

図 21 術後 6 ヶ月のセファログラムとプロフィログラムによる解析
成人と比較して眼窩下縁、前鼻棘、上顎中切歯においてほぼ同等な位置にあり、非常に良好な過延長であった

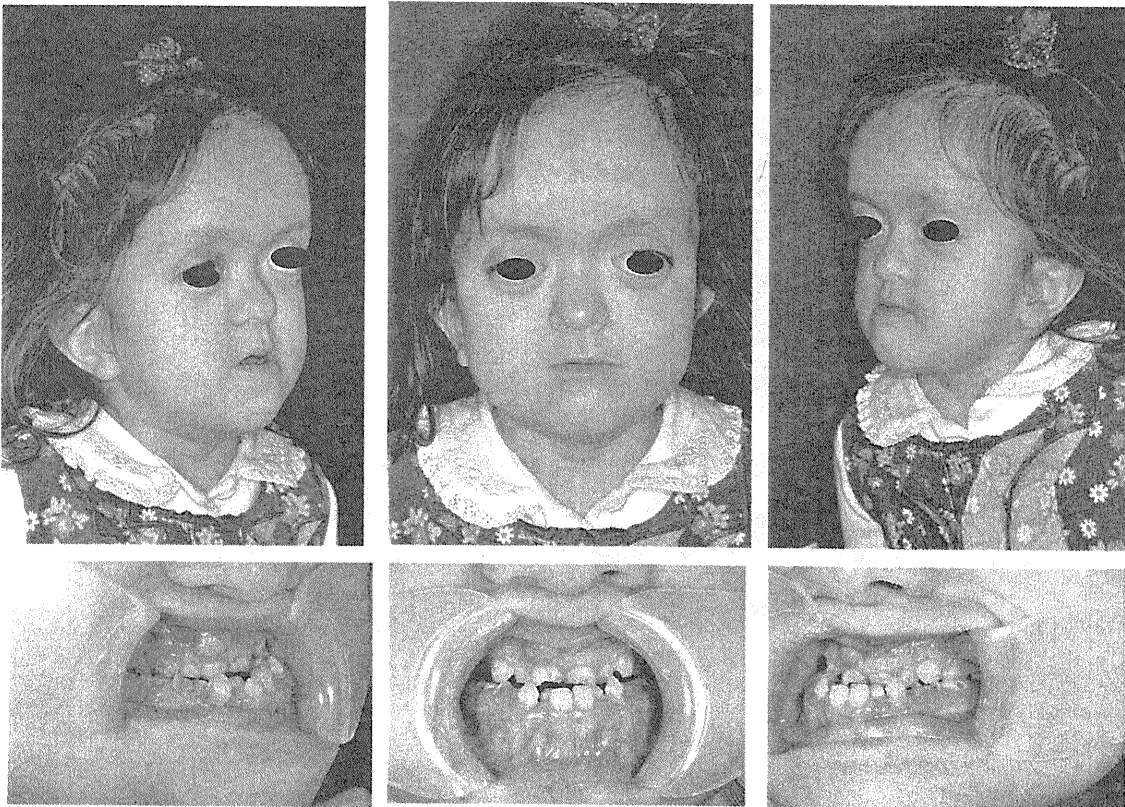


図 22 症例 5 クルーズン症候群 4 歳 女児
左：中顔面は陥凹しており、睡眠時にいびきを認め、仰向けでは時に閉塞性無呼吸を認めた。

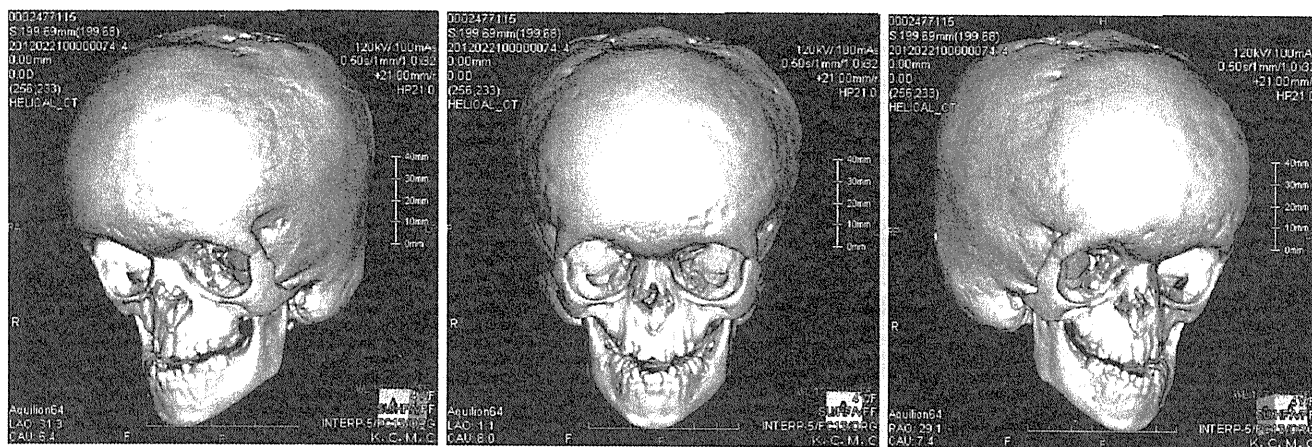


図 23 術前の 3D-CT 写真
 中顔面は陥凹している。

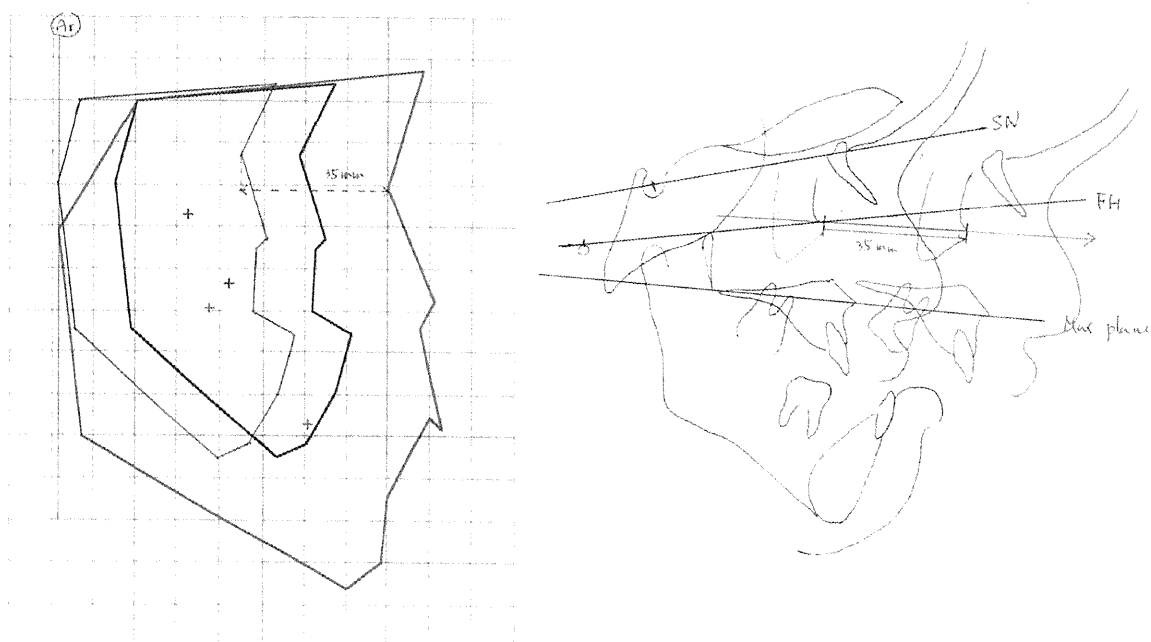


図 24 術後 6 ヶ月のセファログラムとプロフィールグラムによる解析
 左: 移動距離は、成人と比較して眼窩下縁において前方に 35mm 移動する必要がある。右: 移動方向は、FH 平面に対して 8° 下方にする必要がある。

