

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20503

研究課題名(和文) 遊走型間質細胞が形成する微小環境の機能解明と組織再生療法への応用

研究課題名(英文) Biological functions of micro-cellular environment derived from stromal cells and its application for cartilage regeneration.

研究代表者

稲木 涼子 (INAKI, RYOKO)

東京大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：90632456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨再生モデルを使用し、組織再生に伴い形成される間質細胞由来の細胞微小環境に関して、周囲軟骨細胞や再生軟骨に及ぼす生物学的作用を検討した。間質細胞由来の微小環境は、軟骨再生に伴い軟骨細胞周囲に構築され、近接する軟骨細胞から分化が進行することが示された。また、軟骨細胞と間質細胞の共培養の検討から、軟骨細胞と共存する間質細胞では一部の遺伝子発現が誘導され、軟骨細胞の分化促進に寄与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In transplantation model of tissue-engineered cartilage, a micro-cellular environment derived from stromal cells, which was called niche, formed around chondrocytes with tissue regeneration. In this study, biological functions of micro-cellular environment derived from stromal cells was investigated to clarify its effect on chondrocytes and tissue-engineered cartilage. The results showed that chondrocytes adjacent to stromal cells promoted the differentiation in transplantation model of tissue-engineered cartilage, and stromal cells co-localized with chondrocytes induced the expression of specific genes in vitro experiments. In cartilage regeneration, it was suggested that the construction of micro-cellular environment derived from stromal cells supported the differentiation of chondrocytes and the maturation of tissue-engineered cartilage.

研究分野：医歯薬学

キーワード：再生医療 軟骨再生 細胞周囲微小環境 間質細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、各種生体内における細胞周囲微小環境「ニッチ」の働きに注目が集まっている。骨髄幹細胞における幹細胞特性維持に重要な役割を果たすことを始めとし、その他の細胞においても、近接する細胞の増殖や分化を調整する細胞微小環境「ニッチ」という場の重要性が注目されている。従来ニッチの形成には、目的部位の周囲から動員される常在型間質細胞が関与すると考えられていた。しかし、血中内に存在する骨髄由来の間質細胞：遊走型間質細胞 (circulating fibrocyte) の存在が確認され、常在型のみならず遊走型間質細胞もニッチの形成に関与していることが明らかとなった。加えて、癌浸潤や組織修復の場のような組織改変が活発な場においては、遊走型間質細胞がより重要な機能を発揮することが確認されている。

申請者の施設では、自家培養軟骨細胞と足場素材：ポリ-L-乳酸 (PLLA) 多孔体を組み合わせた三次元型再生軟骨を開発し、口唇口蓋裂による重篤な鼻変形の修正に利用する臨床試験を行ってきた (JPRN-UMIN000005472)。この方法は、採取した耳介軟骨細胞を標的部位に移植し、生体内での再生を促すメカニズムを利用しているが、生体内での再生誘導機構に関しては未だ不明な点が多い。申請者は、予備実験において、移植後の再生軟骨の成熟 (移植した軟骨細胞の軟骨組織への分化) の進行に伴い、再生軟骨周囲に線維芽細胞を主体とした間質組織が形成されることを確認した。この結果から、軟骨再生の場においても軟骨細胞周囲に間質細胞に由来する細胞周囲微小環境が構築され、軟骨細胞の分化を支持していることが推測された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、組織再生の場における遊走型間質細胞の働きに着目し、この遊走型間質細胞が構成する細胞周囲微小環境による再生誘導機構を解明することである。

3. 研究の方法

組織再生モデルとして再生軟骨皮下移植モデルを使用し、軟骨再生に伴い動員される常在型間質細胞、および遊走型間質細胞の機能を明らかにする。また、これら間質細胞により形成される細胞微小周囲環境が組織再生へ及ぼす効果を解明する。

①再生軟骨皮下移植系における間質組織形成の解析

再生組織の移植モデルとしてマウス再生軟骨皮下移植モデルを作製した。純系マウス C57Bl/6J の耳介軟骨組織から単離、培養した軟骨細胞とアテロコラーゲンを混和し、足場素材：ポリ-L-乳酸 (PLLA) 多孔体に播種して作製した再生軟骨を、同系マウス皮下へ移植した。移植後の再生軟骨および周

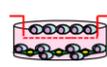
囲組織を経時的に採取し、組織学的・免疫組織化学的解析を行い、マウス組織再生モデルにおける組織再生および間質組織形成の解析を行った。

②間質細胞による培養軟骨細胞に対する支持機能の解析

間質組織を形成する間質細胞の軟骨細胞に対する支持機能を評価するため、ヒト耳介軟骨細胞とマウス間質細胞を共培養し、軟骨分化に関する検討および相互作用の解析を行った。間質細胞には、間質組織構築の主体となる線維芽細胞を使用した。

ヒト耳介軟骨細胞とマウス間質細胞 (皮膚由来線維芽細胞) を 100:0、95:5、50:50、0:100 の割合で混和し平面培養、三次元培養、非接触培養系による共培養、を行った。各培養条件下、軟骨分化誘導培地 (Liu, Hoshi et al. 2007 J Bio Chem) とコントロール培地 (DMEM/F12) にて 1 週間培養し、ヒトおよびマウスそれぞれに種特異的なプライマーを使用し、軟骨細胞、間質細胞における遺伝子発現を検討した。

