性骨髄性白血病第一寛解期でのHLA 一致同胞間骨髄移植におけるGVHD 予防 (MTX 単独 vs. CyA 群) の比較 日本小児血液学会雑誌 2010;24(1) : 32-36.
- 8) 加藤俊一. ライソゾーム病の治療. 1)造血細胞移植. 血液フロンティア 2010;20(4):565-573.
- 9) 加藤俊一. ライソゾーム病の治療. 造血細胞移植. 小児科診療 2011 (印刷中).
3. 学会発表
- 1) Kamiya S, Yonezawa H, Woo T, Kurata S, Zaman C, Hanawa T, Kato S, Osaki T. Biofilm formation by *Helicobacter pylori* and its pathogenesis. 33rd International Congress on Microbial Ecology and Disease. Sep. 6-10, 2010, Athen, Greece.
- 2) Kato S. Cord blood banking and cord blood transplantation in children in Japan. 22nd International Congress of Pediatrics. Oct.14-18, 2010, Tehran, Iran.
- 3) Koike T, Yanagimachi N, Yabe H, Yabe M, Morimoto T, Shimizu T, Ishiguro H, Takakura H, Kato S. High incidence of radiation induced cavernous hemangioma in long term survivors who underwent BMT with radiation therapy during childhood or adolescence. 2011 BMT Tandem Meeting. Feb. 17-21, 2011, Honolulu, USA.
- 4) Koike T, Yabe H, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, Kato S and Yabe M. Recovery of gonadal function after allogeneic stem cell transplantation for Fanconi

anemia. 22nd Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium. Oct. 2010, USA.

- 5) Yabe H, Morimoto T, Shimizu T, Koike T, Takakura H, Kato S and Yabe M. Long-term follow-up after unrelated bone marrow transplantation in a patient with dyskeratosis congenita. 22nd Annual Fanconi Anemia Research Fund Scientific Symposium. Oct. 2010, USA.
- 6) Yabe H, Yabe M, Kato S, Koike T, Takakura H, Hyodo H, Tomita Y, Ishiguro H, Shimizu T, Morimoto T and Akiba T. Recovery of gonadal function after allogeneic stem cell transplantation for aplastic anemia. 第72回日本血液学会総会 2010年9月、横浜.

