

ホルマリン固定した、Well を PBS で 3 回洗浄した。10% Block Ace を各 well に 500 μ l 添加し、1 時間室温で静置した。上清を捨て、PBS で well を 3 回洗浄した。各 well に各一次抗体 (組織免疫染色に用いたものと同じ抗体) を 200 倍希釈にて添加し 4°C で over night 静置した。Well を PBS で 3 回洗浄し、各 well に二次抗体として FITC 標識抗 rabbit-IgG 抗体 (sc-2090, Santa Cruz) および FITC 標識抗ヤギ IgG 抗体 (sc-2348, Santa Cruz) を 1000 倍希釈にて添加し、1 時間遮光で室温静置した。PBS で well を 3 回洗浄した後、細胞核染色のため 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を含む PBS で洗浄、滅菌蒸留水で well を浸して BIOREVO BZ-9000 (KEYENCE, 大阪) にて検鏡した。

8. ウシ培養軟骨細胞における AT1R および AT2R の Western blot 解析

1) 細胞培養および細胞抽出液の調整

ウシ軟骨細胞を 35 mm ディッシュに 2×10^5 個播種した。コンフルエントに達した後、IL-1 β を 0.1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, TNF- α を 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml の濃度で培地に添加した。コントロールには PBS を等量添加したのものを用いた。24 時間後、スクレイパーにて細胞および細胞外基質を剝離し、マイクロチューブに回収した。回収した細胞および細胞外基質を Sample Buffer Solution (和光純薬, 大阪) 100 μ l に融解し、96°C で 5 分間煮沸した。上清を細胞抽出液とし、うち 5 μ l を 1 アッセイごとに用いた。

2) 電気泳動および転写膜への転写

15% ポリアクリルアミドゲル (マリソル, 東京), 100 V で電気泳動を行った。マーカがゲルの下端 2 cm に達するまで泳動し、PVDF メンブレンに 100 V 200 mA で 80 分転写を行った。その後 PBS で 5 分間洗浄したのち、ブロッキング剤 (Block Ace, 雪印乳業) に室温で 60 分間浸漬した。

3) 抗体の反応と検出

0.2% polyoxyethylene sorbitan monolaurate-PBS (PBT) と Block Ace を 9 対 1 の割合で混合し、混合液を作成した。一次抗体 (組織免疫染色で用いたものと同じもの) を上記混合液にて 10,000 倍希釈した抗体希釈液を作成し、メンブレンを浸し 4°C で over night した。その後 PBT で 5 分間洗浄し、上記の混合液で 50,000 倍希釈した抗マウス IgM horse radish peroxidase (HRP) 標識抗体にて震盪しながら 1 時間、室温で反応させた。PBT で 5 分間ずつ 3 回洗浄後 ECL plus Western Blotting Detection System^R (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK) を使用し、Image Quant LAS4000 ル

ミノイメージアナライザー (GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, UK) にてシグナルの検出を行った。

8. 統計学的検討

得られた定量的データは各群の平均値 \pm 標準偏差 (SD) で示した。有意差検定として、多群間の比較において Dunnett 法を用いて対象群との比較を行った。有意水準 $p < 0.05$ を統計学的有意とした。

結 果

1. 各種軟骨組織における RAS コンポーネントの発現についての組織学的検討

8 週齢マウス 4 個体より脛骨近位端、鼻中隔、気管、脊椎骨を摘出し、さらに胎生 15 日の胎生期四肢

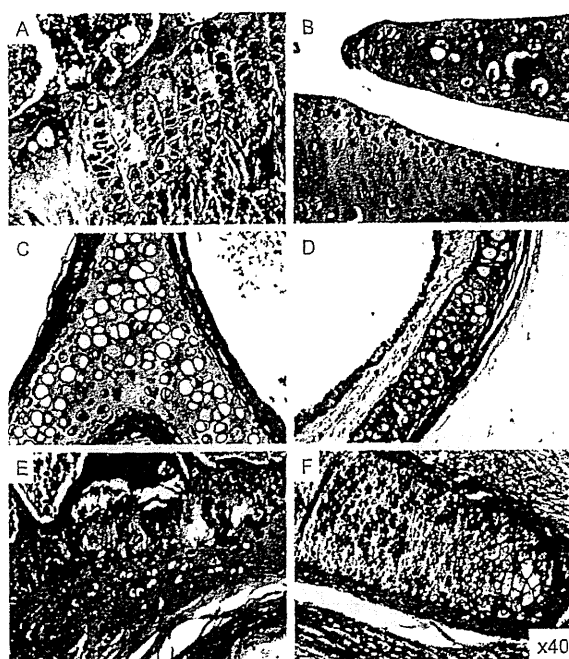


図 1 生後 8 週のマウス各軟骨組織におけるアルシアン青/アリザリン赤 S による組織二重染色の結果。(拡大率はすべて 40 倍)

- 膝関節遠位にある脛骨成長軟骨板にアルシアン青にて染色性を認める。
- 膝外側関節軟骨と外側半月板にアルシアン青にて染色性を認める。
- 鼻中隔軟骨にアルシアン青にて染色性を認める。
- 左側が気管腔であり、気管壁中心に気管軟骨を観察できる。気管軟骨にアルシアン青にて染色性を認める。
- 上方が髄腔 (*) であり、下方に向かって、成長軟骨板、椎骨終板軟骨、椎間板繊維輪、髄核 (.) である。アルシアン青にて成長軟骨板、椎骨終板軟骨、椎間板繊維輪、髄核に染色性を認める。
- 胎生 15 日マウスの四肢原基の右下が中心方向である。四肢原基全体にアルシアン青にて染色性を認める。

原基を採取した。アルシアン青でプロテオグリカン(コンドロイチン硫酸)の酸性ムコ多糖物質を検出し、染色性を認めた部位を軟骨組織(図1)とした。長管骨(脛骨)近位部の縦断面では成長軟骨板と、関節軟骨に染色性を認めた(図1 A, B)。鼻中隔の縦断面では鼻中隔の硝子軟骨部に染色性を認めた(図1 C)。気管の横断切片においては馬蹄型の気管軟骨に染色性を認めた(図1 D)。椎骨の縦断面では椎骨成長帯軟骨板、椎間板繊維輪で染色性を認めた(図1 E)。胎生15日の四肢原基では四肢原基全体に染色性を認めたが、この時点での四肢原基には血管侵入や骨髓腔の形成は認めなかった(図1 F)。

アルシアン青で染色性を認めた部位について、ACE, Ang, AT1R および AT2R の発現を組織免疫染色にて検討した。ACE の免疫染色では、長管骨成長軟骨板、椎骨成長軟骨板、胎生期四肢原基に陽性細胞を認めた(図2)。長管骨成長帯軟骨では増殖層から肥大層にかけて陽性細胞を認めた(図2 A)。また、椎骨成長軟骨板の増殖層軟骨細胞に染色性を認