三次元培養に関しては、1%アテロコラーゲンゲルに両細胞を混和し、ペレットを作製 (2.0 × 10<sup>5</sup> cells/ペレット) した。非接触系の共培養では、トランスウェルを用いてヒト軟骨細胞とマウス間質細胞との非接触共培養を行った。上層のトランスウェルにヒト軟骨細胞 (hChon) を播種し、下層のウェルでヒト軟骨細胞 (hChon) とマウス間質細胞 (線維芽細胞 (mFib)) の共培養を行い、非接触のトランスウェル上ヒト軟骨細胞に対する共培養の影響を調査した。間質細胞の混在比率は、ヒト軟骨細胞とマウス間質細胞との総数において、hChon 対 mFib が 100:0 (混合無し)、95:5 (低比率)、50:50 (高比率)、0:100 (線維芽細胞のみ) の比率になるよう細胞数を決定した。上層トランスウェルには 44 万細胞、下層ウェルには 100 万細胞とし、共にコンフルエント状態で 1 週間培養を行った (図 1)。



		混合無し (100:0)		低密度 (95:5)		高密度 (50:50)		線維芽細胞 (0:100)	
hChon	mFib	44	0	44	7	44	72	0	100
hChon	mFib	100	0	93	7	28	72	0	100

図 1：トランスウェルを用いた非接触系共培養での検討

③間質細胞が発現する再生誘導因子の同定

微小環境を構築する間質細胞において、発現する再生誘導因子の同定に取り組む。②項の方法に準じ、三次元培養系を用いて三次元培養を行い、共培養に伴い変化するマウス間質細胞での遺伝子発現変化を解析する。ヒト耳介軟骨細胞とマウス間質細胞 (皮膚由来線維芽細胞) を 100:0、95:5、50:50、0:100 の割合で混和し、各条件下で培養した細胞の

RNA を採取し、マイクロアレイ法 (Affymetrix 社製 Gene Chip Mouse Genome430 2.0 Array) にてマウス間質細胞における遺伝子変化を網羅的に解析する。混在無しの間質細胞(0:100)を対照群とし比較して、共培養に伴い間質細胞において高発現する遺伝子を候補遺伝子とする。

#### 4. 研究成果

##### ①再生軟骨皮下移植系における間質組織形成の解析

移植後の再生軟骨は、移植後 2 週から 8 週にかけてトルイジンブルー染色でのメタクロマジーが増加し、再生軟骨組織の成熟が進行した。移植後 8 週後の再生軟骨組織は、トルイジンブルー (TB) 陽性の豊富な軟骨基質を認め、HE 所見では軟骨再生領域に近接して存在するエオジン好性の線維様組織による間質組織の形成が観察された (アスタリスク)。また、軟骨再生領域における豊富な II 型コラーゲン (COL2) の局在と、線維性組織に特有の I 型コラーゲン (COL1)、フィブロネクチン (FIB) 陽性の間質組織が軟骨再生領域を取り囲み、軟骨再生領域周囲に微小環境を構築していることが確認された。加えて、この間質組織と近接した軟骨細胞から順に成熟が進行する様子が観察された (図 2)。また、再生初期においては、CD34 陽性の間質細胞が主体となり軟骨細胞周囲に間質組織を構築しており、再生の進行に伴い CD34 陽性細胞が減少する様子が確認された。再生初期では、CD34 陽性の骨髄由来の遊走型間質細胞が主体となり、軟骨細胞周囲での細胞微小環境構築に寄与していることが示唆された。

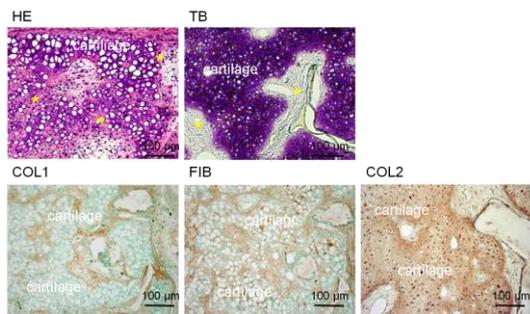


図 2 : 移植 8 週後の再生軟骨周囲における間質組織の形成

##### ②間質細胞による培養軟骨細胞に対する支持効能の解析

ヒト軟骨細胞とマウス間質細胞を用いた共培養系において、各細胞由来の遺伝子発現を評価するために種特異的プライマーの設計を行った。その特異性を確認するため、各プライマーにより増幅させた PCR 産物を 1.5%アガロースゲルを用いて電気泳動を行った。全てのプライマーにおいてヒト/マウス間でクロスリアクションは無く、各遺伝子を種特異的に増幅させた (図 3)。

