

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462358

研究課題名(和文) 多血小板血漿による軟骨分化の分子メカニズムの解明 - 軟骨再生薬創薬を目指して -

研究課題名(英文) Investigation of molecular mechanisms of chondrogenesis by platelet rich plasma

研究代表者

池田 敏之 (Ikeda, Toshiyuki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80322759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：多血小板血漿(platelet rich plasma; 以下PRP)やクリオプレシピテート(以下クリオ)に未分化軟骨細胞株ATDC5やヒト間葉系幹細胞の軟骨分化誘導能や細胞増殖作用があることを同定し、クリオがPRP同様に軟骨再生医療に直接応用可能であることを示す基礎データを得た。またPRPやクリオによる軟骨分化誘導にSOX6やSOX9が重要な役割を果たしていることを示した。PRPによる軟骨分化誘導や細胞増殖能を担う分子のひとつとしてPDGFを同定した。SOX6/SOX9の下流の新規軟骨分化誘導転写因子としてEMX1/EMX2を同定した。

研究成果の概要(英文)：Platelet rich plasma (PRP) and cryoprecipitate induced chondrogenesis and cell growth into un-differentiated chondrocytic cell line ATDC5 and human mesenchymal stem cells (MSC). This data has shown a possibility that cryoprecipitate will be applicable for cartilage regeneration medicine as well as PRP. SOX6 and SOX9 played important roles on in vitro chondrogenesis induced by PRP or cryoprecipitate. PDGF was also identified as a causal molecule of cartilage differentiation and cell growth induced by PRP. We found that EMX1 and EMX2 were induced by SOX6 and SOX9 and could induce cartilage differentiation into ATDC5 and MSC.

研究分野：骨軟骨代謝学

キーワード：多血小板血漿 クリオプレシピテート 軟骨分化 転写因子 PDGF EMX SOX

1. 研究開始当初の背景

多血小板血漿 (platelet rich plasma; 以下 PRP) は患者本人の血液から簡便な操作で作成可能な自家血液製剤の 1 種である。PRP に豊富に含まれる種々のサイトカインや成長因子による創傷治癒促進作用をはじめとした多彩な生理作用は古くから知られており、皮膚科・形成外科領域などの分野で臨床的にも応用されてきた実績がある。近年、いまだ決定的な治療法のない変形性関節症をはじめとする軟骨組織の変性・損傷疾患においても、関節内注射、軟骨細胞移植時のマトリックス素材との併用など、様々な方法で臨床応用の試みが始まっている (Ana W S et al, Arch Orthop Trauma Surg, 2011; Filardo G et al, Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2011)。これら関節疾患に対する PRP の応用に対する科学的根拠として、いくつかの細胞に対し PRP が軟骨分化誘導能を有するとの報告がある一方 (Akeda K et al, OA & Cartilage, 2006; Mishra A et al Tissue Eng Part C Methods, 2009) PRP が実際にどのような機序で変性あるいは損傷した関節軟骨に作用しこれらの病態を改善せしめるのか、具体的な分子メカニズムについてはほとんど未解明のままである。従って多くの臨床整形外科医にとって変形性関節症に対する PRP 療法は、現状では信頼に値する治療オプションとするには程遠いと言わざるを得ない。そこで本研究では未分化軟骨細胞株である ATDC5 や多分化能を持つ間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell; 以下 MSC) に PRP を作用させたインビトロの軟骨分化誘導系を利用してその分子生物学的メカニズムを明らかにしようとした。

2. 研究の目的

- (1) PRP によるインビトロ軟骨形成系を確立しその特徴を解析すること
- (2) 近年自己トロンピンと自己クリオプレシピテートの同時調整キット: クリオシール®の保険承認により注目されているクリオプレシピテート製剤 (以下クリオ) についても軟骨再生医療への応用が可能かあわせて検討を行うこと、また術中の局所クリオ投与の臨床的な有効性を検討すること
- (3) PRP による軟骨分化の分子メカニズムを明らかにすること。
- (4) PRP に含まれる成長因子やサイトカインの条件を最適化しとくに軟骨分化に有用な蛋白分画を同定すること