めた。長管骨成長軟骨板に比べて肥大軟骨細胞の形態は小さかった(図2 E)。胎生期四肢原基では増殖層から肥大層への移行部で陽性細胞を少数認めたが染色性は低く、肥大層では陽性細胞を認めなかった(図2 F)。関節軟骨、鼻中隔軟骨、気管軟骨では陽性細胞は認めなかった(図2 B, C, D)。Ang については、長管骨成長軟骨板、椎骨成長軟骨板において、増殖層軟骨細胞から肥大層軟骨細胞にかけて染色性を認めた(図3 A, E)。関節軟骨、鼻中隔軟骨、気管軟骨、胎生期四肢原基においては陽性細胞を認めなかった(図3 B, C, D, F)。AT1R についても同様に、長管骨成長軟骨板、椎骨成長軟骨板で陽性細胞を認めた(図4 A, E)。関節軟骨、鼻中隔軟骨、気管軟骨、胎生期四肢原基では陽性細胞は認めなかった(図4 B, C, D, F)。AT2R についても同様に長管骨成長軟骨板、椎骨成長軟骨板で陽性細胞を認めた(図5 A, E)。関節軟骨、鼻中隔軟骨、気管軟骨、胎生期四肢原基には陽性細胞を認めなかった(図5 B, C, D, F)。

2. マウス骨折仮骨内軟骨性骨化部における RAS

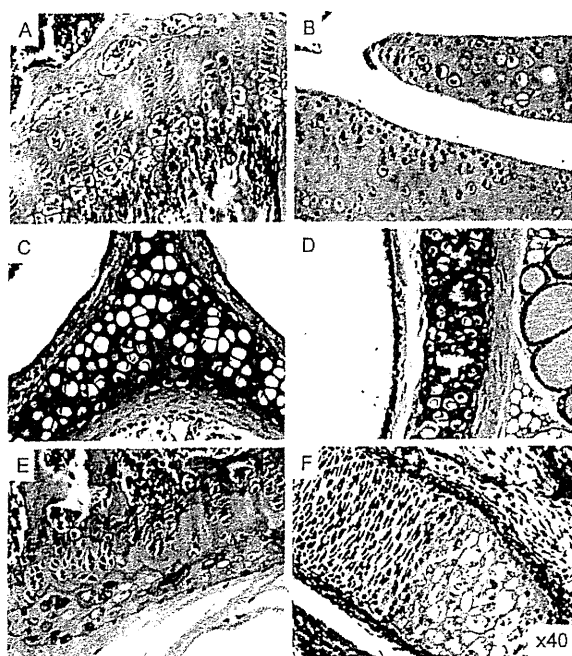


図2 生後8週のマウスの各軟骨組織におけるACE免疫組織染色の結果。(拡大率はすべて40倍)

膝関節遠位にある脛骨成長軟骨板を観察した(A)。成長軟骨板増殖層軟骨細胞(♣), 肥大層軟骨細胞(♠), 骨芽細胞(◀)に染色性を認める。関節軟骨, 鼻中隔軟骨, 気管軟骨に染色性を認めなかった(B, C, D)。椎骨骨髓から椎間板髓核を観察した(E)。成長軟骨板増殖層軟骨細胞(♣), 及び肥大層軟骨細胞(♠)に染色性を認める。胎生15日マウスの四肢原基を観察した(F)。右下が中心方向である。増殖層から肥大層に移行する部位で一部染色性を認める。

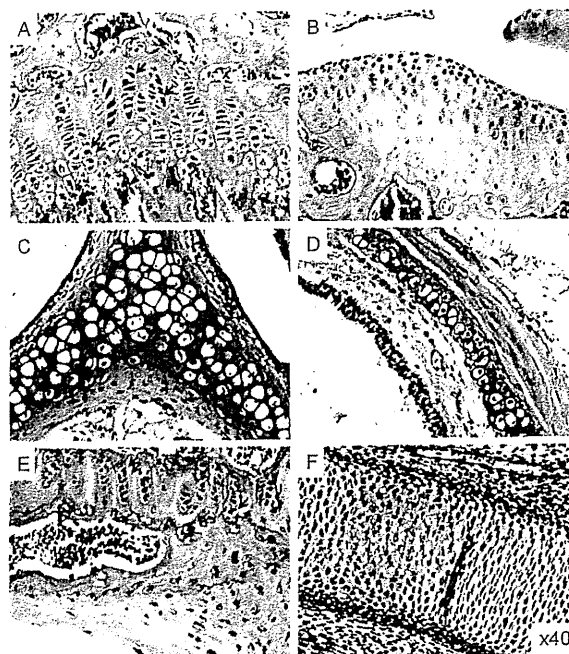


図3 生後8週のマウスの各軟骨組織におけるAng免疫組織染色の結果。(拡大率はすべて40倍)

膝関節遠位にある脛骨成長軟骨板を観察した(A)。成長軟骨板増殖層軟骨細胞(♣), 肥大層軟骨細胞(♠), 骨芽細胞(◀)に染色性を認める。関節軟骨, 鼻中隔軟骨, 気管軟骨, 胎生期四肢原基では染色性を認めなかった(B, C, D, F)。椎骨骨髓から椎間板髓核を観察した(E)。成長軟骨板増殖層軟骨細胞(♣), 及び肥大層軟骨細胞(♠)に染色性を認める。

コンポーネントの発現についての組織学的検討

骨折部仮骨には未分化な間葉系組織, 未熟な骨組織, 骨髄組織, 軟骨組織などさまざまな組織が混在していた. 特に内軟骨性骨化部に注目して, ACE, Ang, AT1R, AT2R の発現について検討した. これら4つのコンポーネントは肥大軟骨細胞の一部に発現を認めた(図6 A, B, C, D). すなわち, 軟骨細胞や肥大軟骨細胞が集簇する部分の中でも血管侵入が認められ骨化しつつある組織の周辺部で陽性細胞を多く認めた. 骨芽細胞にもこれらの4つのコンポーネントの染色性を認めたが, 成熟骨細胞には染色性を認めなかった. AT1R は RAS のその他のコンポーネントに比べて染色性が低かった(図6 C).

3. Real time PCR によるウシ培養軟骨細胞における RAS コンポーネント発現の検討

ウシ培養軟骨細胞より mRNA を抽出し, RAS コンポーネントの発現を検討した. 2-dCT 値で0.0014 から0.0028と低いレベルではあったが, AT1R および AT2R mRNA の発現が認められた. 一方, ACE および Ang の発現は認められなかった(図7). AT1R と AT2R の mRNA の発現量に有意差はな

かった(図7). したがって, 以降のウシ培養軟骨細胞を用いた実験に関しては, AT1R と AT2R に絞って検討を行った.

