

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：34517

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893277

研究課題名(和文)ドナー骨髄細胞の増殖能と軟骨分化能および関連non-coding RNAの同定

研究課題名(英文)Identification of non-coding RNA associated with the proliferative and chondrogenic abilities of human bone marrow mesenchymal stem cells

研究代表者

目良 恒(MERA, Hisashi)

武庫川女子大学・スポーツ健康科学部・研究員

研究者番号：70650381

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)：検体数30個体のドナーから分離した骨髄細胞を用い実験を行った。増殖期のbFGF添加の反応性については従来の報告と同様の定性的な結果が得られ、各ドナーにおける定量指標も独自に得られた。実験の妥当性とその後解析に十分なサンプルサイズが得られた。

各ドナーのRNAプロファイリングをmicroarrayシステム(EXIQON社miRCURY LNA miRNA array)で網羅的に解析し、軟骨分化度のマーカー候補となりうるmicroRNAを検証した結果、miR708-5pが軟骨分化に抑制的に関与することが示唆された。しかしサンプル間でのバラつきも大きく、他の因子の関与も示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) isolated from 30 donors. We could repeat the quantitative outcomes that were previously reported for the effects of bFGF on the chondrogenic ability of the BMSCs during the expansion phase. Moreover, we could obtain independent quantitative data for each donor. This finding indicates that the sample size used here is sufficient for subsequent analysis to validate the results.

The RNA profile of each donor, generated before BMSC differentiation, was analyzed comprehensively using an RNA microarray system (EXIQON Inc. miRCURY LNA miRNA array). We selected some candidate micro RNAs as markers of chondrogenic ability of BMSCs. These markers were verified by quantitative PCR, and miR708-5p was found to suppress chondrogenic differentiation. However, the variation in miR708-5p expression between donors was large, suggesting that other factors could also be involved in regulating the chondrogenic ability of BMSCs.

研究分野：整形外科

キーワード：関節軟骨修復・再生 骨髄細胞 軟骨分化度マーカー miR708-5p

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 修復困難な関節軟骨欠損に対し現在広く行われている治療法としては、主に欠損部と骨髄を交通させる骨髄刺激法<sup>1)</sup>、および健康非荷重部からの骨軟骨柱移植<sup>2)</sup>、が挙げられる。前者は創傷治癒過程を促すきっかけとなるが、力学強度の劣る線維軟骨の修復では、長期的な変形性関節症進行への懸念が残る<sup>3)</sup>。また後者については、非荷重部とはいえ採取可能な健康部組織の領域には限界がある。これらを補うため、1994年に初めてヒトに対する自己関節軟骨細胞移植がBrittbergらによって報告され<sup>4)</sup>、治療法の選択肢として新たに細胞治療が加わった。本邦では2002年にOchiらによってコラーゲンをを用いたACIが報告され<sup>5)</sup>、JACC(J-TEC社)開発に発展し、2013年の保険収載に至っている。

(2) 一方、骨髄組織から得られる接着細胞は体外でも増殖可能でその免疫抑制作用や組織修復・血管新生作用が広く知られており、この細胞が、様々な間葉系細胞へ分化可能なことが1990年代からCaplanらにより報告されていた<sup>6)</sup>。用いる細胞源をすでに臨床利用されバンク化されている骨髄組織に求めることは細胞治療を広く普及する上では有望と考えられる。関節軟骨欠損に対する骨髄細胞治療については共同研究者の脇谷らが1998年に世界に先駆けて自己骨髄細胞(以下BMSC)移植を行い、これまで施行した約40例で良好な成績を報告している<sup>7)</sup>。我々は細胞治療を普及すべく、関節軟骨欠損修復治療を簡便化した「関節鏡視下自己骨髄細胞(以下BMSC)移植による関節軟骨欠損修復—多施設共同、非盲検、ランダム化、並行比較試験」(以下「臨床試験」)を計画・進行中である。その効果に対して科学的裏付けを与えるためには、移植される細胞の品質管理を行うことが重要である。特に我々が用いるBMSCはヘテロな細胞集団であるため<sup>8)</sup>、その増殖能および軟骨分化能にはドナー間の差が大きいと考えられ、さらに分離・培養条件もその性質に影響を与える可能性が高い<sup>9)</sup>。しかし、軟骨欠損に対する細胞治療において、これまで移植細胞の増殖能や軟骨分化能の個体差を解析した報告はない。また軟骨形成に必須な転写因子であるsox9など、軟骨の発生分化マーカーとして有用な分子はいくつか知られているが<sup>10)</sup>、異なるドナーから得たBMSCの軟骨分化能を評価するためのマーカーとして確立したものは存在しない。