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



移植部皮膚

図1 第1回目造腫瘍性否定試験 移植後9週目移植部外観と移植部皮膚

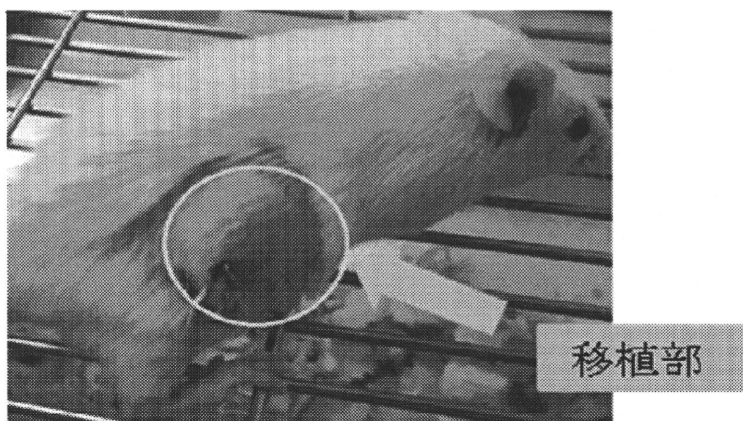


図2-1 第2回目造腫瘍性否定試験 移植1週目 外観

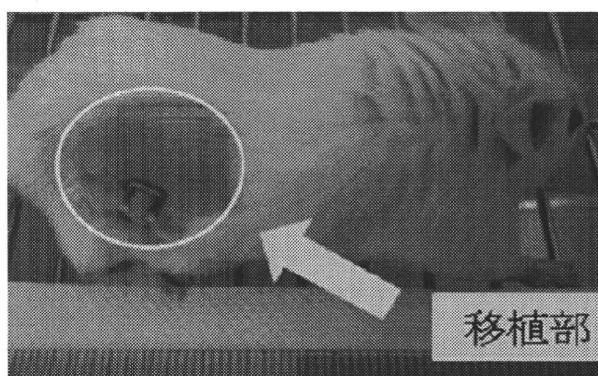


図2-2 第2回目造腫瘍性否定試験 移植3週目外観

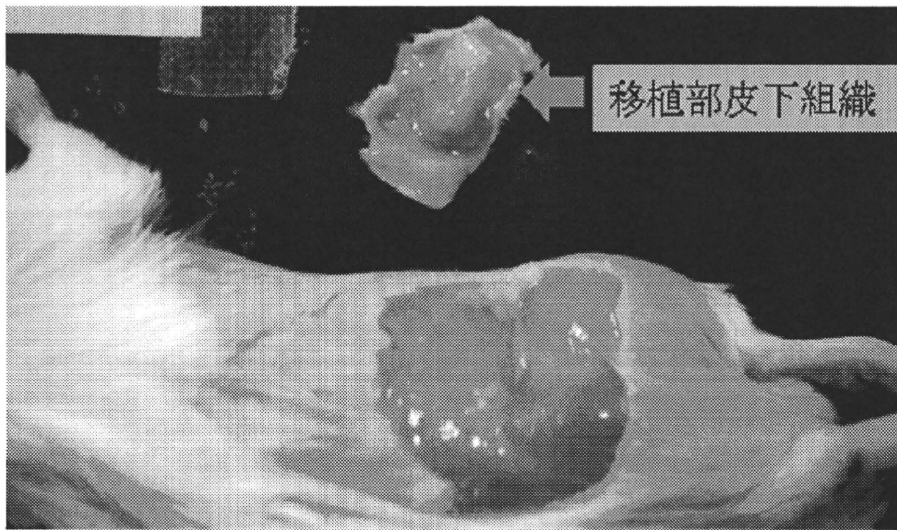


図 2-3 第 2 回造腫瘍性否定試験 移植後 3 週目 移植部皮膚

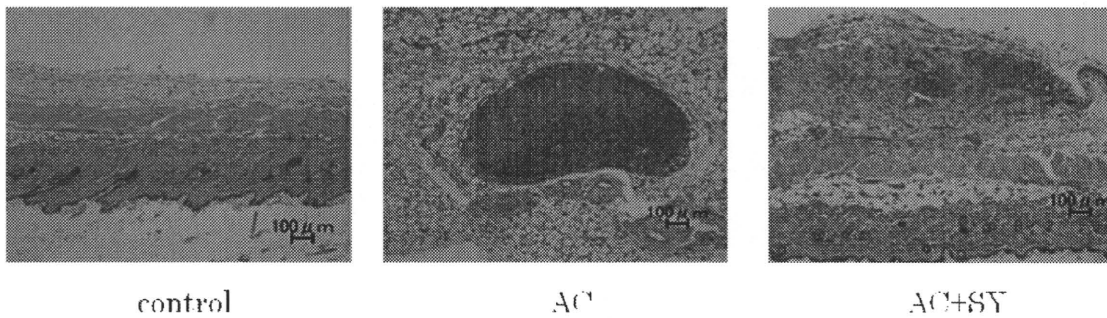


図 2-4 第 2 回造腫瘍否定試験 移植後 12 週 SafuraninO 染色

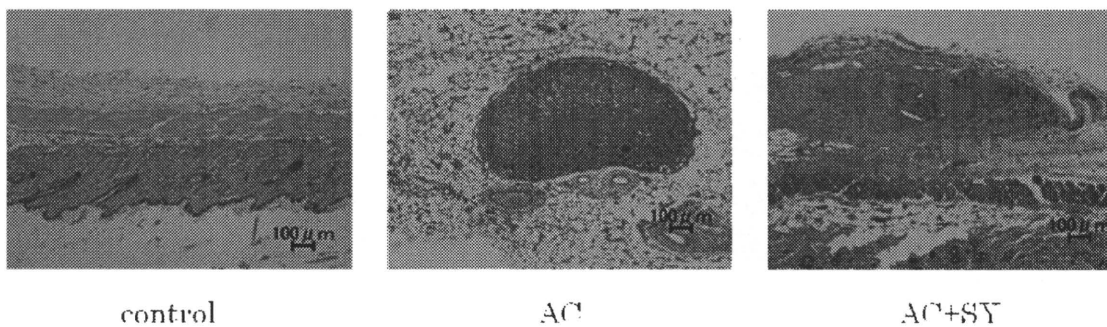


図 2-5 第 2 回造腫瘍否定試験 移植後 12 週 トルイジンブルー染色

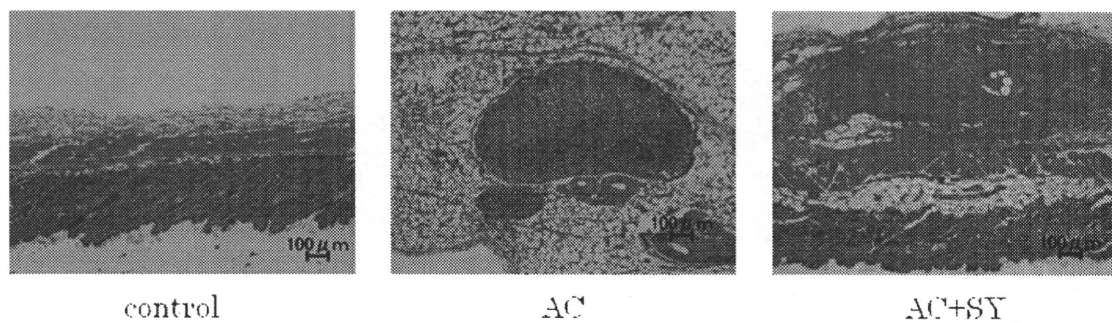


図 2-6 第 2 回造腫瘍否定試験 移植後 12 週 HE 染色

マイクロアレイを用いた各種軟骨細胞の遺伝子発現解析

研究分担者 阿久津 英憲 国立成育医療センター研究所
生殖・細胞医療研究部 生殖技術研究室・室長
研究協力者 梅澤 明弘 国立成育医療センター研究所
生殖・細胞医療研究部・部長
鵜養 拓 東海大学医学部外科学系整形外科学・大学院生

研究要旨：変形性関節症は関節の軟骨が変性・消失し痛みや機能障害を引き起こす疾患である。現在軟骨欠損に対し自家軟骨細胞を用いた移植が行われているが正常部を犠牲にしなくてはならない、採取可能なドナー部位に限りがある、高齢者では軟骨分裂能力が低いなどの欠点も指摘されており同種での細胞源の確保は非常に重要である。

1993年に miRNA と呼ばれる内在的に存在する 22 塩基前後の小さな RNA が発見され、miRNA は翻訳を抑制することにより遺伝子の制御を行っているとの報告がある。現在では 1000 種類ほどの miRNA が確認されており、人間の遺伝子の約 30% を制御しているとされている。miRNA の中には軟骨特異的に発現しているものも報告されており、軟骨代謝にも影響を与えている可能性がある。

本研究の目的は多指症・前十時靭帯損傷・変形性膝関節症の軟骨細胞の遺伝子解析を行い、軟骨細胞の幼若性や将来的な細胞ソースとしての可能性を検討した。年齢により発現が変動する遺伝子と miRNA を抽出することができた。抽出された 3 種類の miRNA の中には文献的にマウスでの軟骨代謝に関与が確認されているものが含まれており、ヒトの軟骨代謝にも影響している可能性が示唆された。