4. ウシ培養軟骨細胞の AT1R および AT2R の蛍光細胞免疫染色

ウシ培養軟骨細胞において AT1R, AT2R について蛍光細胞免疫染色を行った. AT1R および AT2R は細胞膜に局在が認められた(図8).

5. ウシ培養軟骨細胞における IL-1 β および TNF- α 刺激による AT1R および AT2R mRNA 発現の解析

ウシ培養軟骨細胞において IL-1 β および TNF- α 刺激による AT1R および AT2R の遺伝子発現の解析を real-time PCR を用いて行った. IL-1 β は, それぞれ0.1, 1.0, 10.0 ng/ml を培地に添加し, TNF- α は, それぞれ1.0, 10.0, 100.0 ng/ml を培地に添加し, コントロールには等量の PBS を添加した. 試薬添加後24時間培養を行なった後に RNA を抽出し, AT1R および AT2R mRNA の発現の変化を検討した. IL-1 β 刺激では用量依存性に AT1R

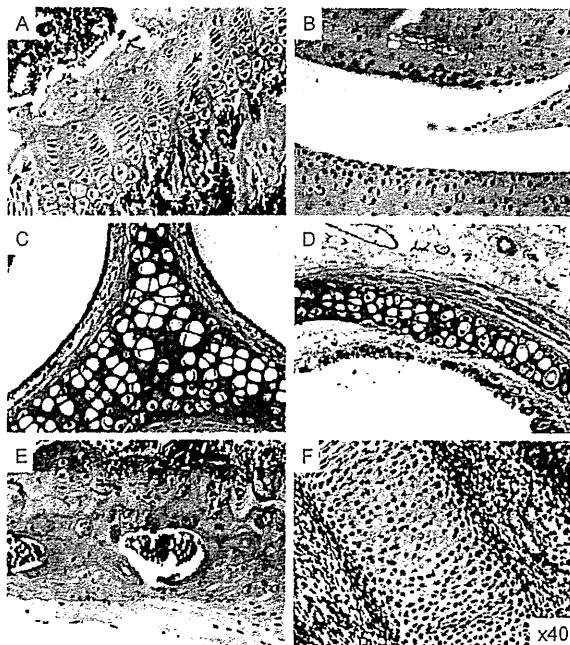


図4 生後8週のマウスの各軟骨組織における AT1R 免疫組織染色の結果. (拡大率はすべて40倍)

膝関節遠位にある脛骨成長軟骨板を観察した(A). 成長軟骨板増殖層軟骨細胞(*), 肥大層軟骨細胞(△), 骨芽細胞(◀)に染色性を認める. 関節軟骨, 鼻中隔軟骨, 胎生期四肢原基では染色性を認めなかった(B, C, D, F). 椎骨骨髄から椎間板髄核を観察した(E). 成長軟骨板増殖層軟骨細胞(*), 及び肥大層軟骨細胞(△)に染色性を認める.

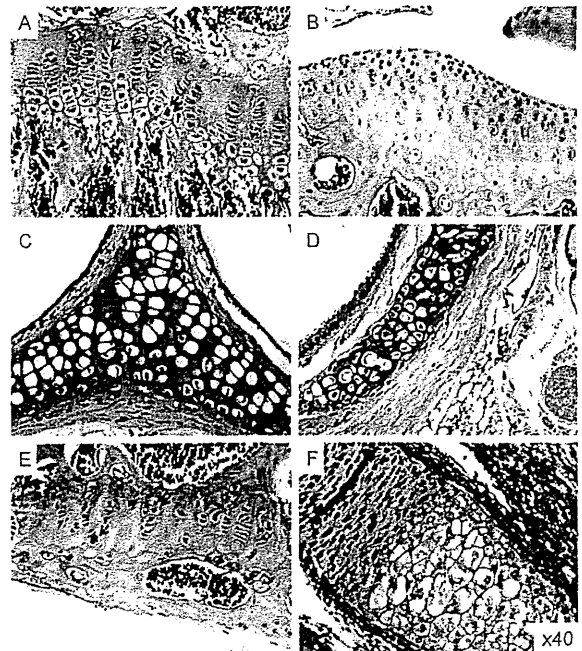


図5 生後8週のマウスの各軟骨組織における AT2R 免疫組織染色の結果. (拡大率はすべて40倍)

膝関節遠位にある脛骨成長軟骨板を観察した(A). 成長軟骨板増殖層軟骨細胞(*), 肥大層軟骨細胞(△), 骨芽細胞(◀)に染色性を認める. 関節軟骨, 鼻中隔軟骨, 胎生期四肢原基では染色性を認めなかった(B, C, D, F). 椎骨骨髄から椎間板髄核を観察した(E). 成長軟骨板増殖層軟骨細胞(*), 及び肥大層軟骨細胞(△)に染色性を認める.

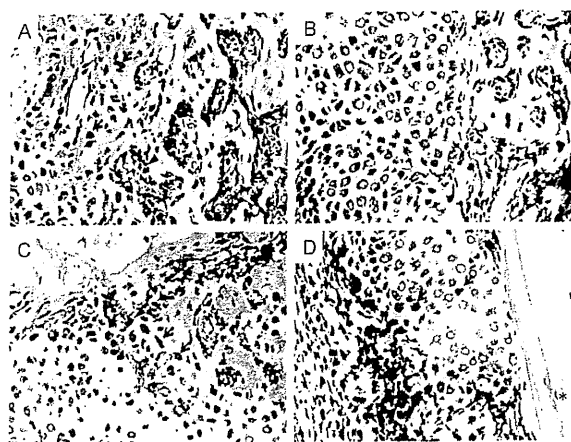


図6 骨折仮骨内軟骨性骨化部における RAS コンポーネントの免疫染色の結果。(拡大率はすべて40倍)

- A. ACE の免疫染色 左側に軟骨組織があり、一部血管侵入が観察される。右側は骨へと置換されつつある。血管侵入を認めている周囲の肥大軟骨細胞(♣)と骨芽細胞(◄)で染色性を認める。
- B. Ang の免疫染色 左側に軟骨細胞を認め、右側では骨へと置換されつつある。骨への移行部で一部の肥大軟骨細胞(♣)と骨芽細胞(◄)で染色性を認める。
- C. AT1R の免疫染色 左側に軟骨細胞を認め、右側では血管侵入を認め、骨へと置換されつつあるのが観察される。骨への移行部で一部の肥大軟骨細胞(♣)と骨芽細胞(◄)で染色性を認める。
- D. AT2R の免疫染色 左側には未分化間葉系細胞、骨芽細胞などを認め、血管侵入も認める。右側には軟骨細胞があり、肥大軟骨細胞(♣)と骨芽細胞(◄)で染色性を認める。

| | ACE | Ang | AT1R | AT2R |
|----------|-----|-----|---------------|---------------|
| mRNA発現 | — | — | + | + |
| 2-dCT±SD | ND | ND | 0.0023±0.0005 | 0.0017±0.0003 |