3. 研究の方法

(1) マウステラトカルシノーマ由来未分化軟骨細胞株 ATDC5 や多分化能を持つヒト MSC にヒト血清、PRP、クリオを 1-3% で添加し軟骨分化や増殖に与える影響を検討した。軟骨分化は COL2A1, SOX6, SOX9 などの軟骨分化マーカーを用いたリアルタイム RT-PCR や alcian blue 染色、ALP 染色など

で評価した。細胞増殖は WST-8 を用いた細胞増殖アッセイキットにより定量評価した。(2) PRP に含まれる既知のサイトカインその他の液性因子やシグナル伝達系に関して ATDC5 のインスリン軟骨分化モデルとインヒビターを用いた検索を行い軟骨分化に影響を与える因子をスクリーニング。レトロウイルスを用いた強制発現系を作成しその検証を行った。

(3) PRP、クリオ投与時に誘導される軟骨分化のマスター転写因子 SOX6/SOX9 についてヒト MSC に強制発現した系での誘導遺伝子のマイクロアレイの情報 (Saito, Ikeda et al, EMBO rep, 2007) をもとに、PRP による軟骨分化の下流分子の候補を選定し強制発現系を作成した。SOX6 と COL2A1 のプロモーターエンハンサーを利用したルシフェラーゼ・レポーターアッセイを用いてスクリーニングを行った。得られた SOX6 と COL2A1 の転写活性化分子についてリアルタイム RT-PCR の他、レトロウイルス、アデノウイルス発現系を作成し軟骨系の細胞株やヒト MSC に強制発現したさいの実際の軟骨分化誘導能を alcian blue 染色や ALP 染色で評価した。

(4) PRP に含まれる成長因子やサイトカインの条件を最適化しとくに軟骨分化に有用な蛋白分画を同定するために sonication、37 での incubation、PRP からの細胞除去後に限外濾過膜を用いた分画化を行う、など条件をかえて PRP を調整した。得られた調整液を ATDC5 に投与し alcian blue 染色の染色性の変化で軟骨分化誘導能を評価した。

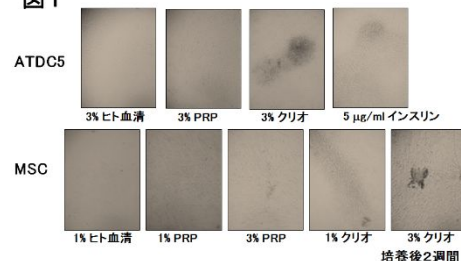
(5) 術中に局所投与された自己クリオ製剤の臨床的有用性を検討するため、脳神経外科手術症例 204 症例、脊椎外科手術症例 813 症例について後方視的に各種臨床データや検査データの情報を収集した。髄液漏、術後細菌感染、入院期間、周術期出血相当量を治療効果の指標とし線形回帰モデルやロジスティック回帰モデルを用いた多変量解析の手法で自己クリオの投与、自己血・同種血の使用、その他の臨床的パラメータがこれら治療効果に与える影響を検証した。

4. 研究成果

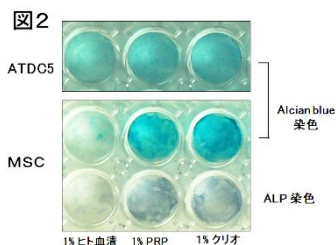
(1) PRP、クリオが軟骨分化に与える影響とクリオの軟骨再生医療への応用の可能性

