

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659677

研究課題名(和文) 脱細胞化組織と末梢血単核球およびマイクロRNAを用いた関節軟骨再生

研究課題名(英文) cartilage regeneration using decellularized tissue, peripheral blood mononuclear cell, and microRNA

研究代表者

越智 光夫(Ochi, Mitsuo)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・教授

研究者番号：70177244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 660,000円

研究成果の概要(和文)：末梢血単核球から軟骨細胞を誘導し、脱細胞化軟骨組織と組み合わせる、あるいは軟骨分化に促進的に働くmicroRNA(miRNA)と併用することで、軟骨組織を作製することを目的とした。末梢血単核球をペレット培養し、軟骨分化を試みたが、ペレット培養が困難であった。直径2mmのラット骨軟骨柱を、2%SDSを用いて脱細胞化を行った。12時間で、軟骨基質をある程度保ったまま脱細胞化できていたが、DNAが完全に除去できていなかった。次に、軟骨細胞シートから分泌されるmiRNAを解析した。軟骨細胞シートから、骨・軟骨分化に重要なmiRNAが多く分泌されていることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to create cartilage tissue using decellularized cartilage, peripheral blood mononuclear cell and microRNA. It was impossible to induce chondrogenesis from peripheral blood mononuclear cell because the pellet culture of peripheral blood mononuclear cell could not be achieved. Osteochondral plug of rat was decellularized by 2%SDS for 12 hours, and decellularized osteochondral plug with cartilage matrix was obtained. But DNA content was not completely removed. Next, microRNA expression in the culture medium of chondrocyte sheet was analyzed. It was revealed that chondrocyte sheet secreted microRNAs which play a crucial role in chondrogenesis and osteogenesis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：microRNA 変形性関節症 エクソソーム 脱細胞化 末梢血単核球

### 1. 研究開始当初の背景

関節破壊をきたす代表的な疾患である変形性関節症は、はかり知れない苦痛と運動機能障害を与え、総人口 125,000 万人のうち OA の患者数は 1,200 万人で要治療者は 700 万人とされている。しかし、その原因は解明されておらず、また、破壊されてしまった関節に対しては、人工関節しか有効な治療法がないのが現状であり、関節軟骨再生医療の確立は急務である。再生医療の 3 つの柱は、細胞、足場、成長因子であるが、現状では、関節軟骨のマトリックスを完全に再現できる足場材料は存在しない。近年、摘出した生体組織の細胞成分をすべて除去し、脱細胞化マトリックスを足場材料として使用する方法が注目を集め、一部では臨床応用もされている。この方法は、生体組織の細胞外マトリックス構造を残しており、自己の細胞で再細胞化することで、生体組織を再構築することができる。軟骨細胞に代わる細胞源としては、骨髄間葉系幹細胞があげられる。しかし、多くの細胞数を得るためには、多量の骨髄が必要であり、侵襲も大きい。近年、末梢血単核球の中に、軟骨分化能を有する細胞集団が存在することが報告されている。末梢血から軟骨細胞を誘導できれば、低侵襲で数多くの軟骨細胞が得られる。また、近年、細胞増殖・分化、アポトーシス等の生命現象に microRNA(miRNA)が重要な役割を担っていることが明らかとなった。miRNA と末梢血単核球、脱細胞化組織を組み合わせると、より効率的な軟骨修復の治療に発展する可能性がある。

### 2. 研究の目的

正常の構造を持つ軟骨組織を作製するため、採取の容易な末梢血から単離した細胞を軟骨細胞に誘導し、他の動物由来の軟骨組織を脱細胞化し、これと組み合わせることで、*ex vivo* で軟骨組織を作製する。さらに、軟骨分化に促進的に働く miRNA も使用することで、より効率よく骨軟骨組織を作製する。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト末梢血単核球からの軟骨分化：ヒト末梢血単核球を分離し、シャーレに播種した後 2 週間培養する。接着した細胞を回収し、軟骨分化誘導培地を用いてペレット培養を行う。3 週間後、RNA を抽出し、マイクロアレイにより、軟骨分化に特異的に発現する miRNA を同定する。

(2) 骨軟骨柱組織の脱細胞化：ラットの膝関節より、直径 2.0mm の骨軟骨柱を採取する。- 80 °C での凍結・融解を 2 回繰り返した後、高張液、低張液で洗浄後、2%SDS に 12 時間、24 時間暴露し、その後、高張液、低張液にて洗浄を行い、脱細胞化を行う。この脱細胞化