図7 Real-time PCR によるウシ培養軟骨細胞における ACE, Ang, AT1R, AT2R の mRNA 発現の検討。

2-dCT 値で比較し、内部コントロールには actin mRNA を用いた。0.0014から0.0028と低いレベルではあったが、AT1R および AT2R mRNA の発現を認めた。しかし、ACE および Ang の発現は認められなかった (ND: not detected)。 (N=4)。

および AT2R mRNA 発現の亢進を認めた (図9 A)。TNF- α 刺激でも同様に AT1R および AT2R mRNA 発現の亢進を認めたが、低用量での発現亢進が小さい結果であった (図9 B)。

6. ウシ培養軟骨細胞における IL-1 β および TNF- α 刺激による AT1R および AT2R 蛋白発現の解析

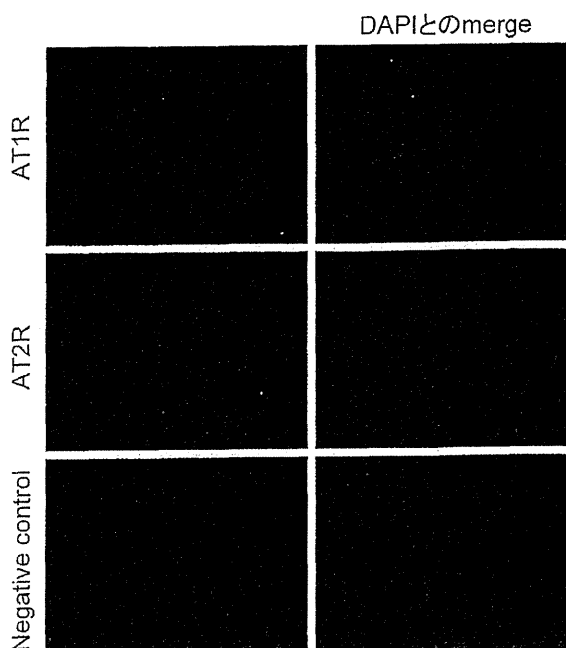


図8 ウシ培養軟骨細胞の蛍光免疫染色による AT1R, AT2R の発現の検討。右列に DAPI との Marge を表示した。AT1R, AT2R いずれの受容体も蛍光を認めた。

ウシ培養軟骨細胞において IL-1 β および TNF- α 刺激による AT1R および AT2R の蛋白発現の解析を western blotting 法を用いて行った。IL-1 β は、それぞれ0.1, 1.0, 10.0 ng/ml を培地に添加し、TNF- α は、それぞれ1.0, 10.0, 100.0 ng/ml を培地に添加し、コントロールには等量の PBS を添加した。試薬添加後24時間培養を行なった後に蛋白を抽出し、AT1R および AT2R 蛋白の発現の変化を検討した。

Western blot による検討においても、IL-1 β 刺激では用量依存性に AT1R および AT2R 蛋白の発現亢進を認めた (図9 A)。TNF- α 刺激でも同様に AT1R および AT2R 蛋白発現の亢進を認めた (図9 B)。

考 察

本研究では、これまで報告の無い正常軟骨組織において局所性 RAS が発現していることを示した。性成熟後の若年マウス (生後8週齢) における様々な硝子軟骨組織での RAS コンポーネントの発現を検討した。関節軟骨、鼻中隔軟骨、気管軟骨のごとき基本的に静止状態である軟骨組織の細胞には RAS コンポーネントの発現は認められなかった。一方、長管骨の成長軟骨板軟骨細胞、椎骨成長軟骨板軟骨細胞には RAS コンポーネントの発現が認められた。しかし、盛んに分裂増殖を行い肥大軟骨への

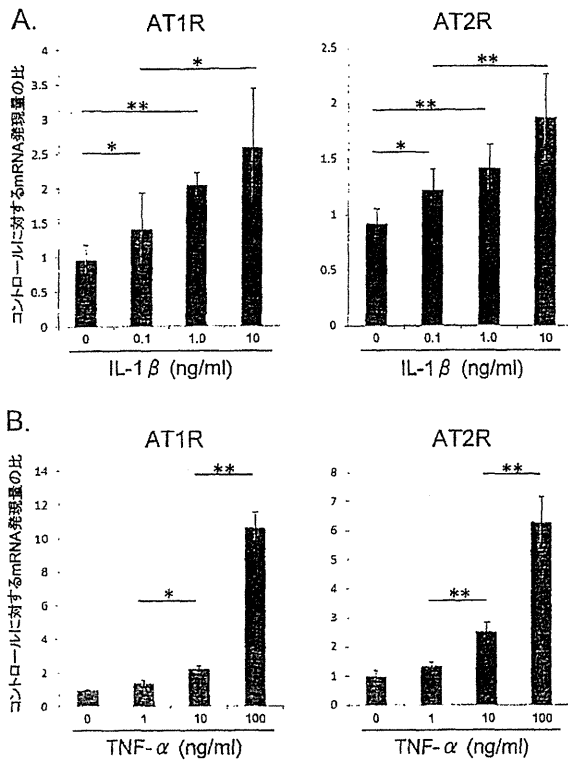


図9 ウシ培養軟骨細胞におけるIL-1 β およびTNF- α 刺激によるAT1R, AT2R mRNAの発現の変化 (Real-time PCR).