1-3% のヒト血清、PRP、クリオを ATDC5 やヒト MSC に添加して 1-3 週間培養するととくにクリオの添加で重層化し軟骨様の

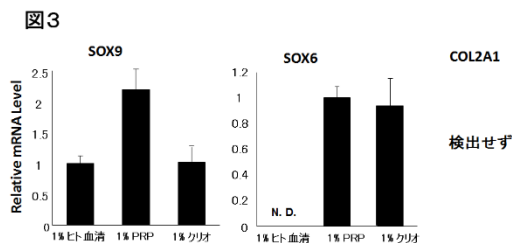
図 1



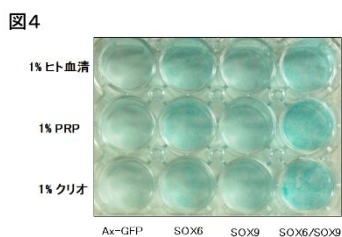
node を形成する様子が観察された(図1)。MSC に 1%の PRP やクリオを加えた系で WST-8 を用いた細胞増殖アッセイを行い評価したところ、ヒト血清添加時にくらべとくにクリオ添加時に増殖能が有意に亢進していることが確認された。細胞分化に与える影響を alcian blue 染色や ALP 染色で評価すると ATDC5、ヒト MSC とも軟骨分化が誘導されていることが明らかになった(図2)。



SOX9 が、クリオにおいて SOX6 が誘導されていることが明らかになったが COL2A1 の誘導までは確認されなかった(図3)。一方ヒ



ト MSC にアデノウイルスベクターで SOX6/SOX9 を強制発現させたインビトロの軟骨形成モデルに 1%の PRP やクリオを添加すると alcian blue 染色で示される軟骨基質の産生能が増強された(図4)。

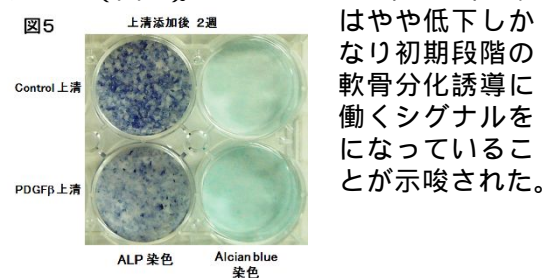


以上の結果から PRP やクリオによるインビトロ軟骨形成系ではごく初期の未分化な軟骨細胞のみ誘導され、増殖能が維持されていること、軟骨分化のマスター転写因子 SOX6, SOX9 のシグナルが重要な役割を果たしていることが推察された。またクリオは PRP と異なり細胞成分をほとんど含まないため、血小板由来の micro-particle や残存白血球由来の炎症性サイトカインなどの組織再生に negative に働く因子がより少ないことが想定される。クリオに PRP 同様の軟骨分化誘導能・PRP より強い細胞増殖能が確認されたことは、より安全なクリオ製剤を軟骨再生医療に直接適用する治療オプションの可能性を示すものと考えられた。

(2) PDGFβ は初期の軟骨分化を誘導する

PRP による軟骨分化誘導の分子メカニズム解明のため、PRP 中に含まれる VEGF や PDGF ファミリー、TGF-β スーパーファミリ

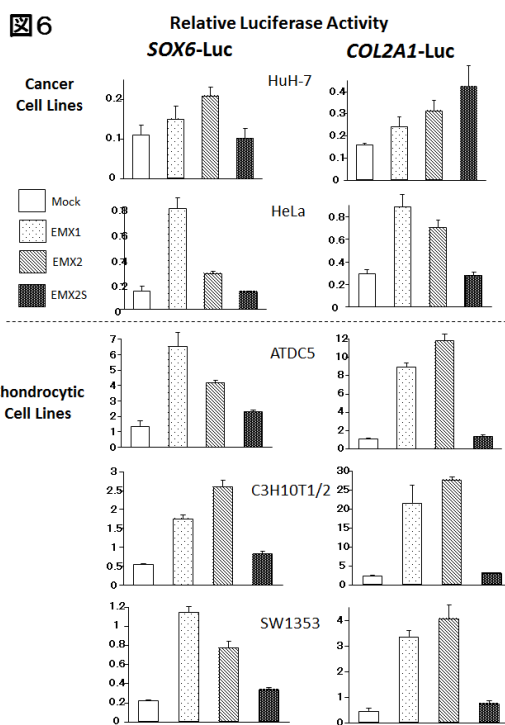
ーなどの既知のサイトカインやそのシグナル伝達系のインヒビターを ATDC5 のインスリン軟骨分化モデルに作用させて alcian blue 染色の染色性や細胞増殖に与える影響を評価した。VEGF/PDGF 受容体のインヒビター AG1433 や PDGF 受容体のインヒビター AG1295 が軟骨の分化や増殖を強く抑制することが明らかになった。そこでレトロウィルスを用いた VEGF/PDGF ファミリー分子の強制発現系を作成し ATDC5 に安定導入して alcian blue 染色にて軟骨分化への影響を検討したところ PDGFβ と PDGFδ の安定導入時に軟骨基質の産生が亢進することが見出された。とくに PDGFβ については再現性が高く、ATDC5 に安定導入した細胞株の細胞上清を 5%の濃度でヒト MSC に導入し 1-2 週培養しただけで alcian blue の染色性が亢進した(図5)。