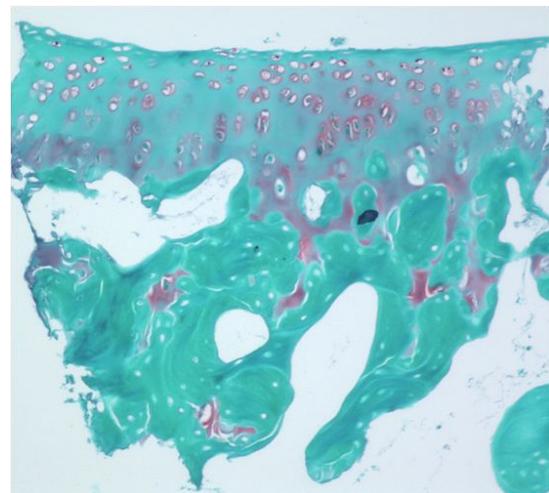
骨軟骨組織を、組織学的評価等により、軟骨基質を保ったまま、効率よく脱細胞化できる条件を検討する。さらに、脱細胞化した組織に残存する DNA 量を Quant-iT PicoGreen dsDNA assay kit (Life Technologies)を用いて測定する。

(3) 軟骨細胞シートの脱細胞化組織：ラット膝関節、大腿骨頭から軟骨組織を採取し、トリプシン・コラゲナーゼ処理を行い、軟骨細胞を単離する。温度応答性培養皿に播種・培養し軟骨細胞シートを作製する。軟骨細胞シートを 2%SDS 溶液にて脱細胞化し、軟骨基質を有するシート状軟骨組織を作製する。

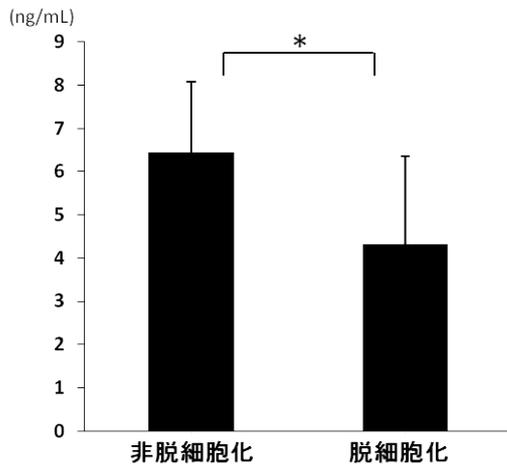
### 4. 研究成果

2 週間培養後に接着した末梢血単核球を集めて、軟骨分化誘導培地を用いてペレット培養を試みたが、ペレットにはならなかった。細胞数を増やす等の試行錯誤を行ったが、ペレット状にならず、末梢血単核球からの軟骨様組織の作製ができなかった。

ラット骨軟骨柱を用いて、2%SDS による脱細胞化を行った。2%SDS 暴露 12 時間で切片を作製し、サフラニン O 染色を行ったところ、軟骨深層は、軟骨基質が残存していた。また、軟骨下骨の細胞も消失していたが、軟骨の深層では、細胞が残存していた。さらに、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) による染色、DNA 定量にて DNA が完全に除去できていないことがわかった。低張液や高張液などで、72 時間まで洗浄を行ったが、やはり核成分の完全な除去ができなかった。2%SDS 暴露 12 時間では、軟骨基質は、完全に消失することはなかったが、DNA は残存していた。

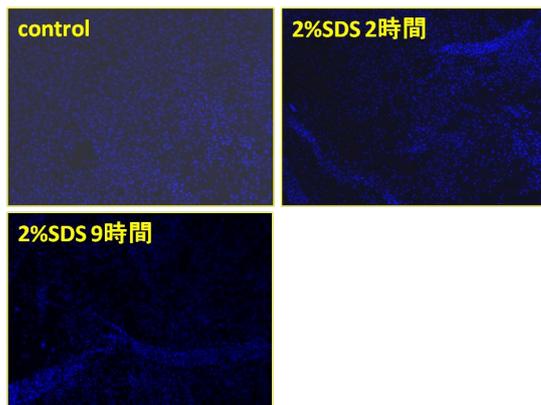


脱細胞化したラット骨軟骨柱。サフラニン O 染色。



ラット骨軟骨柱内の DNA 量。\*:p<0.05

ラット骨軟骨柱組織の脱細胞化が困難であったのは、軟骨細胞は、軟骨基質の中に存在し、SDS 等の溶液が浸透しないことが原因と考えられたため、軟骨細胞シートを脱細胞化することとした。軟骨細胞シートについても、骨軟骨柱と同様に、2%SDS を用いて脱細胞化を行った。2、9 時間 2%SDS 溶液に暴露したところ、2 時間、9 時間と暴露時間が長くなるにつれ、DAPI に染色される細胞は減少していたが、完全に除去ができていなかった。