(3) 近年、種々の細胞において蛋白質をコードしないRNA(non-coding RNA; ncRNA)が同定され、さらにこれらが細胞生理・病理に関与することも明らかにされつつあり、注目を集めている<sup>11)</sup>。細胞治療の軟骨分化過程においても、ncRNAがBMSCの軟骨分化能の個体差を規定している可能性が十分に考

えられる。仮に、軟骨分化能と相関するncRNAが特定できれば、その軟骨分化能を評価するためのマーカーとして有用であると考えられる。さらにそれらを利用した細胞製品の加工技術や、同定したncRNAを利用した核酸医薬品開発に発展する可能性も考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) 上記「臨床試験」で用いる各ドナーに由来するBMSCの増殖能と軟骨分化能を調べる。BMSCはヘテロな細胞集団であるため、移植前の準備段階で、ドナー毎にその増殖能とその後の軟骨分化能が異なる可能性が高い。広範な軟骨欠損症例に対しても良好な成績を上げるためには、優れた軟骨分化能を有する十分な数の細胞を確保することが重要である。しかしながらBMSCは培養増殖の過程で軟骨分化能が徐々に低下する(脱分化現象)ことがこれまでのin vitro研究から明らかであり、治療の制約になっている<sup>9)</sup>。増殖期に塩基性線維芽細胞増殖因子(以下bFGF)を添加することで細胞の増殖が促進されるだけでなく脱分化も抑制されるという報告があり<sup>9)</sup>、将来的な臨床への応用が期待される。現時点でbFGFの臨床における利用は困難であるが、bFGF添加による反応性を含めた細胞の品質を把握しておくことは、臨床利用上は重要である。そこで、bFGF添加の反応性を含めた各ドナーBMSCの増殖能および軟骨分化能について検討する。

(2) 同時に分化誘導前の各ドナー由来BMSCで発現しているncRNAについて網羅的なプロファイリングを行い、軟骨分化能に相関するマーカー候補を探索する。すなわち、増殖期のbFGF添加の反応性を含めた各ドナーの細胞固有の性質がどの程度軟骨分化能に寄与し、それらを特徴づけるマーカーが特定できれば、細胞の品質の把握がより容易になると考えられる。本研究では、ncRNAに着目してその同定を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 研究に必要な骨髄液は、上記「臨床試験」および前臨床試験で得られたもの、さらにドナー数確保のため、市販の新鮮骨髄液(ベリタス社)を購入して実験を行った。利用可能な骨髄液の容量により、T-175およびT-75のフラスコを使い分け、骨髄液を15%ウシ血清(FBS)を含む培養液を加えてフラスコに播種し、10ng/mlのbFGF(ペプロテック社)添加の有無で各ドナーのBMSCを分離した。培養液は3日ごとに交換し、約3日後には赤血球などの非接着細胞は培養液交換時に除去され接着細胞が観察された。培養開始後、約11-14日後、細胞が約80%コンフルエントに達したところで継代し獲得細胞数を計測した。実験に必要な細胞数のみ継代培養し、残りは凍結保存した。(以降、継代

数  $n$  を  $P_n$  と表現する。) 継代培養後は bFGF 無添加で分離した P0 の BMSC は 10%FBS, 5%FBS で培養し、bFGF 添加下で分離した P0 の BMSC は 5%FBS+10ng/mlbFGF で培養した。さらに細胞が 80~90%コンフルエントに達した時点で細胞を回収し、獲得細胞数の倍加指数を下記計算式にて算出し、培養に要した日数で除して増殖速度とした。