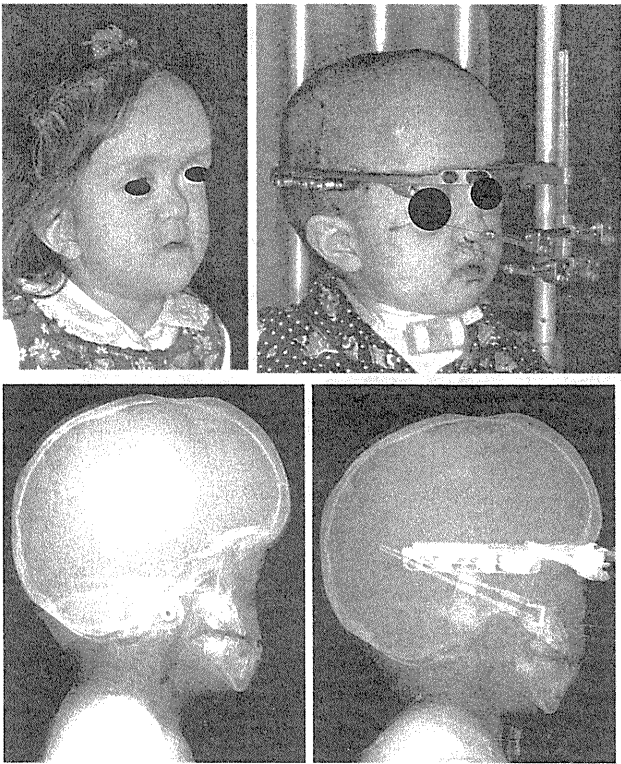


図 25

顔面骨延長術が行われ、両側頬骨を貫通する K-ワイヤが挿入された。そして、K-ワイヤに「3次元角度可変型顔面骨延長装置」が取り付けられ側頭骨に固定された。その後に K-ワイヤを介して「3次元角度可変型顔面骨延長装置」と連動する創外型骨延長装置が取り付けられた。手術 5 日後より本顔面骨延長システムにより、顔面骨が延長され、1 日に 1mm の割合で顔面骨が前方に移動されているところ。

Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
分担研究報告書

症候性頭蓋縫合早期癒合症に対する「軟骨間葉系幹細胞」を用いた軟骨再生療法
法の開発

-ヒト耳介軟骨膜由来「軟骨間葉系幹細胞」を用いた新規弾性軟骨再構築法の
開発-

研究協力者 武部貴則

分担研究者 谷口英樹

研究要旨

頭蓋・顎・顔面領域の組織変形に対する現在の標準的な治療法では、広範な変形に対する治療は困難であり、長期的な形態保持性の観点からも満足が行く臨床成績が得られていない。そこで、これらの課題を克服しうる新たな治療法の一つとして、組織再生工学を用いたヒト弾性軟骨の臨床的再構築法の開発が待望されている。我々は、低侵襲操作で採取可能なヒト耳介軟骨膜中から高い増殖能、多分化能、自己複製能などの特徴を有する軟骨幹/前駆細胞を分離することに成功した。このヒト軟骨幹/前駆細胞は、*in vitro*で耳介軟骨細胞と同等の軟骨基質産生を行うことが確認されただけでなく、重症免疫不全マウスへの皮下移植により長期形態保持性に優れたヒト弾性軟骨組織を再構築した。我々が開発したヒト弾性軟骨再構築法は、次世代の弾性軟骨再生治療の実現にとって革新的な方法となる可能性がある。

A. 研究目的

頭蓋・顎・顔面領域の先天奇形や外傷に起因する組織変形に対する新しい治療法の開発は、全世界で100万人以上の患者に待ち望まれている極めて重要な臨床的解決課題である¹。現在の標準的な治療法は、自家軟骨/骨組織を移植する方法や合成高分子化合物などの医用材料を移植する方法である²⁻⁸。しかし、自己組織移植では、採取量の制限と採取部位の侵襲が

軟骨/骨組織移植に共通した問題である。また、軟骨組織移植に伴う経年的な組織変形と吸収や、骨組織移植に伴う経月的な組織吸収も極めて大きな問題となっており臨床的に満足のいく長期成績が得られていない⁹⁻¹³。医用材料を移植する方法においても、それらが人体にとり異物であることから、感染や炎症、それらに起因する皮膚穿孔などが生じることが知られており、これらの問題が未解決である^{7,8}。このような問題点を克服することの

可能な新しい治療法として、組織再生工学を用いたヒト弾性軟骨の臨床的再構築法の開発が切望されている。

ヒト弾性軟骨の再構築法に適応可能な細胞源として、幾つかの可能性が示唆されている¹⁴⁻¹⁶。ヒト耳介軟骨細胞は良好な基質産生能などの優位性を有するものの、採取部位への侵襲に加え、自己複製能を有する幹細胞が存在しないために細胞寿命に起因する長期的な組織維持の困難性などの問題点を抱えている。骨髄由来のヒト間葉系幹細胞は、これらの諸問題を解決できる可能性を持つ細胞の一つであるが、骨髄穿刺の侵襲が大きいこと、成熟軟骨細胞への分化能が極めて低いこと、血管侵入や石灰沈着をきたすことなどの様々な問題を抱えているため実用化の可能性は低い¹⁷⁻¹⁹。他にも脂肪組織由来のヒト間葉系幹細胞など候補となる細胞は存在するものの、いずれも成熟軟骨細胞への分化能力が低く、弾性軟骨における細胞外マトリックスの産生能は全く確認されていないことから、ヒト弾性軟骨の再構築法に応用可能な優れた細胞源は見いだされていないのが現状である²⁰⁻²²。

本研究では、全く解明の進んでいない弾性軟骨における幹/前駆細胞の局在を明らかとすることを目的として、マウス耳介を対象として BrdU Labeling Assay を実施した。さらに、得られた知見を基に、ヒト軟骨幹/前駆細胞の分離・同定を、低侵襲操作で臨床的に採取が可能な耳介軟骨膜部を

対象として試みた。分離したヒト軟骨幹/前駆細胞の操作技術を検討し、臨床応用の可能な優れた弾性軟骨再構築法の開発を行った。さらに、我々が新規に開発した革新的な生分解性足場材料がヒト弾性軟骨の再構築に有用か否かを検討した。

B. 研究方法

1. Time course dependent changes in auricular morphology

ICR マウスの耳介表面積と軟骨の厚さが各週齢（生後 4 日, 1, 2, 4, 24, 48 週齢）で計測された。耳介表面積の算定は耳垂基部から耳介遠位端までの全面積とした。軟骨の厚さはアルシアンブルー染色後、耳垂基部と耳介遠位端までの等距離の部位で計測した。各々 6 匹を WinROOF software (MITANI, Fukui, Japan) を用いて計測し、平均値を算出した。

2. BrdU injection to mice

BrdU (50 μ g/g body WT) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) は、エーテル（昭和エーテル Japan）で麻酔した 4 週齢マウス ICR マウス (Japan SLC Co, Shizuoka, Japan) および妊娠 17.5 日目の母体マウスに 12 時間毎、計 6 回腹腔内投与した。4 週齢マウスでは、投与後の翌日に解析に用いた。妊娠マウスでは、生まれた仔を各週齢（新生仔～2 週齢, 4 週齢, 24 週齢, 48 週齢）の段階において解析に用いた。実験動物の飼育は横浜市立大学医学部動物実験センターに委