- A. IL-1 β 0.1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/mlをそれぞれ添加し24時間培養した細胞の, AT1R, AT2RのmRNAの発現をコントロール群との相対値で比較した。IL-1 β 刺激では用量依存性にAT1RおよびAT2R mRNA発現の亢進を認めた。
- B. TNF- α 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/mlをそれぞれ添加し24時間培養した細胞の, AT1R, AT2RのmRNAの発現をコントロール群との相対値で比較した。TNF- α 刺激でも同様に, AT1RおよびAT2R mRNA発現の亢進を認めたが, 低用量での発現亢進が小さい結果であった。

分化を行う胎生15日の四肢原基には発現をほとんど認めなかった。以上より, RASは発生段階での軟骨細胞の増殖や肥大化に関与しないが, 性成熟後にも骨格の成長を維持するマウス成長軟骨板の軟骨細胞の増殖と分化には関与することが推察された。今回の研究結果は, マウスの骨折仮骨内軟骨性骨化部における肥大軟骨細胞にRASコンポーネントの発現が認められるとする Garcia¹³らの所見と一致する。本研究で, 我々は脛骨骨折モデルを用いて骨折仮骨における内軟骨性骨化部分の肥大軟骨細胞にRASコンポーネントが発現することを確認した。また, 骨芽細胞にはRASコンポーネントが発現し, 骨細胞にはそれらが発現しないと過去の報告⁶⁻⁸にも, 本研究の結果は一致した。

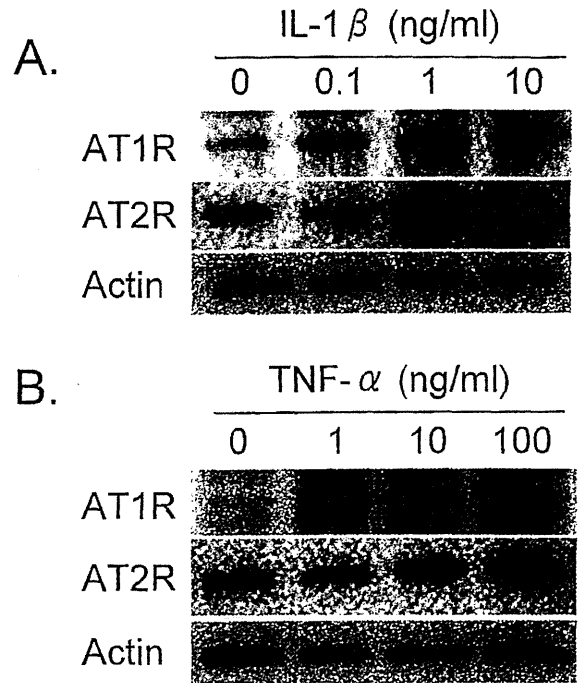


図10 ウシ培養軟骨細胞におけるIL-1 β (A) およびTNF- α (B) 刺激によるAT1RおよびAT2R蛋白発現の変化 (western blotting法)。

- A. IL-1 β 0.1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/mlをそれぞれ添加し24時間培養した細胞のAT1R, AT2Rのタンパク発現量を比較した。AT1R, AT2RはIL-1 β の用量依存性にタンパク発現の亢進を認めた。
- B. TNF- α 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/mlをそれぞれ添加し24時間培養した細胞のAT1R, AT2Rのタンパク発現量を比較した。AT1R, AT2RはTNF- α の用量依存性にタンパク発現の亢進を認めた。

長管骨の長軸方向への成長は長管骨成長軟骨板における内軟骨性骨化によって生じ, この骨化は間葉系細胞から軟骨細胞への分化と増殖, さらには軟骨細胞の肥大化および石灰化を伴う細胞死に至る一連の細胞分化の過程を経て行われる¹⁴。まず, 間葉系細胞から軟骨細胞への分化が方向付け (commitment) され, 軟骨細胞は凝集し細胞塊 (軟骨結節) を形成し, 軟骨細胞へと分化する。軟骨細胞は急速に増殖し形態を形成する。軟骨細胞は分裂の過程で柱状配列し, 軟骨細胞に特異的なII型コラーゲンやプロテオグリカンのような細胞外基質蛋白を産生する¹⁴。次いで, 軟骨細胞は分裂を停止し急速に肥大化する¹⁵。肥大軟骨細胞はX型コラーゲンおよびフィブロネクチンを産生・分泌して基質を改変させ, 炭酸カルシウムによるミネラル沈着を促進する。さらに, 肥大軟骨細胞はマトリックスメタプロテアーゼ (MMP)-13を産生し, アポトーシスによる細胞死に至る¹⁴⁻¹⁶。この一連の細胞分化過程は, 閉鎖された無

血管野で生じることより、少なくとも部分的には細胞の自律的制御によるものと考えられている。さらに、肥大軟骨細胞は血管内皮成長因子 (VEGF) を発現し、骨化方向へ向かう軟骨組織に血管を誘導する¹⁵。軟骨周囲の間葉系細胞は骨芽細胞へと分化し、分解されつつある軟骨基質の中に骨基質を形成する。このように長管骨の長軸方向への成長には、軟骨細胞の増殖と肥大分化を伴う内軟骨性骨化が極めて重要で、軟骨細胞肥大化障害は骨格の成長異常、すなわち、小人症を生じることが知られている¹⁷⁻¹⁹。

成長軟骨板は骨端側より、静止細胞層、増殖細胞層、肥大細胞層に分けられる。静止細胞層には小型の軟骨細胞が認められ、骨端側より走る血管がこの層まで認められる。増殖細胞層では、細胞が分裂増殖して扁平な細胞が柱状に配列し、骨幹端側では基質産生が行われる。肥大細胞層は成熟層、予備石灰層、石灰化層の三層に分かれる²⁰。我々が検討した RAS の 4 つのコンポーネント、ACE, Ang, AT1R, AR2R は増殖層から肥大細胞層の成熟層・予備石灰層にかけて発現が認められる。このことは、RAS が成長軟骨板軟骨細胞の増殖と肥大分化に重要な役割を果たしている可能性がある。Garcia¹³ らは骨折仮骨における骨芽細胞と肥大軟骨細胞には AT1R および AR2R, ACE が発現しており、ACE 阻害薬の投与が骨折治癒に対して促進的に働くことを示した。これは、ACE 阻害薬が RAS を抑制することにより、軟骨細胞の分化、アポトーシスを抑制したため、仮骨の増大が生じたと考えられる。すなわち、この結果は RAS が軟骨細胞の分化を促進すると考える我々の仮説を支持するものと考えられる。

さらに、我々は今後の軟骨組織における RAS の機能解析のため、ウシ培養軟骨細胞における RAS の各コンポーネントの発現を検討した。軟骨細胞培養では FBS 添加の条件下で、軟骨細胞は増殖しコンフルエンスに達する。細胞増殖が停止した条件下での Real-time PCR の結果において、検討した 4 つの RAS コンポーネントのうち、AT1R および AT2R の発現が確認された。一方 ACE および Ang の発現は認められなかった。さらに、細胞免疫染色、western blot のいずれにおいても AT1R と AT2R の発現が認められた。この培養系は、生体では RAS コンポーネントの発現が認められない関節軟骨細胞を培養系に移したもので、FBS 添加により増殖させ、コンフルエンスに達した状態での観察であり、成長軟骨板を模倣する系とは言えない。しかし、real-time PCR, 細胞免疫染色, western blot のいずれにおいても、Ang II の受容体である AT1R と AT2R の発現が認められたことは、特殊な条件下で