(3) SOX6/SOX9 で誘導される新規軟骨分化誘導転写因子 EMX1/EMX2 の同定

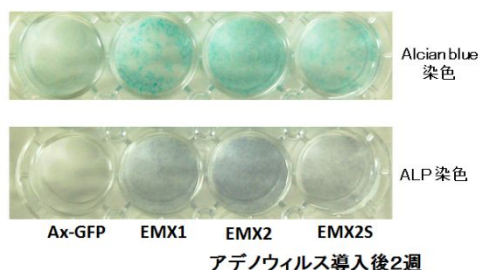
SOX6/SOX9 が PRP・クリオによる軟骨分化誘導に重要である可能性が高まったため、ヒト MSC に SOX6/SOX9 をアデノウイルスで強制発現させたさいに誘導される遺伝子の情報を再検討した結果候補分子 17 をしぼりこみ強制発現系を作成した。SOX6, COL2A1 のルシフェラーゼ・レポーターベクターを用いたレポーターアッセイによるスクリーニングの結果、C11orf95, MKL1, MKL2, EMX1, EMX2 の 5 分子が新規軟骨分化誘導遺伝子として同定された。このうちとくに転写活性化能の高い EMX1/2 についてより詳細に解析を行った。

EMX1/EMX2 はホメオボックスファミリーに属す転写因子であるが、SOX6 や COL2A1 の転写活性化能は HeLa や HuH-7 など非軟骨細胞株では低く、ATDC5, C3H10T1/2, SW1353 など軟骨系の細胞で高くなっておりより軟骨特異的に作用しているものと考えられた。また EMX2 には exon 2 を欠く short isoform (以下 EMX2S)が存在するが、EMX2S では full length の EMX2 や EMX1 にくらべ転写活性が低下していた(図6)。Emx2 のノックアウトマウスでは肩甲骨が形成されないことからマウスの Emx2 も軟骨分化・軟骨内骨化に重要な役割を果たすものと考えられるがマウスの Emx1, Emx2 による SOX6, COL2A1 の転写活性はヒト由来 EMX1/EMX2 に比較し大幅に低下しておりとくにヒトの軟骨分化においてより重要な役割を果たしているものと考えられた。



ATDC5 を用いた一過性の強制発現系においてリアルタイム RT-PCR にて評価すると、レポーターアッセイの結果とは若干異なり、Sox6 や Col2a1 などの初期軟骨分化マーカーの誘導は EMX1 でははっきりせず、EMX2 に特異的に認められた。また EMX2S にも EMX2 同様の軟骨誘導能を認めた。ヒトでの軟骨分化誘導能をより正確に評価するためアデノウイルスベクターを用いた強制発現系を作成しヒト MSC に導入し 1-3 週間後の変化を観察した。結果 EMX1/EMX2 はともにヒト MSC に alcian blue の染色性亢進で示される軟骨分化を誘導することが明らかとなった。やや後期の軟骨分化を反映する ALP 染色の染色性は EMX1/EMX2 で著明に亢進した一方、EMX2S ではその程度は弱くなっていった(図7)。一方 EMX2S は alcian blue 染

図7



色では EMX1/EMX2 と同等の染色性を呈しており両者の結果を総合すると EMX2S はより初期の分化に働くものと考えられた。すなわち EMX2 の exon 2 のスプライシングの制御による EMX2S EMX2 へのスイッチングが軟骨分化の制御機構のひとつとして作用している可能性が示された。

