

令和元年6月17日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06643

研究課題名(和文) 耳介軟骨細胞における高い基質形成能を有する細胞集団の同定とその特性評価

研究課題名(英文) Identification and characterization of cell population with high production of cartilage matrix ability in auricular chondrocytes

研究代表者

石橋 牧子 (Ishibashi, Makiko)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：60802395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：質の高い組織再生を実現するためには、適切な細胞の選択は必須である。培養耳介軟骨細胞の中には様々な軟骨基質形成能を持つ細胞が混在しているという問題があり、生理的軟骨に類似した均一な軟骨基質を得るのは難しい。そこで本研究では、培養ヒト耳介軟骨細胞から軟骨形成能が高い細胞群を同定する方法を検討し、その細胞群の特性を評価した。加えて、臨床応用を目指す上で細胞数の確保が必要になることから、軟骨基質産生能を維持した培養拡大法を検討した。得られた知見は軟骨再生医療技術の一助となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍や外傷、先天異常、低形成が生じた場合には、低侵襲で且つ機能的、審美的な再建が必要とされる。その手段の一つとして、再生医療・組織工学的アプローチがあるが、質の高い組織再生を実現するためには適切な細胞の選択が重要である。本研究では、軟骨再生医療における軟骨基質供給源となりうる有用な細胞集団の抽出・濃縮法として、増殖速度を用いた方法の有用性を検証した。きわめて独創的な細胞抽出方法が確立されれば、簡便に移植に必要な細胞量を確保できるという点で、これまでなしえなかった生理学的な軟骨に類似した質の高い再生軟骨組織の構築への重要な足掛かりとなり、軟骨再生医療の更なる発展に繋がる有益な知見を提供する。

研究成果の概要(英文)：In order to enhance the quality of tissue regeneration, selection of appropriate cells is indispensable. There is a problem that cultured auricle chondrocytes contain heterogeneous population capable of forming cartilage matrix. Therefore, it is difficult to regenerate uniform cartilage matrix similar to natural cartilage. In this study, we examined methods to identify cell groups with high chondrogenic potential from cultured human auricular chondrocytes, and evaluated the characteristics of the cell groups. Since it is necessary to expand cells for the purpose of clinical application, the culture method that could maintain the ability to produce cartilage matrix was examined. These results would contribute to progress in cartilage regenerative medicine.

研究分野：再生医療

キーワード：軟骨細胞 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

軟骨組織は無血管組織であり、自己修復が困難な組織として知られている。再生医療の臨床応用に向けた研究がますます加速している今日、軟骨治療においては、1994年に Brittberg らが、関節軟骨の局所的な欠損に対し自家培養軟骨細胞を注入する治療法(ACI; autologous chondrocyte implantation)を報告し、臨床導入が進んでいる(Brittberg M et al, N Engl J Med. 1994)。この方法では、自家組織から採取した軟骨を *in vitro* にて継代し、大量培養することで移植に必要な細胞数を確保する。その際、軟骨細胞は単層培養することで、細胞形態に変化を生じ、基質産生能の低下が生じるが、この脱分化した軟骨細胞を *in vivo* に移植すると再分化が起こり、軟骨組織が再生することを申請者の所属する研究グループにおいて確認した(Tanaka Y et al, Biomaterials. 2010)。さらに、自己軟骨細胞とポリ乳酸足場素材を導入することで、形や硬さのある3次元再生軟骨を作製し、世界に先駆けて、口唇口蓋裂による重篤な鼻変形の治療にインプラント型再生軟骨を臨床導入し[UMIN-CTR ID 5472]、一定の成果をあげている。このように臨床応用が進む軟骨再生医療であるが、生理的軟骨と同等な、一様な構造を有する機能的な再生軟骨組織を構築することは、いまだ不可能である。その原因の一つとして、単離した軟骨細胞の中に様々な軟骨基質形成能を持つ細胞が混在しているため、一様な軟骨が得られていないことが考えられる。実際、申請者の所属する研究グループの検討では、ヒト耳介軟骨細胞から再生した軟骨組織は島状を呈している。この結果から、脱分化した軟骨細胞中には、軟骨を再生させる能力のある細胞集団が存在することが示唆され、移植後の軟骨再生に関与していると考えられる。同様の考えに基づき、これまで様々な研究グループにより培養軟骨細胞から軟骨基質産生能の高い細胞集団を濃縮する方法の検討が行われているが、生体組織と同等な均質な軟骨を *in vivo* で再生できたという報告はない。