託し、また、取り扱いに関しては同動物実験センターの倫理規定に則り研究を行なった。

3. Tissue processing

各週齢のマウスはエーテルで麻酔し、耳介を摘出した後、2%パラホルムアルデヒド (PFA) (Wako Japan) /リン酸緩衝食塩液 (PBS) (pH7.4) で4°C, 2時間固定した。次に、100mM 塩化アンモニウム (Wako Japan) /PBS で4°C, 10分間, 3回洗浄した。そして、15%スクロース (Wako Japan) /PBS に4°C, 1時間浸した後、30%スクロース/PBS で4°C, over night で静置した。O.C.T. Compound (SAKURA Japan) (30ml) と9%スクロース/PBS (10ml) を混合した包埋剤に組織を包埋した。4°C, 3時間静置した後、液体窒素で急速凍結し、凍結ブロックを作製した。凍結ブロックをクリオスタット HM 500 O (ZEISS) で5 μ mの厚さに薄切し、凍結組織切片を作製した。

4. Immunocytochemistry staining of BrdU and Ki67

組織切片をトリス塩酸食塩液 (TBS-Ca) (pH7.6) で5分間, 2回洗浄し、賦活化 (105°, 10分間) した。室温まで冷ました後、TBS-Ca で5分間, 2回洗浄した後、Block Ace (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd, Osaka, Japan) をTBS-Ca で4倍希釈し、二次抗体作製動物の正常血清を5%添加した溶液で、1時間ブロッキングした。Block Ace をTBS-Ca で10倍に希釈した溶液に一次抗体を希釈し、4°C, over night で反応させた。用いた一次抗

体と希釈倍率は、以下の通りである。

anti BrdU antibody (sheep, 1:1200, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and Ki67 (rabbit, 1:200, abcam, MA, USA). BS-Ca で10分間, 3回洗浄した後、Block Ace をTBS-Ca で10倍に希釈した溶液に二次抗体を希釈し、1時間反応させた。用いた二次抗体と希釈倍率は以下の通りである。Cy3-conjugated Donkey anti sheep IgG antibody (1:1600, Chemicon, Temecula, CA USA) and Alexa488-conjugated Donkey anti rabbit IgG antibody (1:1200, Molecular Probes, CA, USA)

TBS-Ca で10分間, 3回洗浄した後、4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) が添加されている封入剤 VECTASHIELD (VECTOR) で封入し、倒立型システム顕微鏡 IX70 (OLYMPUS) で観察し、CCD デジタルカメラ (Zeiss, AxioCam MRc5) で撮影した。

5. Immunohistochemistry for cell surface markers

組織切片の作製と免疫組織化学染色は賦活化を省いた以外は BrdU と同様に行った。用いた一次抗体と二次抗体の希釈倍率は、以下の通りである。

α ₁-integrin (hamster, 1:100, BD Biosciences Sun Jose, CA USA), α ₂-integrin (hamster, 1:100, BD Biosciences), α ₅-integrin (rabbit, 1:100, Chemicon, Temecula, CA USA), α ₆-integrin (rat, 1:100, Chemicon), α _v-integrin (rabbit, 1:100, Chemicon), α _L-integrin

(rat,1:100,eBioscience,San Diego, CA USA), α_M -integrin antibody (rat,1:100, eBioscience), α_X -integrin (hamster,1:100, eBioscience), β_1 -integrin(hamster, 1:100,BD Biosciences), β_2 -integrin(rat, 1:100,eBiosciences), β_3 -integrin (hamster,1:100,BD Biosciences), CD44 (rat,1:100,Chemicon), Syndecan-1 (rat, 1:100,BD Biosciences),Syndecan-3 (rabbit,1:100, Santa Cruz),Syndecan-4 (rat,1:100,BD Biosciences), PECAM(rat,1:100,BD Biosciences), VCAM-1(rat, 1:100,Chemicon) , Flk-1(rat, 1:100,BD Biosciences) Cy3-conjugated Donkey anti sheep IgG antibody (1:1600, Chemicon) , Alexa488-conjugated Donkey anti sheep IgG antibody (1:1200, Molecular Probes,CA, USA) ,Cy3-conjugated Donkey anti Rabbit IgG antibody (1:1600, Jackson Immuno Research LABORATORIES, INC.West Grove,PA,USA)

6. Localization of BrdU positive cells

BrdU 投与後, 生後 0~2,4,24,48 週齡で軟骨膜組織と軟骨組織の LRC 残存比率を算出した. 軟骨膜組織と軟骨組織における一視野の背景細胞数で割った BrdU 陽性細胞数を LRC 残存比率とした. そして, 100 倍下の 5 視野の平均値から算出し, BrdU labeling Index (LI)とした.

7. Localization of Ki67 positive cells

BrdU 投与後, 生後 0~2,4,24,48 週齡で軟骨膜組織と軟骨組織の細胞分裂比

率を比較するために Ki67 染色を行った. 軟骨膜組織と軟骨組織における一視野の背景細胞数で割った Ki67 陽性細胞数の比率を 100 倍下の 5 視野の平均値から算出し Ki67 陽性細胞 Index(KI)とした.

8. Isolation and cultivation of human perichondrocytes

横浜市立大学附属病院倫理委員会より承認を得て(approval #03-074), 30 人の小耳症患者より, 手術の際に余剰となる残存耳介弾性軟骨を供与頂き研究を遂行した. 軟骨膜部を分離し, 組織を細切後, 細胞を分取した. 各組織の細胞懸濁液は 100 μ m ナイロンメッシュ (BD Biosciences) で濾過し, PBS による洗浄を 3 度行った. 細胞懸濁液は, 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 5 %に設定したインキュベータで 10 % fetal bovine serum (MOREGATE), 1 % Antibiotic Antimycotic Solution (SIGMA) を含有する Dulbecco's modified Eagle medium and Ham's F-12 medium (日水製薬) を含む増殖培地により培養を行った. 尚, 長期増殖能の評価では, 継代に際し血球計算板を用いて細胞数をカウントした後, 1200 cells/cm²の密度で 35mm ディッシュに播種し, コンフルエントに達した際に同様に継代をする, という操作を繰り返した.

9. *In vitro* colony assay

各細胞を, 35 mm 細胞培養ディッシュに 52 cells/cm²の密度で播種した. 14 日間の増殖培地による培養後, コロニ

一数のカウントを行った。カウントに際してはギムザ染色（武藤化学薬品）による染色を行った後、50 個以上の細胞集団を 1 コロニーとし定量した。

1 0. Multipotent differentiation *in vitro*

軟骨分化誘導に関しては積層化培養法を用いた。各細胞を 2.5×10^4 cells/cm² の密度で播種し、播種後 48 時間まで増殖培地で培養を行い、その後は L-ascorbic acid 2-phosphate (SIGMA), Dexamethasone (SIGMA), human-recombinant Insulin-like Growth Factor- I (SIGMA), human-recombinant basic Fibroblast Growth Factor (Wako) を添加した分化誘導培地を用いて培養を行った。5 日間の培養の後、さらに 2.5×10^4 cells/cm² の細胞を上にも播種し、同様の手順で培養を行うという操作を計 2 回繰り返した。骨および脂肪分化誘導に関しては、以前の報告に準じた³⁹。

1 1. Gene expression analysis

軟骨・脂肪・骨分化能を調べるため、Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), 並びに quantitative PCR (qPCR) を行った。RT-PCR による各分化関連遺伝子の発現の確認には以下のプライマーを用いた。type I collagen (COL1A1), type II collagen (COL2A1), type X collagen (COL10A1), aggrecan (ACAN), elastin (ELN), lipoprotein lipase (Lpl/LPL),

C/EBP α (Cebpa/CEBPA), aP2 (Fabp4), Adipsin (CFD), PPAR α (PPARGC1A), runt-related transcription factor 2 (Runx2), alkaline phosphatase (ALPL) を用いた。qPCR には, TaqMan[®] Gene Expression Assays (Applied Biosystems) の COL1A1: Hs00266273_ml, COL2A1 : Hs00164099_ml, CSPG2 : Hs01007933_ml, ELN: Hs00355783_ml, FBNI : Hs00171191_ml の primer/probe set を用いた。

1 2. ELISA

積層化培養による軟骨分化誘導下で培養 1, 3 週間目に、培養上清を回収した。上清中に分泌されたプロテオグリカン, エラスチン, コラーゲンを、それぞれ BLYSCAN, FASTIN, SIRCOL assays (Biocolor) のキットを用いて定量測定を行った⁴⁰。

1 3. *In vivo* transplantation

軟骨分化誘導を行った細胞をその産生基質とともにシリンジに回収し、重症免疫不全マウス (NOD/SCID) (三協) の背部皮下に 1 ml ずつ移植を行った。Scaffold に細胞を播種した群では、円柱上にくり抜いた pCol-HAp/ChS (Tokyo Institute of Technology), Collagen sponge (テルモ), ハイドロキシアパタイトスキャフォールド (オリンパス) に各々 3 カ所ずつ計 1ml の細胞浮遊液を添加し、NOD/SCID マウスの背部皮下に移植した。移植後、4 週目、12 週及び 40 週目に摘出を行い、組織学的に検討した。尚、実験動物の

飼育, 取り扱いに関しては横浜市立大学医学部動物実験センターの規定に基づき行った.