軟骨細胞シートの DAPI による染色

また、脱細胞化組織に組み合わせる骨・軟骨分化を促進する miRNA の探索を行った。これまで、ラットの大腿骨滑車部に直径 2mm の骨軟骨欠損部を作製し、骨軟骨欠損をラット軟骨細胞で作製した軟骨細胞シート、あるいは、ラット滑膜細胞で作製した細胞シートで覆い、骨軟骨修復を確認したところ、軟骨細胞シートで骨軟骨欠損部の良好な修復が示されていた。そこで、この軟骨細胞シートから、骨・軟骨分化を促進する miRNA が分泌されていると仮説をたて、軟骨細胞シートと、滑膜細胞シートの培養液中に含まれる

miRNA の解析を行った。培養液を 1ml 採取し、そこから RNA を単離した。Taqman<sup>®</sup> array rodent card (Life technologies) を用いて、軟骨細胞シートと滑膜細胞シートから分泌される miRNA の定量評価を行った。その結果、軟骨細胞シートの培地中には、骨・軟骨分化を促す miRNA が分泌されていることがわかった。miRNA-140 は、骨髄間葉系幹細胞 (MSC) からの軟骨細胞分化や、軟骨の恒常性の維持に重要な役割を担う miRNA であり、miRNA-30a は、MSC からの骨分化に重要な miRNA である。また、miRNA-92a は、その発現量の変化により、軟骨分化・骨分化に作用する。このような miRNA が、軟骨細胞シートから分泌され、骨軟骨修復に寄与したものと考えられる。

Target Name	RQ	fold cartilage/synovium
mmu-miR-470#-002589	0.066	15.15151523
rno-miR-190b-002048	0.078	12.82051256
hsa-miR-140-3p-002234	0.111	9.009008893
hsa-miR-875-5p-002203	0.162	6.172839488
mmu-miR-331-5p-002233	0.169	5.917159772
mmu-miR-30a-000417	0.175	5.714285812
mmu-miR-425-001516	0.203	4.926108516
rno-miR-489-001353	0.219	4.566210113
mmu-miR-133a-002246	0.239	4.184100548
mmu-miR-93-001090	0.243	4.115226325
mmu-miR-409-3p-002332	0.311	3.215434192
mmu-miR-29b#-002497	0.517	1.934235904
rno-miR-327-001328	0.646	1.54798755
mmu-miR-551b-001535	0.668	1.497006026
mmu-miR-92a-000430	0.702	1.42450138
mmu-miR-465C-5P-002654	0.774	1.291989682
mmu-miR-17-002308	0.870	1.149425281

軟骨細胞シートから分泌される miRNA

脱細胞化する方法としては、凍結・融解や器械的刺激による細胞の破壊、化学薬品、酵素処理といった方法がある。このうち、化学薬品によるものの有効性が示されているが、中でも SDS による脱細胞化が有効性・安全性の面からよく使用されている。他の動物由来の脱細胞化組織を使用するには、DNA、RNA を極力除去することが必要である。一方、細胞成分を取り除くために、SDS の暴露が長くなれば、細胞外マトリックスの損傷が大きくなり、軟骨組織であれば、軟骨基質の損失が懸念される。軟骨基質の損失を最小限にしながら、細胞成分を取り除くには、脱細胞化の過程、特に破壊された細胞成分の除去にさらなる検討が必要である。また、軟骨細胞からは、骨・軟骨分化を促す miRNA が分泌されており、これを脱細胞化した骨軟骨組織に添加することで、骨・軟骨分化を促進する他家骨軟骨柱の作製の可能性が示唆される。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

越智 光夫 (OCHI MITSUO)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・  
教授  
研究者番号：70177244

(2) 研究分担者

味八木 茂 (MIYAKI SHIGERU)  
広島大学・病院・講師  
研究者番号：10392490

亀井 直輔 (KAMEI NAOSUKE)  
広島大学・病院・病院助教  
研究者番号：70444685

中佐 智幸 (NAKASA TOMOYUKI)  
広島大学・病院・病院助教  
研究者番号：60467769