申請者は、培養軟骨細胞から軟骨基質産生能の高い細胞集団を濃縮する方法として体性幹細胞の特性に着目した。体性幹細胞などの幹細胞は、生体内では周囲の細胞や細胞外基質的作用により分裂速度が抑制されているが、生体外では増殖速度が速くなるという特性が報告されている(Mabuchi Y et al, Stem Cell Reports 2013)。軟骨基質産生能が高い細胞は体性幹細胞様の特性を示すと仮定し、*in vitro* 条件下で増殖速度の高い細胞を選別・濃縮後にポリ乳酸足場素材に包埋し、*in vivo* における骨組織形成能を評価したところ、増殖速度の速い細胞群では遅い細胞群と比較して軟骨基質形成能が高いことを確認した(Ishibashi M et al, Regenerative Therapy 2017)。この結果より、増殖速度の速い細胞群の中に、軟骨再生に寄与する細胞が存在することが示唆された。そこで、増殖速度の速い細胞群に焦点を当て、その特性を評価することで、得られた知見を軟骨再生医療技術へ応用することを目指す。

## 2. 研究の目的

質の高い組織再生を実現するために、軟骨再生医療における軟骨基質供給源となりうる有用な細胞候補の検討を目的とする。具体的には以下の内容を研究期間内に明らかにする。①増殖速度の異なる細胞群を分取・濃縮し、coverslipを用い *in vivo* にて軟骨形成能を比較することで、

ポリ乳酸足場素材やアテロコラーゲンの影響を取り除いた条件における、細胞本来の軟骨形成能を評価する。②遺伝子解析、多分化能評価、コロニー形成能評価、細胞マーカー発現解析により、増殖速度の異なる細胞群の特性を解析する。③②より得られた特性の細胞群における軟骨形成能を *in vivo* にて評価し、軟骨再生に関与する細胞集団を同定する。④臨床応用を目指す上で細胞数の確保が必要になることから、軟骨基質産生能を維持した培養拡大法を検討し、培養法を探る。

### 3. 研究の方法

#### ①coverslip を用いた増殖速度の異なる細胞群の軟骨基質産生能の検討

*in vivo* における軟骨形成能の評価を coverslip を用いて行う。耳介組織から単離したヒト耳介軟骨細胞を回収し、CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit - For Flow Cytometry (CFSE; Thermo Fisher Scientific Inc.) により染色し、day4 まで培養し、回収する。回収した細胞懸濁液を、BD FACSAria™ (Becton, Dickinson and Co.) を使用して sorting を行う。CFSE ヒストグラムの蛍光強度の違いを利用して増殖速度の速い細胞群と遅い細胞群とに分取する。coverslip を Cellmatrix I-C (Nitta Gelatin Inc.) でコーティング処理したあと、分取した培養軟骨細胞を播種する。培養を行った coverslip を、BALB/cA-nu nude mice の背部皮下に移植する。移植片を回収し、軟骨基質をトルイジンブルー (TB) 染色し、組織学的に軟骨形成能の評価を行う。

#### ②増殖速度の異なる細胞群の特性解析

増殖速度の異なる培養軟骨細胞について、以下の比較検討により細胞の特性を解析する。(a) 増殖率の経時的変化 (b) 多分化能 (c) 遺伝子発現 (d) 細胞表面マーカー発現 (e) コロニー形成能