1 4 . Histochemical and immunohistochemical analysis

組織切片, または培養細胞を固定した後, H&E, アルシアンブルー, エラスチカ・ワンギーソン, アリザリンレッドS, オイルレッドO (武藤化学薬品) で組織化学染色を行った. 免疫組織化学染色に際しては, rabbit anti-human type I collagen monoclonal antibody (Col1) (MONOSAN), mouse anti-chicken type II collagen polyclonal antibody (Col2) (CHEMICON) を用いて 4 °C, overnight で反応させた. 洗浄後, 適切な動物種に対する Alexa488- and/or Cy3-conjugated 二次抗体 (1:800, Molecular Probes) を添加し, 室温で 1 時間反応させた. その後 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を添加した FA Mounting Fluid (BD Biosciences) にて核染色及び封入を行い, LSM510 Laser Scanning Microscope (ZEISS) を用いて観察, 画像を撮影した.

1 5 . Statistical analysis

データは, 少なくとも 3 人以上の独立した検体による実験から得た mean \pm s. d. を表記した. 統計学的解析には, まず 3 あるいは 4 群のデータに対し Kruskal Wallis-H test を行い, $P < 0.01$ と判定された場合に,

Mann-Whitney's U test with Bonferroni correction による多重比較検定を行った. 有意確率 P 値が $P < 0.001$ または $P < 0.01$ を満たす場合を統計学的有意差ありと判定した.

1 6 . 倫理面への配慮

前述検体の供与に関して, 当院の倫理委員会の承認を得て施行した. また, 患者へは目的と方法, および想定される合併症とその対処法を説明し, 文章による同意を得た. さらに倫理面へ配慮し, 研究への参加は個人の意思を尊重した. 得られたデータに関しても ID や氏名などの個人情報を含めず匿名化して行った.

C. 研究結果

Changes in the surface area of the external ear and in the thickness of the auricular cartilage

マウス耳介は生後 3 日目に周囲皮膚から離れ聳立するため, 生後 3 日目より計測した. 表面積は生後 3 日から 4 週齢までに著しく増加したが, 4 週齢以降の増加は緩やかであった. 生後 3 日, 1, 2, 4, 24, 48 週齢の表面積はそれぞれ, $9.4 \pm 0.7 \text{mm}^2$, $15.9 \pm 0.3 \text{mm}^2$, $63.0 \pm 5.3 \text{mm}^2$, $175.8 \pm 10.0 \text{mm}^2$, $191.6 \pm 3.3 \text{mm}^2$, $235.9 \pm 11.1 \text{mm}^2$ ($n=6$) であった. 軟骨の厚さは生後 2 週齢までは増加したが, それ以降は減少した. 生後 3 日, 1, 2, 4, 24, 48 週齢の耳介軟

骨の厚さはそれぞれ, $32.0 \pm 2.6\text{mm}$, $37.0 \pm 2.0\text{mm}$, $38.7 \pm 1.5\text{mm}$, $29.7 \pm 1.4\text{mm}$, $24.7 \pm 1.5\text{mm}$, $23.7 \pm 1.3\text{mm}$ (n=6)であった(Fig.1).

Auricular perichondrium contains long-term DNA label-retaining cells (LRCs)

BrdU を投与した 4 週齢マウスでは, 翌日に perichondral tissue と chondral tissue とともに BrdU および Ki67 陽性細胞は全く認められなかった(Fig.2, 3). BrdU を投与した妊娠マウスから生まれた仔では, 軟骨膜の BrdU 陽性細胞は, 新生仔から 2 週齢まで減少したが, 1 年後までわずかながら存在した. 生後 0,3 日,1,2,4,24.48 週間目の LI は $86.6 \pm 2.8\%$, $34 \pm 7.2\%$, $3.8 \pm 1.3\%$, $2.1 \pm 1.5\%$, $0.3 \pm 0.2\%$, $0.1 \pm 0.05\%$, $0.08 \pm 0.06\%$ であった. 一方, 軟骨組織の LRC は減少し続け, 4 週間目までに認められなくなった. 軟骨組織の生後 0,3 日,1,2,4,24.48 週間目の LI は $86.4 \pm 3.3\%$, $29 \pm 3.8\%$, $0.93 \pm 0.4\%$, $0.67 \pm 0.4\%$, $0.0 \pm 0.0\%$, $0.0 \pm 0.0\%$, $0.0 \pm 0.0\%$ であった (Fig. 4, 5).

Transition to a dormant state after experiencing transient amplification

軟骨膜組織の KI はすぐに減少し, 1 週目から全く認められなかった. 生後 0,3 日の軟骨膜組織の KI は, $1.5 \pm 0.8\%$, 8.5 ± 3.5 であり, 1 週目以降は $0.0 \pm 0.0\%$ であった. 一方, 軟骨組

織の KI は 2 週目まで認められた. 生後 0,3 日,1,2 週目の軟骨組織の KI は, $3.4 \pm 1.7\%$, $34 \pm 5.9\%$, $8.4 \pm 2.0\%$, $0.4 \pm 0.8\%$ であり, 4 週目以降は $0.0 \pm 0.0\%$ であった (Fig.5).

LRCs localize to the opening of the external acoustic meatus

24 週齢マウスの耳介軟骨の遠位部, 中央部, 外耳道基部における LRC の存在比率を検討した結果, 外耳道基部の軟骨膜において高率に LRC が存在していることが明らかとなった(Fig.6). LI は, 遠位部で $0.02 \pm 0.03\%$, 中央部で $0.01 \pm 0.00\%$ であったが, 外耳道基部では $23.87 \pm 0.07\%$ と高率であった (Fig.6).

Specific expressions of CD44 and integrin $\alpha 5$ in auricular perichondrium, but not chondrium

24 週齢マウスの耳介軟骨における細胞表面抗原の発現を免疫組織学的に解析した結果, 軟骨膜組織には CD44, インテグリン $\alpha 5$, $\beta 1$ が発現していた. 軟骨組織にはインテグリン $\alpha 1$, $\alpha 2$, αL , αv , $\beta 1$ が発現していた. 両者にはインテグリン $\beta 1$ がともに発現していたが, インテグリン $\alpha 6$, αM , αX , $\beta 2$, $\beta 3$, シンデカン-1,3,4, PECAM, VCAM-1, Flk-1 の発現は両者において認められなかった(Table1,).

Characterization of long-term LRCs in vitro

In vitro において 24 週齢マウスの耳介軟骨を解析した。BrdU 陽性細胞は、インテグリン α_5 と CD44 にそれぞれ二重染色された (Fig.7). この BrdU 陽性細胞は, in vitro でのコロニーアッセイの結果から, クローナルなコロニーを形成する能力を有することが明らかとなっている (Fig.8). さらに, 耳介軟骨より得られた細胞の拡大培養を行い, 軟骨分化誘導を行ったところ, アルシアンブルー染色陽性の軟骨基質を産生する細胞へと分化誘導されることが明らかとなった.