Population doubling (PD) =  $\log_2$  (cells at the end of passage/ cell seeded)

継代時の細胞数計測は血球計算盤およびコールター式自動細胞カウンターを用いた。

獲得細胞の一部を RNA 抽出に供し(TRIzol フェノール 抽出用試薬を使用)、残りを軟骨分化誘導実験に用いた。

(2) 軟骨分化誘導実験は bFGF 添加・非添加で培養した BMSC を共に同一条件下(血清無添加・高濃度グルコース含有 DMEM、10ng/ml TGF- $\beta$ 1、1%ITS-premix、10nM デキサメサゾン、37.5 $\mu$ g/ml L-アスコルビン 2 リン酸、1%ピルピン酸ナトリウム、1%ペニシリン/ストレプトマイシン)で  $2.5 \times 10^5$  の細胞を非接着性 V 型底 96 穴ウェルプレートに播種後、2500rpm で 10 分間遠心して行うペレット培養法を行った。ペレットは通常、24~48 時間で球形に形成され、軟骨様細胞外マトリックス(ECM)を産生するようになる。二日に一度培地を交換し 21 日目にペレットを回収し、各ドナーから得られたペレットの湿重量と生化学検査および組織染色による評価を行った。この条件で得られたペレットの湿重量の値を用いて増殖期の bFGF 添加の反応性を含めた各ドナー固有の軟骨分化度の評価を行った。また生化学検査では各ペレットのグルコサミノグリカン(GAG)蓄積量と DNA 含有量を計測した。また組織染色用のペレットはホルマリン固定後、エタノール脱脂の後パラフィンに包埋し、3 $\mu$ m の切片によりサフラニン O 染色および I 型・II 型コラーゲンの免疫染色を行った。

(3)(2) で得られた結果をもとに、軟骨分化誘導度の異なるドナーを抽出し、保存していたそれらドナーの RNA プロファイリングを microarray システム (EXIQON 社 miRCURY LNA miRNA array) で網羅的に解析し、各ドナーの軟骨分化度のマーカーとなりうる microRNA をいくつか抽出した。定量 PCR により全ドナーにおけるそれら microRNA の発現量と軟骨分化度の相関について検討を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 計画では P1、P4、P7 の検討を行う予定だったが、現行の培養方法で必要な日数や費用など臨床利用の観点から、P0 および P1 の解析のみに修正した。我々が今回骨髄細胞用を選定したロットのウシ血清 (FBS) を用いて獲得した P0 の細胞数は bFGF の添加の有

無により、それぞれ  $3.45 \pm 2.25 (\times 10^4 / \text{cm}^2)$  および  $8.35 \pm 3.13 (\times 10^4 / \text{cm}^2)$  であり、bFGF 添加条件下で有意に多かった (図 1-a)。また P1 において 10%FBS, 5%FBS, 5%FBS+10ng/ml bFGF の条件で培養させた場合、P1 における増殖速度はそれぞれ  $0.24 \pm 0.08$  (PD/d),  $0.15 \pm 0.08$  (PD/d),  $0.36 \pm 0.13$  (PD/d) となり、各群間で有意差が見られた (図 1-b)。

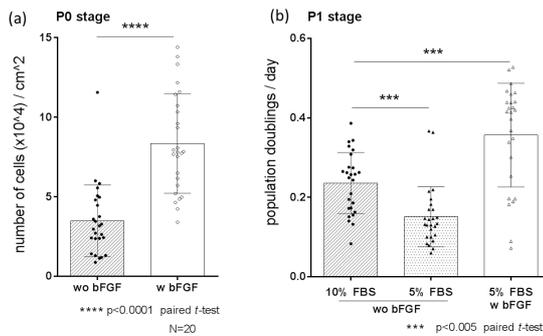


図 1. P0における獲得細胞数(a)とP1における増殖速度(b)