(4) 軟骨再生により有用な PRP 由来の蛋白分画は得られず

Sonication、37 での incubation、凍結融解遠心後に 0.45 μM のフィルターで細胞成分完全除去、その後限外濾過を行って分画する、など複数の条件で調整した PRP 製剤を ATDC5 に作用させ、alcian blue の染色性をもとに軟骨分化誘導能を比較検討した。Sonication により若干軟骨分化誘導能が上昇する傾向を認めたがその程度は弱くアッセイ間の差も大きく臨床応用に有望と考えられるような条件は得られなかった。

(5) 同種血輸血は治療効果を増悪、自己血輸血は治療効果を改善または影響与えず、クリオの効果は証明されず

脊椎外科手術・脳神経外科手術において同種血輸血は術後細菌感染や入院期間延長のリスク因子である一方、同種血輸血はそのリスクを軽減または影響を与えなかった。クリオ自体の髄液漏防止効果や周術期出血軽減効果は証明されず、入院期間や術後細菌感染にもとくに影響はあたえないという解析結果であった。今後自己クリオ・クリオシール導入を契機とした before and after study など新たな解析手法を用いた再検討が必要と考えられた。

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5件)

- Mishima Y, Tsuno NH, Matsushashi M, Yoshizato T, Sato T, Ikeda T, Watanabe-Okochi N, Nagura Y, Sone S, Kurokawa M, Okazaki H. Effects of universal vs bedside leukoreductions on the alloimmunization to platelets and the platelet transfusion refractoriness. *Transfus Apher Sci.* 2015 Feb;52(1):112-21. doi:10.1016/j.transci.2014.11.001.
- Okada K, Fukai A, Mori D, Hosaka Y, Yano F, Chung UI, Kawaguchi H, Tanaka S, Ikeda T, Saito T. Identification of SCAN domain zinc-finger gene ZNF449 as a novel factor of chondrogenesis. *PLoS One.* 2014 Dec 29;9(12):e115169. doi:10.1371/journal.pone.0115169.
- Fujiwara S, Hoshikawa S, Ueno T, Hirata M, Saito T, Ikeda T, Kawaguchi H, Nakamura K, Tanaka S, Ogata T. SOX10 transactivates S100B to suppress Schwann cell proliferation and to promote myelination. *PLoS One.* 2014 Dec 23;9(12):e115400. doi:10.1371/journal.pone.0115400.
- Yamamoto Y, Yamashita T, Tsuno NH, Nagamatsu T, Okochi N, Hyodo H, Ikeda T, Kawabata M, Kamei Y, Nagura Y, Sone S, Fujii T, Takahashi K, Kozuma S. Safety and efficacy of preoperative autologous blood donation for high-risk pregnant women:

experience of a large university hospital in Japan. J Obstet Gynaecol Res. 2014 May;40(5):1308-16. doi: 10.1111/jog.12348.

5. Matsuhashi M, Tsuno NH, Sone S, Mishima Y, Nagura Y, Watanabe-Okochi N, Ikeda T, Kashiwase K, Fukuda S, Iriyama T, Hyodo H, Yamashita T, Kamei Y, Arai S, Minami M, Fujii T, Kurokawa M, Tozuka M, Takahashi K, Santoso S. The role of alloantibodies against human platelet antigen-15 in multiply platelet transfused patients. Transfusion. 2014 Apr;54(4):1093-9. doi: 10.1111/trf.12455.

(以上すべて査読有)

〔学会発表〕(計3件)

三島由佑子 Identification and characterization of molecular basis of Del mutations in the Japanese population. 2015/10/25 AABB(国際学会)アナハイム(USA)

高柳俊作 脳神経外科手術における自己血輸血の安全性・有効性 その1
2016/3/12 自己血輸血学会 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

川端みちる 脳神経外科手術における自己血輸血の安全性・有効性 その2
2016/3/12 自己血輸血学会 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(なし)

取得状況(なし)

〔その他〕

東京大学医学部附属病院輸血部ホームページ

<http://square.umin.ac.jp/traf-ky/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 敏之 (IKEDA, Toshiyuki)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 80322759

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

三島 由佑子 (MISHIMA, Yuko)
高柳 俊作 (TAKAYANAGI, Syunsaku)
川端 みちる (KAWABATA, Michiru)