High proliferative capacity of human perichondrocytes

マウスで得られた幹/前駆細胞の局在に関する知見から, 我々は高い増殖能, 多分化能, 自己複製能, 組織再構築能などの幹細胞としての特徴を有する細胞集団は耳介軟骨膜部に存在するものと仮定した. これらの仮説を実証するため, 小耳症患者から摘出した残存耳介軟骨を対象として, ヒト弾性軟骨組織における幹/前駆細胞の分離・同定を試みた. 残存耳介軟骨を提供した患者の性別に偏りはなく, 平均年齢は 10.6 ± 1.4 歳であった. 残存耳介軟骨を外科的に摘出後, 軟骨膜部, 軟骨・軟骨膜移行部, 軟骨実質部の三層に分離し, 各々から単離した細胞をそれぞれ培養した (Fig.9a). まず各層由来細胞の増殖能を比較するため, 低密度培養 (52 cells/cm^2) によるクローン性コロニー形成能の解析を行った. 培養 4 週後, 各細胞からクロー

ン性コロニーが形成された (Fig.9b). 形成されたクローン性コロニー数は, 播種細胞 500 個あたり軟骨膜細胞で 23.9 ± 4.5 個, 軟骨膜・軟骨移行部細胞で 9.9 ± 6.8 個, 軟骨細胞で 2.3 ± 0.4 個であり, 軟骨膜細胞は他と比べて極めて高いコロニー形成能を有していた (Fig.9c).

軟骨膜細胞の長期的な増殖能を継代培養系で解析した. 形態学的には, 各層由来細胞は長期培養後 (12w~) には扁平化し, 線維芽細胞様の形態を有するようになった (Fig.9d). 196 日間にわたって 14 回の継代培養を行った結果, 9.42×10^3 個の軟骨膜細胞は, 1.20×10^{27} 個まで約 1.27×10^{22} 倍に増殖した. 一方, 9.42×10^3 個の軟骨細胞は, 1.26×10^{24} 個まで約 1.30×10^{19} 倍に増殖した. すなわち, 軟骨膜細胞は軟骨細胞に比べ約 949 倍の子孫細胞を生み出す能力を有していることが判明し, 有意に高い増殖活性をもつことが明らかとなった (Fig.9e).

In vitro elastic cartilage differentiation potential of human perichondrocytes

軟骨膜細胞の弾性軟骨への分化能を評価することを目的として, 積層化培養法を用いて軟骨細胞への分化誘導を行った (Fig.10a). 軟骨膜細胞は積層化を行うことによって, プロテオグリカン, Type II collagen (Col 2) を産生する軟骨細胞へ分化することが確認された (Fig. 10b). 軟骨膜細胞から分化した軟骨細胞は種々のムコ多

糖類を分泌するようになり、培養液は高い粘性を有する基質様性状へと変化した。

軟骨細胞への分化能を定量的に検討するため、リアルタイム PCR を用いた弾性軟骨分化関連遺伝子の発現変化を解析した。軟骨膜細胞を積層化培養することにより、弾性軟骨に特徴的な基質である versican(*CSPG2*), elastin (*ELN*), alpha 1 type II collagen (*COL2A1*), fibrillin 1 (*FBNI*) 遺伝子の発現レベルは、各々 4.2 倍, 9.6 倍, 2.1 倍, 17.2 倍に著明に上昇することが確認された (Fig. 10d-g)。一方、軟骨膜部に特徴的な alpha 1 type I collagen(*COL1A1*) の発現は 0.18 倍に低下した (Fig. 11c)。ELISA を用いて、弾性軟骨組織の細胞外マトリックスであるプロテオグリカン、エラスチン、コラーゲン産生能の解析を行ったところ、積層化した軟骨膜細胞においては各々 17.5 ± 4.3 , 235.6 ± 19.9 , $61.8 \pm 7.5 \mu\text{g/ml}$ の基質産生が確認された。驚くべき事に、この基質産生能は、同様に積層化した軟骨細胞のプロテオグリカン、エラスチン、コラーゲン産生能 (各々 19.0 ± 1.3 , 234.0 ± 16.3 , $55.8 \pm 4.9 \mu\text{g/ml}$) と同等であることが判明した (Fig. 10h-j)。

In vitro multi-differentiation and self-renewal capabilities of human perichondrocytes

軟骨細胞への分化能に加え、軟骨膜細胞の脂肪および骨分化能の有無を検討した。脂肪分化誘導培地による 3

週間の培養により、軟骨膜細胞は卵円形の形態に変化し、Oil Red O にて染色される脂肪滴を形成することが確認された。また、骨分化誘導培地による 3 週間の培養により、軟骨膜細胞は Alizarin Red S にて染色される Ca を多量に産生することが確認された (Fig. 11a 右)。軟骨細胞を対象として同様の分化誘導を行ったところ、脂肪滴形成も Ca 沈着も認めなかったことから、軟骨膜細胞のみが軟骨分化能に加え脂肪・骨への多分化能をもつ事が示された (Fig. 11a 左)。

長期間にわたって、多分化能を有した幹/前駆細胞が自己複製により維持されていることを証明するため、継代培養を行った軟骨膜細胞を対象として多分化能の解析を行った。第 3 継代, 7 継代, 10 継代培養後の各軟骨膜細胞は、細胞化学染色, RT-PCR の結果より何れも軟骨, 脂肪, 骨への多分化能を維持していたことから、これらの細胞のうち少なくとも一部は自己複製能を有している事が示唆された (Fig. 11b,c)。

In vivo tissue reconstruction capability of human perichondrocytes

我々は高い軟骨細胞への分化能や自己複製能などの特徴を有している軟骨膜細胞を用いれば、*in vivo* において優れた弾性軟骨再構築法を新規開発できるものと考えた。このアプローチの実現可能性を検討するため、ヒト軟骨膜細胞を軟骨分化誘導の後、粘

性を帯びた培養上清とともに重症免疫不全マウスの皮下に移植した。尚、比較のためヒト軟骨細胞についても同様の手順で移植を行った。軟骨膜細胞は、移植3ヶ月目に軟骨様組織形成した (Fig.12a,i, Fig.13)。組織学的解析から、軟骨膜細胞は、軟骨細胞と同様に *in vivo* で成熟軟骨細胞へと分化し、その産生基質であるプロテオグリカンや弾性線維に富む弾性軟骨組織を再構築することが判明した (Fig.12b-g,j-o)。一方、免疫組織化学染色からは軟骨膜細胞より再構築された組織においてのみ、Col 2 陽性弾性軟骨組織の周囲を Type I collagen (Col 1) 陽性の膜様組織が被覆していることが確認された (Fig.12h,p)。長期間に渡って再構築組織が維持されていることを示すため、軟骨膜細胞を移植後6ヶ月並びに10ヶ月目に摘出した組織においても同様の解析を行った。いずれの時点においても摘出組織は Col 1 陽性膜様組織で被覆されており、成熟軟骨細胞とその産生基質から構成される弾性軟骨組織であることが判明した。一方、腫瘍形成や、骨髓由来間葉系幹細胞で見られる様な線維性組織形成、血管侵入や石灰化沈着は全く観察されなかった。これらの結果から、軟骨膜細胞は *in vivo* で生体組織と同様に軟骨実質部、軟骨膜部からなる組織構造を持つ弾性軟骨組織を長期的に再構築することが判明した。