A. 研究目的

変形性関節症（以下 OA : osteoarthritis）は関節の軟骨が変性・消失し痛みや機能障害を引き起こす疾患である。OA は直接生命を脅かす疾患ではないが ADL に著しい障害を及ぼし健康寿命に多大な影響を与えている。厚生労働省国民生活基礎調査によると支援対象となる原因疾患の 1 位は関節症である。

また、国民全体の自覚症状の上位 3 疾患は腰痛・肩こり・関節痛であり、OA を罹患している患者は日本だけでも 1000 万人、世界には 2 億人と推定されており世界的にも OA の克服は重要な課題である。OA に関する国際学会 OsteoArthritis Research

Society International(OARSI)は 2009 年に膝と股関節 OA に対しエビデンスレベル (Ia) の高いレビュー全てで有効とされているものとして NSAIDs、Cox-2 阻害薬、運動療法、体重減量などを挙げている。しかし、これらの治療法は対症療法であり OA に対する根本治療は確立されておらず遺伝子診断を含めた多方面からの診断・治療が注目されている。

疫学調査などから OA は遺伝的因子と環境因子の相互作用により発症する多因子遺伝病、生活習慣病であることが明らかとなってきた。現在ゲノム情報を用いたポストゲノム技術の発展により組織・細胞内の遺伝子発現が網羅的に解析できるように

なり、遺伝子レベルでの OA 研究が進められている。その中でも代表的な技術が DNA マイクロアレイである。DNA マイクロアレイによる解析は定量性、再現性に若干の問題はあるが、ほとんどの遺伝子の mRNA の発現を調べることができる利点があり、まだ構造や機能の分かっていないタンパク質の機能を発現解析・予測する上でも重要となってきた。これまでに OA の感受性遺伝子としてアスポリン(ASPIN)^[1] やカルモジュリン 1(CALM1)^[2] が報告されてきているが他にも OA に関連した遺伝子の存在が考えられている。

1993 年には miRNA と呼ばれる内在的に存在する 22 塩基前後の小さな RNA が発見され、miRNA は翻訳を抑制することにより遺伝子の制御を行っているとの報告がある。現在では 1000 種類ほどの miRNA が確認されており、人間の遺伝子の 30% 以上を制御しているとされている。^[3] miRNA の中には軟骨特異的に発現しているものも報告されており、軟骨代謝にも影響を与えている可能性がある。