は軟骨細胞が RAS コンポーネントを発現しうることを示唆する。すなわち、炎症を伴う修復過程や、増殖因子添加に伴う組織増殖過程において、RAS が機能することを示唆する結果と考えられる。今後は、サブコンフルエントの培養軟骨細胞において RAS コンポーネント発現状態を観察し、RAS の組織増殖機能についてさらに検討が必要と考える。分化への検討については、成長軟骨板における軟骨細胞の骨化方向への分化を模倣する培養系として ATDC5 細胞株が樹立されており²¹。今後は培養系での RAS の機能解析に ATDC5 を用いることを計画している。さらに、IL-1 β や TNF- α の添加により、AT1R および AT2R の発現は亢進した。これらの結果は炎症性サイトカインや酸化ストレスにより RAS の活性化が生じることを示しており、心血管系培養細胞と同様の反応を示すことが確認された²²⁻²⁴。血管内皮や平滑筋細胞では局所性 RAS の存在と機能に関するエビデンスが動脈硬化症との関連において確立されており²⁵、本研究結果は軟骨組織においても RAS が機能的または病的意義を有することが示唆される所見と考える。すなわち、変形性関節症 (OA) では機械的ストレスや炎症性サイトカイン、活性酸素種による軟骨細胞の増殖と肥大分化、続いて生じるアポトーシスが軟骨組織の機能障害および変性に強く関与することが知られており、局所性 RAS は OA における炎症や、軟骨細胞増殖を促進し、軟骨細胞の肥大分化に対して作用する可能性がある。今後は、局所性 RAS と OA との関連についても検討する必要がある。

我々は本研究で、マウスにおける様々な軟骨組織において RAS コンポーネントの発現状況を免疫染色により検討した。その結果、増殖し、骨への分化を示す軟骨細胞に局所性 RAS のコンポーネントが発現することを示した。さらに、ウシ軟骨細胞培養系においても局所性 RAS のコンポーネントが発現すること、また炎症性サイトカインによるこれらコンポーネントの発現亢進を示した。この結果は成長軟骨板軟骨や OA 軟骨における生理的機能や病的機能に RAS が関与することを示唆する。長管骨や脊椎骨の成長制御や OA の病態解明・治療に新たな展開をもたらす可能性のある結果であると考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導を頂いた浜西千秋教授に深く謝意を表します。また、本研究にあたり終始御助言を頂いた高度先端総合医療センター再生部門の寺村岳士先生、竹原俊幸先生、小野寺勇太先生、ライフサイエンス研究所の奥本勝美先生、並びにご協力頂いた整形外科科学教室員の皆様、実験助手の皆様へ心から感謝申し上げます。

文 献

1. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R (2006) Physiology of local reninangiotensin systems. *Physiol Rev* 86 : 747-803
2. Alexander SPH, Mathie A, Peters JA (2009) *Guide to Receptors and Channels (GRAC)*, 4th edn. *Br J Pharmacol* 158 (Suppl. 1) : S1-S254
3. Haulica I, Bild W, Serban DN (2005) Angiotensin peptides and their pleiotropic actions. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 6 : 121-131
4. Nakagami H, Osako MK, Shimizu H, Hanayama R, Morishita R (2007) Potential contribution of action of renin angiotensin system to bone metabolism. *Curr Hypertens Rev* 3 : 129-132
5. Sernia C, Huang H, Nguyuen K, Li Y-H, Hsu S, Chen M et al (2008) Bone Homeostasis: An Emerging Role for the Renin-Angiotensin System. Springer: Dordrecht, The Netherlands.
6. Hatton R, Stimpel M, Chambers TJ (1997) Angiotensin II is generated from angiotensin I by bone cells and stimulates osteoclastic bone resorption in vitro. *J Endocrinol* 152 : 5-10
7. Hiruma Y, Inoue A, Hirose S, Hagiwara H (1997) Angiotensin II stimulates the proliferation of osteoblast-rich populations of cells from rat calvariae. *Biochem Biophys Res Commun* 230 : 176-178
8. Izu Y, Mizoguchi F, Kawamata A, Hayata T, Nakamoto T, Nakashima K et al (2009) Angiotensin II type 2 receptor blockade increases bone mass. *J Biol Chem* 284 : 4857-4864
9. Price A, Lockhart JC, Ferrell WR, Gsell W, McLean S, Sturrock RD. (2007) Angiotensin II type 1 receptor as a novel therapeutic target in rheumatoid arthritis: in vivo analyses in rodent models of arthritis and ex vivo analyses in human inflammatory synovitis. *Arthritis Rheum* 56 : 441-447
10. Koyama E, Shibukawa Y, Nagayama M, Sugito H, Young B, Yuasa T, Okabe T, Ochiai T, Kamiya N, Rountree RB, Kingsley DM, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M, Pacifici M(2008) A distinct cohort of progenitor cells participates in synovial joint and articular cartilage formation during mouse limb skeletogenesis. *Dev Biol* 316 : 62-73
11. Shirasawa S, Sekiya I, Sakaguchi Y, Yagishita K, Ichinose S, Muneta T (2006) In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells: optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells. *J Cell Biochem* 97 : 84-97
12. Kishimoto H, Akagi M, Zushi S, Teramura T, Onodera Y, Sawamura T, Hamanishi C (2010) Induction of hypertrophic chondrocyte-like phenotypes by oxidized LDL in cultured bovine articular chondrocytes through increase in oxidative stress Osteoarthritis and Cartilage OARS 18 : 1284-1290
13. Garcia P, Schwenzer S, Slotta JE, Scheuer C, Tami AE, Holstein JH, Histing T, Burkhardt M, Pohlemann T, Menger MD (2010) Inhibition of angiotensin-converting enzyme stimulates fracture healing and periosteal callus formation-role of a local renin-angiotensin system. *Br J Pharmacol* 159 : 1672-1680
14. Kronenberg HM (2003) Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 423 : 332-336
15. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K (2006) The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* 97 : 33-44
16. Ortega N, Behonick DJ, Werb Z (2004) Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends Cell Biol* 14 : 86-93
17. Takeda S, Bonnamy JP, Owen MJ, Ducy P, Karsenty G (2001) Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes Dev* 15 : 467-481
18. Ueta C, Iwamoto M, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Enomoto-Iwamoto M, Ohmori T, Enomoto H, Nakata K, Takada K, Kurisu K, Komori T (2001) Skeletal malformations caused by overexpression of Cbfa1 or its dominant negative form in chondrocytes. *J Cell Biol* 153 : 87-100
19. Vega RB, Matsuda K, Oh J, Barbosa AC, Yang X, Meadows E, McAnally J, Pomajzl C, Shelton JM, Richardson JA, Karsenty G, Olson EN (2004) Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell* 119 : 555-566
20. van der Eerden BC, Karperien M, Wit JM (2003) Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocr Rev* 24 : 782-801
21. Morita K, Miyamoto T, Fujita N, Kubota Y, Ito K, Takubo K, Miyamoto K, Ninomiya K, Suzuki T, Iwasaki R, Yagi M, Takaishi H, Toyama Y, Suda T (2007) Reactive oxygen species induce chondrocyte hypertrophy in endochondral ossification. *J Exp Med* 204 : 1613-1623
22. Han C, Liu J, Liu X, Li M (2010) Angiotensin II induces C-reactive protein expression through ERK1/2 and JNK signaling in human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* 212 : 206-212
23. Gurantz D, Cowling RT, Varki N, Frikovsky E, Moore CD, Greenberg BH (2005) IL-1 beta and TNF-alpha upregulate angiotensin II type 1 (AT1) receptors on cardiac fibroblasts and are associated with increased AT1 density in the post-MI heart. *J Mol Cell Cardiol* 38 : 505-515
24. Peng J, Gurantz D, Tran V, Cowling RT, Greenberg BH (2002) Tumor necrosis factor-alpha-induced AT1 receptor upregulation enhances angiotensin II-mediated cardiac fibroblast responses that favor fibrosis. *Circ Res* 91 : 1119-1126
25. Diet F, Pratt RF, Berry GJ, et al (1996) Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease. *Circulation* 94 : 2756-2767