Elastic cartilage reconstruction

using newly developed scaffold

ヒト軟骨膜細胞を用いた弾性軟骨組織の再構築に有益な新規スキャフォールド(pCol-HAp/ChS)の開発を行い、既存のスキャフォールドとの比較検討を行った。pCol-HAp/ChSは、コラーゲンスポンジに、軟骨基質として知られるコンドロイチン硫酸と力学的強度を上げるためにハイドロキシアパタイト粒子を付加(incorporate)することによって得た。力学的特性では高い圧縮弾性率を有しており、電子顕微鏡観察では、その内腔は連通性に富んでいた (Fig14.a)。ヒト軟骨膜細胞を5mm X 5mm X 5mm 大のpCol-HAp/ChSに播種した後、重症免疫不全マウスの皮下へ移植した (Fig14.b)。既存のスキャフォールドと比較するために、同一条件下でハイドロキシアパタイトスキャフォールド(HAp)、コラーゲンスキャフォールド(Col)を用いた移植も実施した (Fig14.e)。移植1ヶ月後、HApを用いた移植では、弾性軟骨組織は全く再構築されていなかった (Data not shown)。Colを用いた移植では、スキャフォールドの全体的な収縮がみられ、摘出した組織は摂子による用手圧迫で容易に扁平化した (Fig14.c)。スキャフォールド全域への細胞浸潤は認められず、組織学的にも基質産生は一部に限局していた (Fig.14d)。一方、pCol-HAp/ChSを用いた移植では、表面に光沢を持つ軟骨様組織を再構築した (Fig14.f)。再構築組織の硬さは軟骨硬であり、用手圧迫後もその形態

を留める弾力性を有していた。Alcian Blue 染色からは、軟骨基質産生を行う成熟軟骨細胞が、スキャフォールド全域に Homogenous に存在していることが明らかとなった (Fig.14g)。そこで、より大型の弾性軟骨組織の再構築を目指し、直径 15mm 高さ 5mm の円柱状 pCol-HAp/ChS を用いて移植実験を行ったところ、1ヶ月後には 12mm X 12mm X 5mm 大の弾力を有するヒト軟骨様組織が再構築された (Fig.14h)。組織学的解析により、スキャフォールド全域に成熟軟骨細胞が存在し、プロテオグリカン、弾性線維の産生が認められたことから、軟骨膜細胞は pCol-HAp/ChS と共に移植することでヒト弾性軟骨組織を再構築することが判明した (Fig.14i)。

Clonal isolation of cartilage stem cells by FACS

ヒト軟骨膜細胞中に存在する幹・前駆細胞の純化に向けて、軟骨細胞に発現しておらず、軟骨膜細胞にのみ特異的に発現が確認された、CD44, CD90

抗原について解析を実施した。再構築された軟骨においてその局在を免疫組織化学染色による確認したところ、CD44・CD90 を共発現する細胞は軟骨膜組織において特異的に限局することが明らかとなった。興味深いことに、CD44・CD90 共陽性細胞は再構築過程の初期において特に存在頻度が向上していた (Fig. 15)。これは、幹前駆細胞の特徴の一つである、一過性増殖 (Transient Amplification) にあたる現象であると推測されたことから、これらのマーカーが幹細胞の純化に有用であることが示唆された。

そこで、これらのマーカーを組み合わせることで、軟骨膜細胞より幹前駆細胞の純化を試みた。FACS による Single Cell Sorting の結果から、高いコロニー形成活性を有する細胞が、CD44+CD90+細胞集団に特異的に存在することが明らかとなった。さらに、これらの細胞は多分化能を有するばかりでなく、軟骨膜組織を含む、ヒト弾性軟骨を再構築することが判明した (Fig.16)。

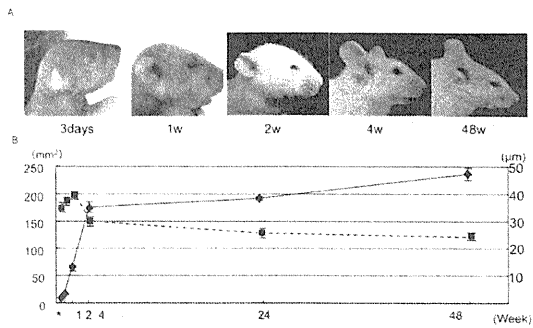


Fig.1 Development of murine external ears.

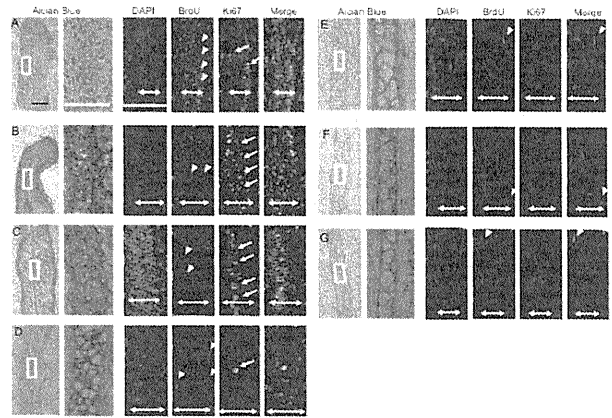


Fig.2 48-week chase analysis of BrdU-labeled cells and Ki67-positive cells.

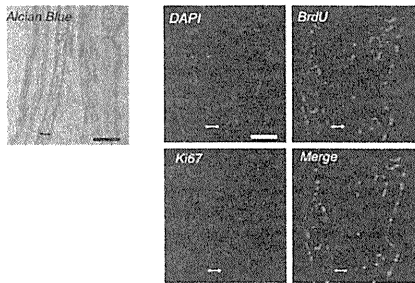


Fig.3 BrdU labeling of auricular cartilage in a 4-week-old mouse.

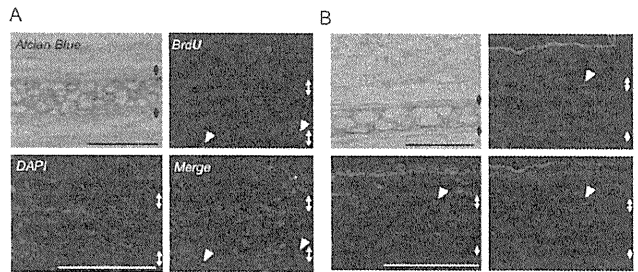


Fig.4 Long-term LRCs specifically reside in auricular perichondrium.

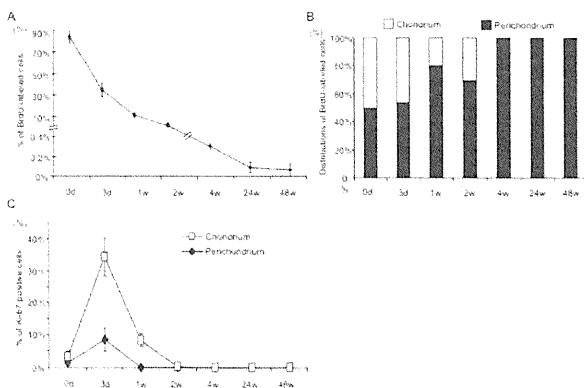


Fig.5 Presence of long-term label retaining cells in auricular perichondrium 48 weeks following birth.

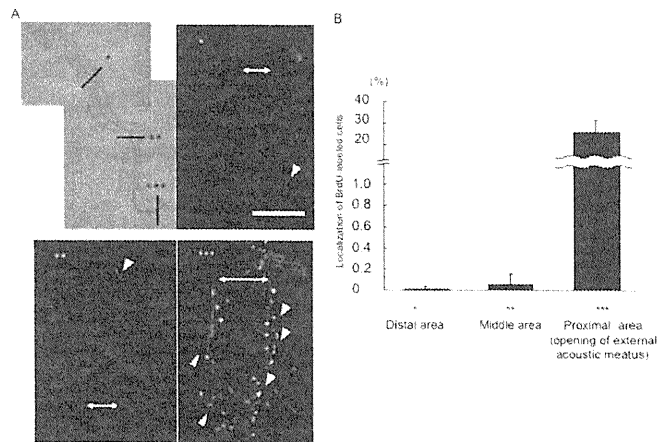


Fig.6 Localization of long-term LRCs in different parts of the external ear.