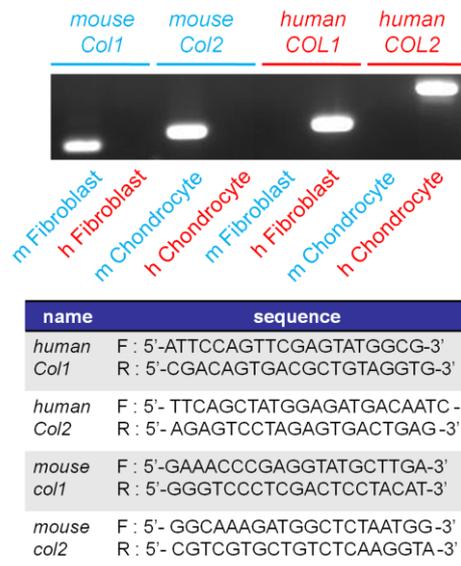


図 3 : ヒト/マウス共培養系の解析に用いる種特異的プライマーの設計

3 次元共培養系における解析では、1%アテロコラーゲンゲルにヒト軟骨細胞 (hChon) / マウス間質細胞 (線維芽細胞) (mFib) を混和し、分化誘導 (-) と分化誘導 (+) 培地にて 1 週間培養を行い、遺伝子発現を評価した。間質細胞の低比率 (hChon:mFib(95:5)) 混在は、混合無し (hChon:mFib(100:0)) の軟骨細胞と同様に分化誘導 (+) での hCOL1 の発現抑制と hCOL2 の発現上昇を示し、混合なしより高い hCOL2 発現を認めた。一方、高比率 (hChon:mFib(50:50)) の間質細胞の混在は、分化誘導が阻害され、分化誘導 (+) においても hCOL1 と hCOL2 は分化誘導 (-) と同等の発現であった。3 週間培養後の GAG 量においても、分化誘導 (+) において低比率での GAG 量増加と、高比率での GAG 量低下が確認された (図 4)。

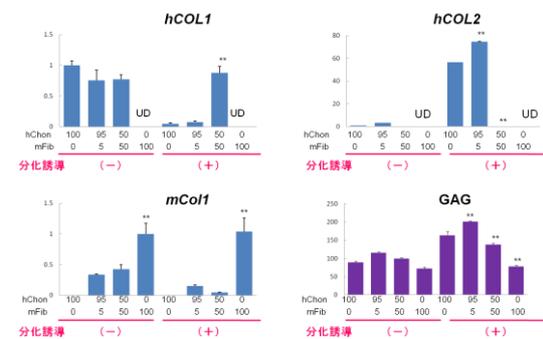


図 4 : 3 次元共培養系におけるヒト軟骨細胞/マウス間質細胞の遺伝子発現および GAG 定量

また、培養 3 週後の 分化誘導 (+) 培地にて 3 週間培養を行ったペレットでは、間質細胞の混在無しと低比率のペレットにて、トルイジンブルー染色でメタクロマジーが観察された。さらに低比率の混在のペレットでは、

メタクロマジーの亢進が観察された(図5)。単層培養系での共培養では、上記三次元培養系で確認された低比率の間質細胞との混在に伴う、軟骨細胞の分化誘導機構は明らかでは無かった。

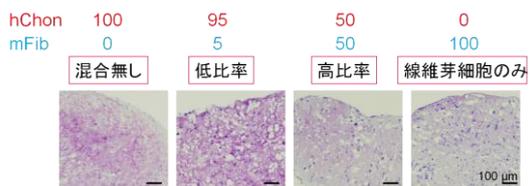


図5：培養3週後の3次元共培養ペレットのトルイジン・ブルー染色所見

非接触系共培養での検討では、低比率で共培養された間質細胞上の非接触のヒト軟骨細胞は、間質細胞の混在無しで培養されたヒト軟骨細胞と同等の遺伝子発現を認め、分化誘導に有意差は認めなかった。一方、高比率で共培養された間質細胞上の非接触ヒト軟骨細胞は、分化誘導(+)培地において優位なhCOL2発現上昇を認めた(図6)。

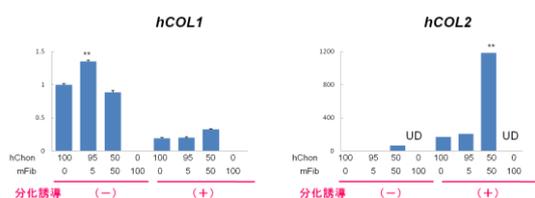


図6：非接触系共培養におけるヒト軟骨細胞/マウス間質細胞の遺伝子発現

### ③間質細胞が発現する再生誘導因子の同定

混在無しの間質細胞(0:100)と比較して、共培養に伴い間質細胞において高発現する遺伝子を探索した。低比率(hChon:mFib(95:5))共培養下での間質細胞において、対照群である混合無し(hChon:mFib(0:100))の間質細胞と比較して発現が上昇し、高比率(hChon:mFib(50:50))共培養下での間質細胞では発現上昇を認めない、候補となる遺伝子群を複数確認することができた。詳細に関しては、解析を継続中である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

稲木 涼子 (INAKI, RYOKO)  
東京大学・医学部附属病院・特任研究員  
研究者番号：90632456