(2) さらに軟骨分化誘導後のペレットの湿重量は  $0.84 \pm 0.68$  (mg),  $0.85 \pm 0.71$  (mg),  $3.41 \pm 1.04$  (mg) であり (図 2-a)。さらに計測可能だった 12 ドナーの GAG/DNA 値は  $6.94 \pm 3.84$  ( $\mu$ g/ $\mu$ g),  $7.86 \pm 3.81$  ( $\mu$ g/ $\mu$ g),  $18.22 \pm 6.99$  ( $\mu$ g/ $\mu$ g) であり (図 2-b)。血清の濃度による差は認められないものの bFGF 添加による差が有意に認められた。

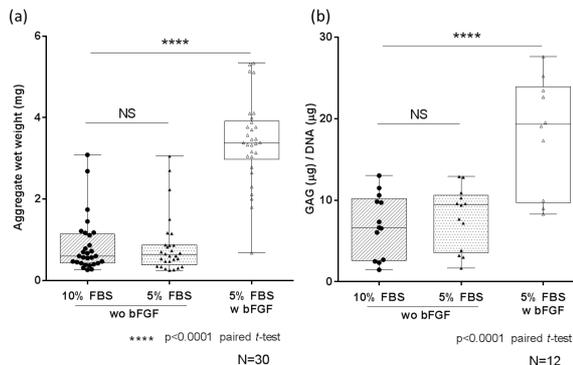


図 2. P1において各増殖条件下で培養後行った軟骨分化ペレット培養湿重量 (a) および GAG/DNA 値 (b)

また免疫組織染色でも生化学試験と同様の結果が得られ、さらにコラーゲンの染色性で bFGF 添加により I 型コラーゲンの染色性に比べ II 型コラーゲンの染色性が上がり、ドナーによってはペレットの大きさによる差も顕著に認められた (図 3)。

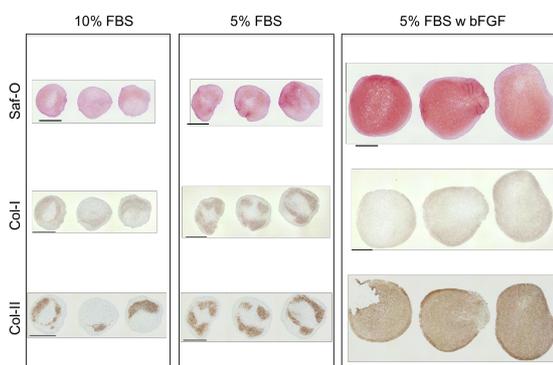


図 3. 症例提示: 1ドナーの骨髄液から各増殖条件下で培養後に作製したペレットの組織像 (500 $\mu$ m)

免疫染色を含め bFGF の反応性については従来の報告と同様の定性的な結果が得られた。さらに、各ドナーにおける条件の湿重量平均を横軸に、条件の湿重量を条件の湿重量で除した値を bFGF の反応性として縦軸にプロットしたところ、それらは反比例するばらつきを示した(図4)。  
各ドナーに対する定量指標も独自に得られ、実験の妥当性とその後解析に十分なサンプルサイズが得られたと判断された。

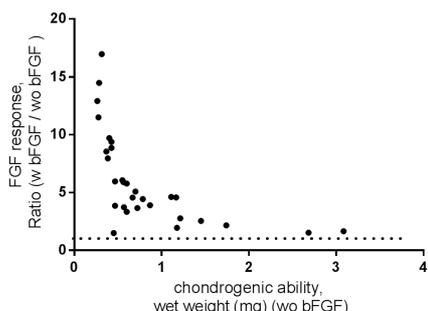


図4. 各ドナーから得られたペレットの軟骨分化度とbFGFの反応性との相関(N=30)

(3) これらを踏まえ、軟骨分化誘導前のRNAプロファイリングをmicroarrayシステム(EXIQON社 miRCURY LNA miRNA array)で網羅的に解析し、各ドナーの軟骨分化度のマーカー候補となりうるmicroRNAをいくつか抽出した。定量PCRによる検証の結果、条件の軟骨分化後の湿重量(CA)1mgを境にした群間比較でmiR708-5pの発現が1mg以上群で有意に低く、本遺伝子が軟骨分化に対しては抑制的に作用することが示唆された(図5)。しかし1mg以下群内でのバラつきは大きく、他の因子も軟骨分化誘導には関与することを示唆した。今後、bFGF処置細胞のmiR708-5pの発現量とともに他因子の関与についても検討を要すると考えられた。