Marker	Perichondrium	Chondrium
Integrin alpha-1	-	++
Integrin alpha-2	-	++
Integrin alpha-5	++	-
Integrin alpha-6	-	-
Integrin alpha-V	-	++
Integrin alpha-L	-	++
Integrin alpha-M	-	-
Integrin alpha-X	-	-
Integrin beta-1	++	++
Integrin beta-2	-	-
Integrin beta-3	-	-
Syndecan 1	-	-
Syndecan 3	-	-
Syndecan 4	-	-
PECAM ^a	-	-
VCAM 1 ^b	-	-
Fik 1 ^c	-	-
CD44	+	-

NOTE. (-) = no immunostained cells; (+) = 0 < positive cells ≤ 5%; (++) = over 5% cells positive.
a: PECAM 1 = platelet/endothelial cell adhesion molecule
b: VCAM 1= vascular cell adhesion molecule 1
c: Fik 1 = Fetal Liver Kinase1

Table 1. Cell surface marker characterization of chondrium and perichondrium layer using 24-week-old mice auricles.

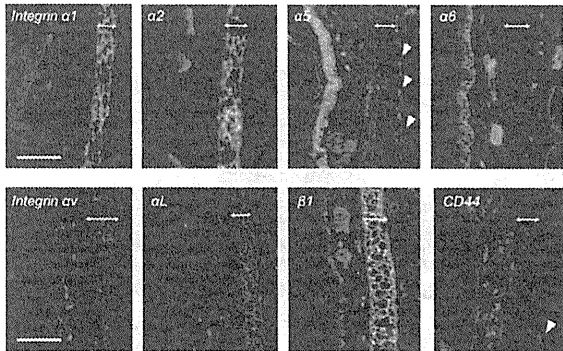


Fig.7 Immunohistochemical analysis of cell surface marker proteins in a 24-week-old mouse.

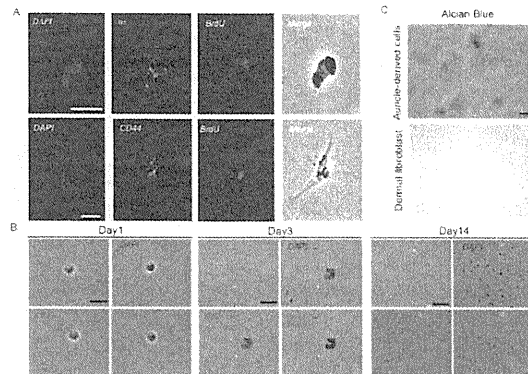


Fig.8 In vitro characterization of CD44+ integrin alpha 5+ LRCs.

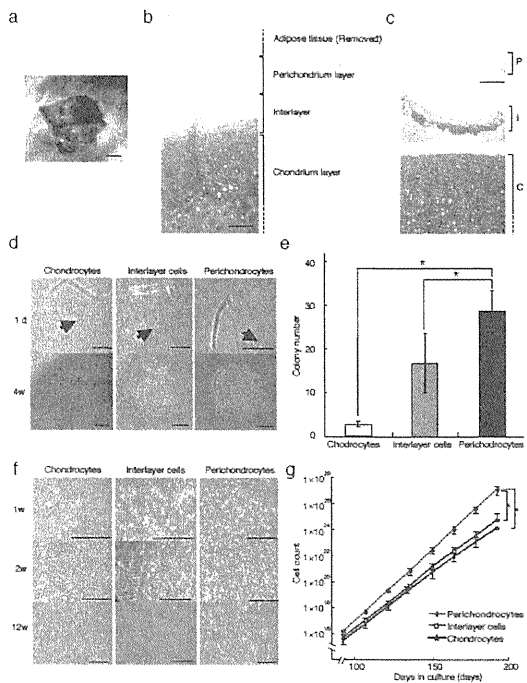


Fig.9 High proliferative capacity of human perichondrocytes

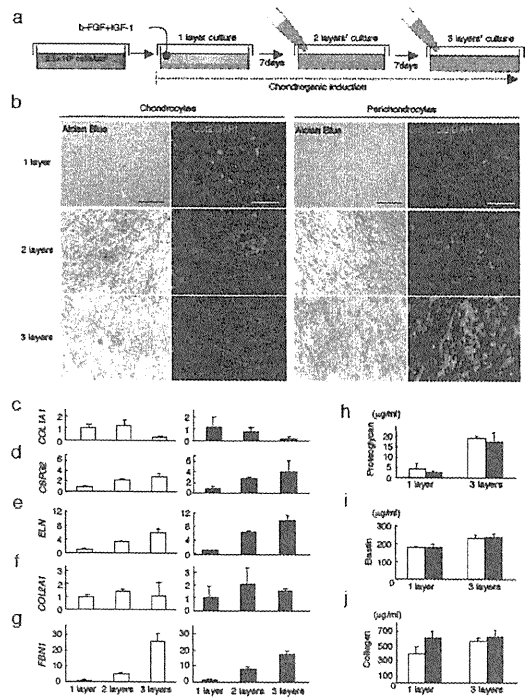


Fig. 10 In vitro chondrogenic potential of human perichondrocytes.

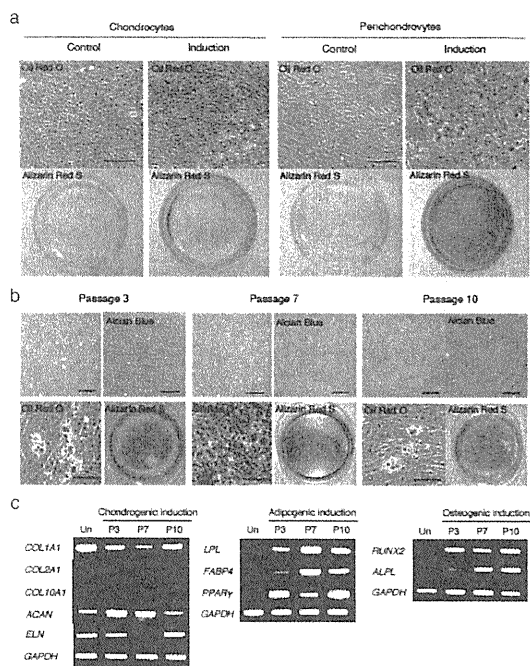


Fig.11 In vitro multi-differentiation and self-renewal capabilities of human perichondrocytes.

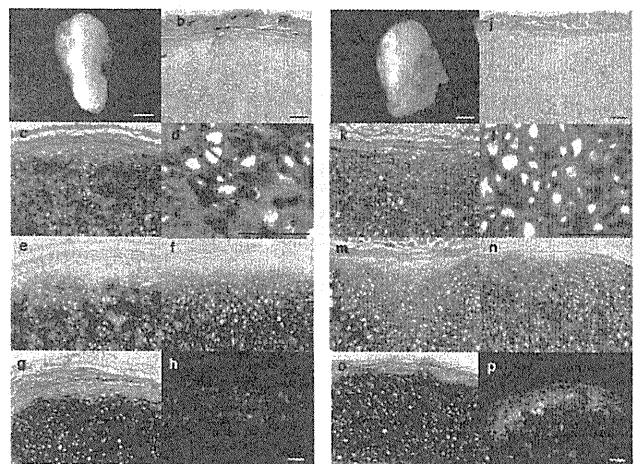


Fig.12 Elastic cartilage reconstruction capability of human perichondrocytes.