現在軟骨欠損に対し自家軟骨細胞を用いた移植が行われているが正常部を犠牲にしなければならない、採取可能なドナー部位に限りがある、高齢者では軟骨分裂能力が低いなどの欠点も指摘されており同種での細胞源の確保は非常に重要である。

そこで本研究の目的は多指症・前十時靭帯損傷・変形性膝関節症の軟骨細胞を遺伝子解析を行うことで軟骨細胞の幼若性や将来的な細胞ソースとしての検討を行うこと

が目的である。

B. 研究方法

ヒト軟骨細胞

本学臨床研究審査委員会の承認を得て、国立成育医療センター研究所で手術時に得られた多指症（6 例）の軟骨細胞を採取した。東海大学病院で手術時に得られた ACL 損傷（3 例）・変形性膝関節症（6 例）の軟骨を採取した。

方法

多指症・ACL 損傷・変形性膝関節症の手術時に得られた軟骨をコラゲナーゼ処理の後細胞を播種。それぞれに対し totalRNA を抽出。遺伝子発現（以下 GE）及び miRNA 発現解析をマイクロアレイにて行い Yub・ACL・TKA と段階的に変動する遺伝子を抽出。同様に miRNA でもマイクロアレイ施行し Yub・ACL・TKA 間で GE と miRNA 共通に変動する遺伝子を抽出した。

軟骨細胞の分離と培養

採取した軟骨組織をそれぞれシャーレ上でハサミを利用して細分し 0.005%collagenaseTYPE1(Worthington, New Jersey, USA)含有ダルベッコ変法イーグル培地 F12(F12/DMEM; Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)にて 4 時間の酵素処理を行った。酵素処理を行った軟骨組織を cell strainer (BD Falcon™) with a pore size of 100 μm に通し、細胞を遠沈回収した。軟骨細胞は 1×10^4 cells/cm² で播種 DMEM/F12 supplemented with 20% fetal

bovine serum (FBS; GIBCO, NY, USA) and 1% antibiotics-antimycotic (GIBCO, NY, USA)の培地を使用し培養、4日目以降はさらに 50 μ g/ml ascorbic acid (Wakojunyakougouyou Corp., Japan)を加えたもので維持した。全ての培養は 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ and 95% air 下で行った。

RNA 抽出

RNA 抽出は Qiagen 社製マイクロ RNA キットを使用しプロトコールに準じ RNA を抽出した。

マイクロアレイ

マイクロアレイは Agilent 社製 Human GE Microarray Kit (プローブ数 34127) と Agilent 社製 Human miRNA Microarray Kit (プローブ数 939) を用いて行った。

評価

段階的に変動する遺伝子発現の抽出方法としてまず 3 群間で ANOVA 検定を行い有意差 ($P < 0.05$) を生じたプローブを抽出。その後 Tukey を用いて Post-Hoc 検定を行い ACL-Yub 間かつ ACL-TKA 間で有意差のあるプローブを抽出。その後 K-means クラスタリングを用いて Yub・ACL・TKA と発現が段階的に変化していくプローブを抽出した。

次に GE・miRNA 解析結果を統合し共通して変動するプローブを抽出した。

GE の条件として Yub・ACL・TKA3 群間で

ANOVA 検定を行い有意差 ($p < 0.05$) があり変動一貫性のパターンをもつ遺伝子を、miRNA の条件も同じく Yub・ACL・TKA3 群間で ANOVA 検定を行い有意差 ($p < 0.05$) があり変動一貫性のパターンをもつ miRNA を使用。target scan でそれぞれの miRNA に対応する遺伝子を抽出し GE の結果と統合した。

さらに抽出された miRNA と OA 関連遺伝子・軟骨関連遺伝子とのパスウェイ解析を行い miRNA に制御されている遺伝子と OA や軟骨組織の代謝についての関係性を調べた。

C. 結果

1. 段階的に変動する GE の抽出

多指症・ACL・TKA の 3 群間で ANOVA 検定を行ったところ 34127 プローブ中 3695 プローブが抽出された。この 3695 プローブを Tukey を用いて Post-Hoc 検定を行ったところ ACL-Yub 間で有意差を生じたプローブは 1832 であり ACL-TKA 間で有意差を生じたプローブは 842 であった。ACL-Yub 間かつ ACL-TKA 間で有意差を生じたプローブは 340 プローブであった。

この 340 のプローブを K-means クラスタリングで 3 群 6 クラスターに分類し Yub・ACL・TKA と段階的に変動していくプローブを抽出した。Yub・ACL・TKA と発現が上昇していくプローブは 17 プローブが抽出され (Fig1,3)、Yub・ACL・TKA と発現が低下していくプローブは 16 プローブが抽出された (Fig2,4)。