On the Horizon From the ORS

Kivanc Atesok, MD, MSc

M. Nedim Doral, MD

Onur Bilge, MD

Ichiro Sekiya, MD, PhD

Topics from the frontiers of basic research presented by the Orthopaedic Research Society.

From the Institute of Medical Science, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada (Dr. Atesok), the Department of Orthopaedics and Traumatology, Hacettepe University Medical School, Ankara, Turkey (Dr. Doral), the Department of Orthopaedics and Traumatology, N.E. University Meram Faculty of Medicine, Konya, Turkey (Dr. Bilge), and the Department of Cartilage Regeneration, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan (Dr. Sekiya).

Dr. Atesok or an immediate family member serves as a board member, owner, officer, or committee member of the International Society of Arthroscopy, Knee Surgery, and Orthopaedic Sports Medicine and the Orthopaedic Research Society. Dr. Doral or an immediate family member serves as a board member, owner, officer, or committee member of the International Society of Arthroscopy, Knee Surgery, and Orthopaedic Sports Medicine. Neither of the following authors nor any immediate family member has received anything of value from or has stock or stock options held in a commercial company or institution related directly or indirectly to the subject of this article: Dr. Bilge and Dr. Sekiya.

J Am Acad Orthop Surg 2013;21: 258-259

<http://dx.doi.org/10.5435/JAAOS-21-04-258>

Copyright 2013 by the American Academy of Orthopaedic Surgeons.

Synovial Stem Cells in Musculoskeletal Regeneration

The synovium is a thin layer of connective tissue that lines the joint surface, tendon sheaths, and bursae at freely moving articulations in the body. Embryologic origin of the synovial tissue is the mesenchymal layer, which also gives rise to bone, cartilage, ligament, and muscle tissue. The synovium has several functions, including lubrication of the articulating surfaces, nutrition of articular cartilage, and regulation of immune response within the joint.

Synovial Cells

The synovium contains two main cell types: type A and type B synoviocytes. Type A synoviocytes are tissue macrophages and have phagocytic functions. Type B synoviocytes are fibroblast-like cells and function in the formation of synovial fluid.¹ In 2001, De Bari et al² isolated mesenchymal stem cells (MSCs) from the synovium (Figure 1). Type A synoviocytes can be characterized and eliminated from mixed synovial cell populations through a selective culturing process. However, type B synoviocytes and synovial-MSCs have similar phenotypic features, and specific characteristics to clearly differentiate these two cell types from each other have not been determined yet.¹

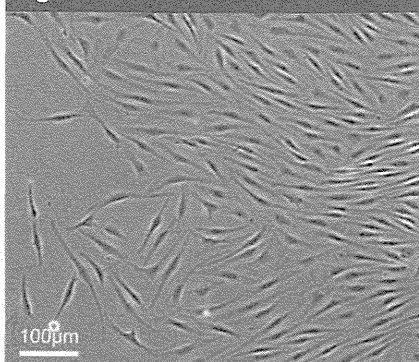
In terms of immune phenotype, there are many similarities between synovial-MSCs and MSCs of other origins. Both cell types are positive for surface markers such as CD44, CD90, and CD105. However, cells derived from synovium, including synovial-MSCs, have higher expression of CD44 (a hyaluronan recep-

tor) and can express uridine diphosphoglucose dehydrogenase, which is a vital enzyme involved in hyaluronan synthesis.³ In vitro studies have shown that synovial-MSCs have superior potential to differentiate into chondrocytes and to produce cartilage compared with MSCs of other origins.⁴ Moreover, synovial-MSCs have greater proliferation and colony-forming capacity than do other stem cell sources.⁴

Synovial-MSCs and Cartilage Regeneration

Based on the promising results from in vitro studies, investigators have launched animal model studies to evaluate the effects of synovial-MSCs in vivo. In a rabbit model with full-thickness articular cartilage defect, Koga et al⁵ demonstrated that local transplantation of synovial-MSCs results in extensive cartilage matrix formation at the defect site. These authors also observed that in the deeper zone of the defect, synovial-MSCs differentiated into bone cells, whereas synovial-MSCs at the superficial zones differentiated into chondrocytes. This observation supported the multilineage differentiation potential of synovial-MSCs according to local microenvironments in vivo. In a pig model, transplantation of synovial-MSCs into a full-thickness articular cartilage defect promoted cartilage regeneration based on arthroscopic, MRI, and histologic analysis as early as 3 months after the procedure.⁶ Bilge et al⁷ used a rabbit knee model as an in vivo culture medium to evaluate the effects of synovium on chondrocyte growth. These authors observed that cartilage grafts

Figure 1



Histologic appearance of human synovial mesenchymal stem cells under the phase contrast microscope 14 days after initial plating.

that are in direct contact with the synovium produce more chondrocytes compared with cartilage grafts that are not. Studies of animal meniscal defect models demonstrated that transplanted synovial-MSCs adhere to sites of meniscal injury, differentiate into cells resembling meniscal fibrochondrocytes, and enhance meniscal regeneration.^{8,9}

Sporadic human studies have reported that the number of synovial-MSCs in synovial fluid increases in knees with degenerated cartilage and osteoarthritis and following intra-articular ligament injury.^{10,11} This observation raises the question whether the number of synovial-MSCs that are mobilized from synovium into synovial fluid increases according to the degree of cartilage degeneration as part of the reparative process. Human trials investigating the effects of intra-articular synovial-MSC transplantation to promote cartilage regeneration and/or to prevent osteoarthritis should answer this question.