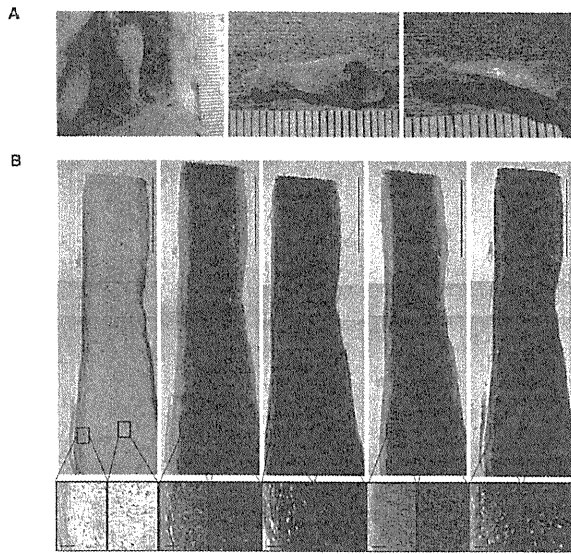


Fig.13 Reconstruction of larger human elastic cartilage by subcutaneous transplantation.

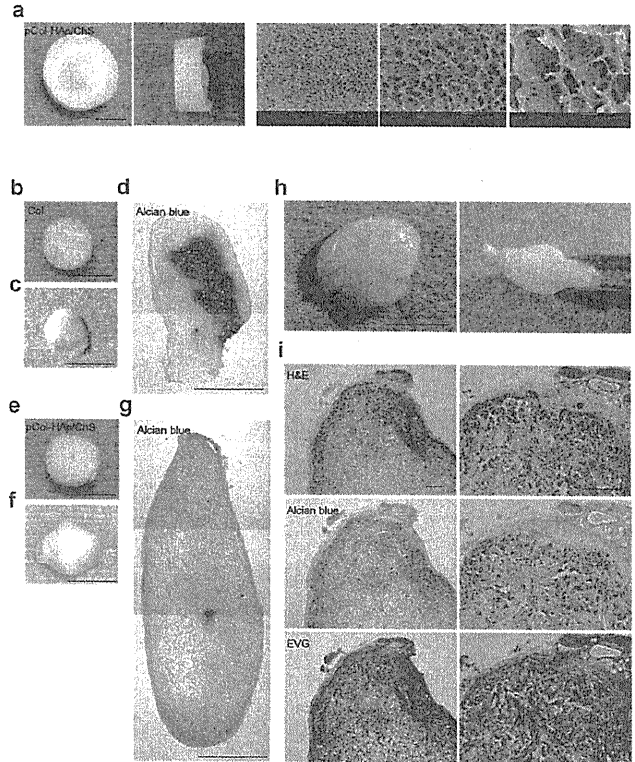


Fig.14 Reconstruction of larger elastic cartilage combined with a newly developed scaffold.

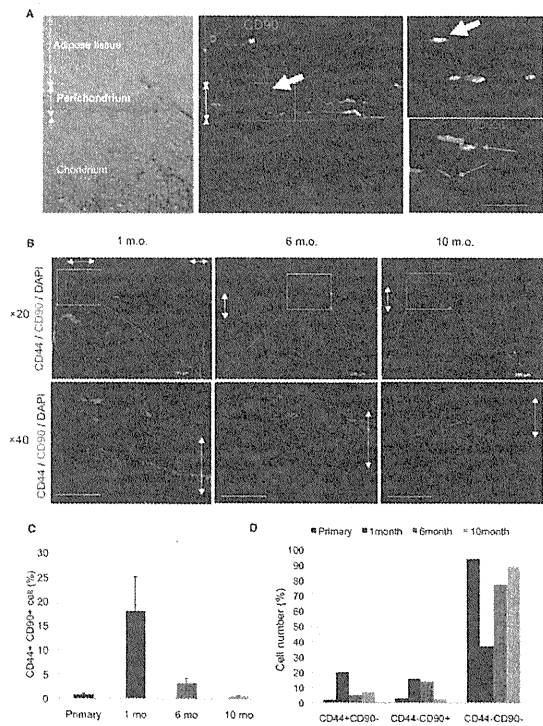


Fig.15 Transient amplification of CD44+ CD90+ putative stem/progenitor cells during cartilage regeneration process.

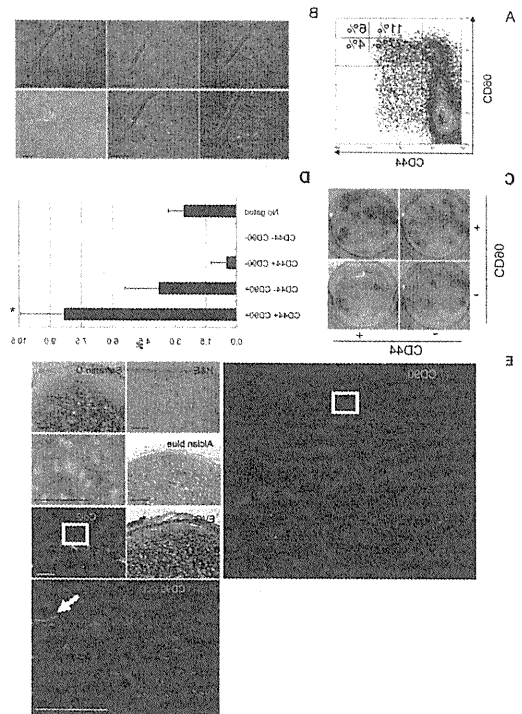


Fig.16 Clonal isolation and characterization of cartilage stem cells by CD44 and CD90.

D. 考察

本研究ではマウスの耳介弾性軟骨において、1年間にわたり LRC が軟骨膜組織の細胞にのみ局在していることを見出した。すなわち、マウス耳介の弾性軟骨幹/前駆細胞は軟骨膜組織に存在していることが示唆された。5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)による Label-retaining cells (LRC)の観察は幹細胞を同定するための一つの手法である。BrdUは細胞周期の合成期にチミジンの代わりに取り込まれ、数回の分裂までは検出可能であるが、それ以上分裂した細胞は検出が困難になる。終末分化した成熟細胞では、BrdUが検出されないが、長期間にわたり BrdUを取り込んでいる細胞が LRCとして定義される。したがって、通常の状態ではほとんど分裂しないと考えられる幹細胞を追跡する場合、生後経過した個体に BrdUを投与することや短期間の追跡は意味を持たず、発生初期に BrdUを取り取り込ませて、長期間にわたり観察する必要がある。我々は、母胎マウスに BrdUを投与することにより、間接的に胎生期のマウスの耳介軟骨形成予定部位の細胞に約 86%の高率で BrdUを取り込ませることに成功した。1年間追跡した結果、軟骨組織に BrdU陽性細胞は全く存在しなかったが、軟骨膜組織では1視野当たり約 0.08%の LRCを見いだした。したがって、この LRCは、弾性軟骨

幹/前駆細胞である可能性が高いと考えられた。また、生後4週までの耳介の発達過程において、軟骨細胞は、Ki67陽性細胞が多数見られ、激しく細胞分裂を行っていたが、軟骨膜細胞では、生後1週で Ki67陽性細胞は全く見られず、細胞分裂を停止していた。組織幹/前駆細胞は発達過程でより早く dormantになると考えられるために、これらの事実からも軟骨膜組織中の細胞に軟骨幹/前駆細胞の存在が示唆される。そこで、次に、再生医療の実現化に向けて、ヒト残存耳介軟骨を対象として、この様な軟骨幹/前駆細胞集団の分離・培養を試みた。

ヒト耳介軟骨組織における幹/前駆細胞の存在を明らかにすることは、耳介軟骨の発生過程や恒常性維持機構に対する理解を深めるだけでなく、弾性軟骨を対象とした質の高い再生治療を行う上で極めて重要である。我々は、ヒト耳介軟骨膜中に存在する、高い増殖能、軟骨・脂肪・骨分化能、自己複製能、組織再構築能を兼ね備えた幹/前駆細胞を初めて同定し、ヒト弾性軟骨組織を長期的に再構築できることを明らかにした。我々が開発したヒト弾性軟骨再構築法は、次世代の弾性軟骨再生治療の実現にとって中核的な技術となる可能性がある。

ヒト耳介などの弾性軟骨組織の臨床的再構築に使用可能な細胞源として、骨髄や脂肪組織から分離された間葉系幹細胞が重要であると考えられて