#### ③②より得られた特性を有する細胞群の軟骨基質産生能評価

軟骨再生に関与する細胞集団を同定するために、②の検討から判明した、増殖速度の速い細胞群に特異的な特徴、例えばコロニー形成能や細胞表面マーカーを用いて分取する。この細胞集団を前述のように coverslip に播種、培養したのち、BALB/cA-nu nude mice の背部皮下に移植する。移植片を回収し、軟骨基質を TB 染色により組織学的に軟骨形成能の評価を行う。

#### ④細胞特性を維持した拡大培養法の確立

臨床応用を目指す上で細胞数の確保が必要になることから、軟骨基質産生能を維持した培養拡大法を検討し、培養法を探る。増殖速度の速い培養軟骨細胞を抽出可能な方法として、培養日数の短縮や低密度培養を試みる。

### 4. 研究成果

2017 年度は、①coverslip を用いた増殖速度の異なる細胞群の軟骨基質産生能の検討を行った。CFSE 蛍光標識した細胞を sorting し、CFSE ヒストグラムの両端 rapid と slow の 2 通りに設定することで増殖速度の異なる細胞群を分取した。回収した培養軟骨細胞を coverslip に播種、培養後、BALB/cA-nu nude mice の背部皮下に移植した。移植片を TB 染

色したところ、増殖速度の速い細胞群では遅い細胞群と比較して軟骨基質形成能が高いことを確認した。この結果は、ポリ乳酸足場素材を利用した場合と合致しており、coverslip でも同様の結果を得ることができた。続いて、増殖速度の異なる細胞群の特性を解析するために、(a) 増殖率の経時的变化 (d) 細胞表面マーカー発現および (c) コロニー形成能に関して検討を行った。CFSE 蛍光標識した培養軟骨を増殖速度の異なる群に分取、再度培養し、増殖率を経時的に測定した結果、増殖速度の異なる細胞群で違いがみられた。細胞表面マーカーに関しては、CFSE 蛍光標識した培養軟骨細胞を、組織幹細胞等について報告のある表面マーカーにて染色、解析し、細胞増殖速度と表面マーカーとの関連を探索した。その結果から、いくつかの細胞表面マーカーに絞った。CFSE 蛍光標識した軟骨細胞を single cell sorting によりコロニー形成能を比較したところ、増殖速度の異なる細胞群で違いがみられた。

2018 年度は、②増殖速度の異なる細胞群の特性解析 (b) 多分化能 (c) 遺伝子発現を検討した。次に、③ ②より得られた特性を有する細胞群の軟骨基質産生能評価を行った。軟骨再生に関与する細胞集団を同定するために、②の検討から判明した、増殖速度の速い細胞群に特異的な細胞表面マーカーを用いて分取し、この細胞集団を coverslip に播種、培養したのち、BALB/cA-nu nude mice に移植した。移植片を回収し、軟骨基質を TB 染色を用いて組織学的に軟骨形成能の評価を行った結果、軟骨形成能に明らかな違いは見られなかった。④最後に、増殖速度の速い細胞群の培養拡大法を細胞密度および培養日数を変化させることで検討したところ、増殖速度の変化を観察した。

#### <引用文献>

- ①Brittberg M et al, N Engl J Med. 1994
- ②Tanaka Y et al, Biomaterials. 2010
- ③Mabuchi Y et al, Stem Cell Reports 2013
- ④Ishibashi M et al, Regenerative Therapy 2017

#### 5. 主な発表論文等

〔学会発表 計 1 件〕

- ①石橋牧子、疋田温彦、松山真理子、藤原夕子、高戸 毅、星 和人、ヒト軟骨細胞における増殖速度と軟骨気質産生能との関連性、第 71 回日本口腔科学会学術集会、2017 年 4 月 26-28 日、ひめぎんホール、愛媛

#### 6. 研究組織

- (1)研究分担者 該当なし
- (2)研究協力者 該当なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者 個人に帰属されます。