Application of Synovial-MSCs for Bone, Tendon, and Muscle Regeneration

Synovial-MSCs may offer an alternative cell-based treatment strategy for

bone, tendon, and muscle regeneration. In a rabbit bone defect model, Matsusaki et al¹² demonstrated that using tissue-engineered construct derived from synovial-MSCs with hydroxyapatite accelerates osteoinduction. In a rat Achilles tendon graft model, synovial-MSC implantation into bone tunnel accelerated early remodeling of tendon-to-bone healing.¹³ Another rat model study showed that synovial-MSCs have myogenic potential and contribute to skeletal muscle regeneration in vivo.¹⁴ In spite of these reports, there is not sufficient evidence regarding osteogenic and myogenic potential of synovial-MSCs compared with bone marrow- and muscle-derived MSCs.

Future Perspectives

In vitro and animal model studies support the use of synovial-MSCs in cartilage regeneration as an important, arguably superior, cell-based treatment alternative. Further investigations in the near future should help in our understanding the complexity of synovial-MSC biology in terms of isolation, characterization, culturing, distinguishing from, and interacting with other cell types before this promising cell-based therapy can be translated into clinical practice.

References

1. Fox DB, Warnock JJ: Cell-based meniscal tissue engineering: A case for synoviocytes. *Clin Orthop Relat Res* 2011;469(10):2806-2816.
2. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP: Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001;44(8):1928-1942.
3. Jones BA, Pei M: Synovium-derived stem cells: A tissue-specific stem cell for cartilage engineering and regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2012;18(4):301-311.
4. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T: Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: Superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum* 2005;52(8):2521-2529.
5. Koga H, Muneta T, Ju YJ, et al: Synovial stem cells are regionally specified according to local microenvironments after implantation for cartilage regeneration. *Stem Cells* 2007;25(3):689-696.
6. Nakamura T, Sekiya I, Muneta T, et al: Arthroscopic, histological and MRI analyses of cartilage repair after a minimally invasive method of transplantation of allogeneic synovial mesenchymal stromal cells into cartilage defects in pigs. *Cytotherapy* 2012;14(3):327-338.
7. Bilge O, Doral MN, Atesok K, et al: The effects of the synovium on chondrocyte growth: An experimental study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2011;19(7):1214-1223.
8. Horie M, Driscoll MD, Sampson HW, et al: Implantation of allogeneic synovial stem cells promotes meniscal regeneration in a rabbit meniscal defect model. *J Bone Joint Surg Am* 2012;94(8):701-712.
9. Horie M, Sekiya I, Muneta T, et al: Intra-articular injected synovial stem cells differentiate into meniscal cells directly and promote meniscal regeneration without mobilization to distant organs in rat massive meniscal defect. *Stem Cells* 2009;27(4):878-887.
10. Morito T, Muneta T, Hara K, et al: Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47(8):1137-1143.
11. Sekiya I, Ojima M, Suzuki S, et al: Human mesenchymal stem cells in synovial fluid increase in the knee with degenerated cartilage and osteoarthritis. *J Orthop Res* 2012;30(6):943-949.
12. Matsusaki M, Kadowaki K, Tateishi K, et al: Scaffold-free tissue-engineered construct-hydroxyapatite composites generated by an alternate soaking process: Potential for repair of bone defects. *Tissue Eng Part A* 2009;15(1):55-63.
13. Ju YJ, Muneta T, Yoshimura H, Koga H, Sekiya I: Synovial mesenchymal stem cells accelerate early remodeling of tendon-bone healing. *Cell Tissue Res* 2008;332(3):469-478.
14. De Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch JR, Raymackers JM, Luyten FP: Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol* 2003;160(6):909-918.

Comparative sequential morphological analyses during *in vitro* chondrogenesis and osteogenesis of mesenchymal stem cells embedded in collagen gels

Shizuko Ichinose · Motoki Tagami ·
Takeshi Muneta · Hitoshi Mukohyama ·
Ichiro Sekiya

Received: 7 September 2011 / Accepted: 17 January 2012 / Published online: 17 January 2013
© The Japanese Society for Clinical Molecular Morphology 2013

Abstract Chondrogenesis and osteogenesis during fetal development and postnatal growth constitute one of the most interesting and complicated subjects in biology. In this study, bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) were embedded in collagen gel, cultured in chondrogenic or osteogenic medium, and compared morphologically during chondrogenic and osteogenic differentiation sequentially by light and electron microscopy and immunohistochemical examination. Before induction, the MSCs were dispersed and round in the collagen gel. At day 1, MSCs with a large number of short processes produced

extracellular fibers whose immunoreactivity was positive for collagen type I. At day 3, the shape of MSCs changed from round to elongated. Gap junctions positive for connexin 43 were also observed. At day 7, remarkable morphological differences were first observed during chondrogenesis and osteogenesis. The shape of MSCs changed to polygonal without cell processes during chondrogenesis, while MSCs remained spindle shaped with long processes during osteogenesis. Concurrently, collagen type II during chondrogenesis and osteocalcin during osteogenesis were first detected. At day 21, chondrogenesis and osteogenesis of the MSC/collagen composite further progressed, respectively. *In vitro* chondrogenesis and osteogenesis using an MSC/collagen composite clarified the morphological differences.

S. Ichinose (✉)
Research Center for Medical and Dental Sciences,
Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima,
Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan
e-mail: ichinose.bioa@tmd.ac.jp

M. Tagami
Department of Medicine, Sanraku Hospital, Tokyo, Japan

T. Muneta
Section of Orthopedic Surgery, Graduate School,
Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

T. Muneta
Global Center of Excellence Program for International Research
Center for Molecular Science in Tooth and Bone Disease,
Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

H. Mukohyama
Department of Oral Surgery, Minato Red Cross Hospital,
Yokohama, Japan

I. Sekiya (✉)
Section of Cartilage Regeneration, Graduate School,
Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima,
Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan
e-mail: sekiya.orj@tmd.ac.jp

Keywords Human mesenchymal stem cells · Mesenchymal stem cell–collagen composite · *In vitro* chondrogenesis and osteogenesis · Cell–cell interaction · Differentiation

Introduction

Most bones develop through a process known as endochondral ossification [1]. Cartilage and bone formation during fetal development and postnatal growth is one of the most interesting and complicated subjects in biology. One speculation is that common progenitors contribute to both cartilage and bone development. However, the common progenitors cannot be distinguished from other cells making it difficult to perform morphological analyses of the common progenitors during both cartilage and bone formation. To address this problem, a simple experimental system is required.