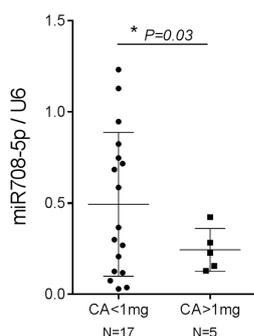


図5. 各ドナーの軟骨分化度(CA)の各群間におけるmiR708-5pの遺伝子発現量。(内在性コントロールとしてU6で標準化)

#### <引用文献>

- 1) Steadman JR, et al., Clin Orthop Relat Res 2001. S362-369.
- 2) Matsusue Y, et al., Arthroscopy, 1993. 9: 318-321.
- 3) Shapiro F, et al., J Bone Joint Surg Am, 1993. 75(4): 532-53.
- 4) Brittberg M, et al., N Engl J Med 1994. 331:

889-895.

- 5) Ochi M, et al., J Bone Joint Surg Br, 2002. 84: 571-578.
- 6) Gao J, Caplan A.I., Chir Organi Mov, 2003. 88: 305-316.
- 7) Wakitani, S., et al., J Tissue Eng Regen Med, 2011. 5(2): 146-50.
- 8) Dennis J.E., et al., Stem Cells, 2007. 25(10): 2575-82.
- 9) Solchaga L.A., et al., Tissue Eng Part A, 2010. 16(3): 1009-19
- 10) Akiyama, H., et al., Genes Dev, 2002. 16(21): 2813-28.
- 11) Lee R.C., et al., Cell, 1993. 75(5): 843-845.

#### 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7件)

系数万紀、目良恒、玉村禎宏、高木睦、脇谷滋之；骨髄間葉系幹細胞からの軟骨様細胞シートの作製および移植(前臨床試験) 関節外科(基礎と臨床) 査読なし、Vol.34 4月増刊号、2015、pp108-117

目良恒、系数万紀、脇谷滋之；関節軟骨損傷の治療-最新の知見-、関節外科(基礎と臨床) 査読なし、Vol.34, No.3, 2015、pp76-78

\*Mera H., Takigami J., Tamamura Y., Itokazu M., Yamazoe M., Hashimoto Y., Endo N., \*Wakitani S. (\*共責任著者), Potential for Tumorigenesis and Repair Osteochondral Defects by iPS cell Transplantation in Rat. American Journal of Tissue Engineering and Stem cell, 査読有、1(1)、2014、pp39-50

Yamasaki S., Mera H., Itokazu M., Hashimoto Y., Wakitani S., Cartilage Repair With Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation: Review of Preclinical and Clinical Studies. Cartilage, 査読有、October (5), 2014、pp196-202

〔学会発表〕(計8件)

目良恒、石橋宰、高木睦、脇谷滋之；骨髄間葉系細胞を用いた関節軟骨再生治療の研究開発 The research and development for cartilage regenerative medicine with bone marrow mesenchymal stem cells. シンポジウム；招待講演)；第7回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会(JOSKAS), 2015.6.18-20, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

系数万紀、目良恒、中村博亮、高木睦、脇谷滋之；骨髄間葉系幹細胞からの軟骨様細胞シートの作製および移植(シンポジウム；招待講演) 第29回日本整形外科学会基礎学会, 2014.10.9-10, 城山観光ホテル(鹿児島県・鹿児島市)

目良恒、脇谷滋之；変形性関節症と再生医療(シンポジウム；招待講演)；第58回

日本リウマチ学会, 2014.4.24-26, グランドプリンスホテル新高輪国際館パミール(東京都・港区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

目良 恒 (MERA, Hisashi)

武庫川女子大学・健康スポーツ科学部・博士研究員

博士研究員

研究者番号: 70650381