

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11236

研究課題名(和文)自家再生組織移植における危険関連分子パターンの解析と再生医療への応用

研究課題名(英文) Analysis of damage-associated molecular patterns (DAMPs) in autologous tissue-engineered cartilage and its application to regenerative medicine

研究代表者

藤原 夕子 (Fujihara, Yuko)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50466744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：再生医療において、移植に用いる細胞の質の確保は重要な課題である。たとえ自家移植であっても、何らかの原因により細胞が損傷を受ければ自然免疫が惹起される可能性もある。本研究では、人為的に耳介軟骨細胞に限局的なダメージを与え、放出されるダメージ関連分子パターン(DAMPs)が軟骨再生に与える影響を検討した。培養細胞が熱処理などにより生存性では表現されない細胞ダメージを受けると、DAMPsなどを介して再生組織の成熟や恒常性が著しく阻害される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To obtain stable outcomes in regenerative medicine, quality of cells for transplantation is of great importance. Potentially, cellular stress results in the release of damage-associated molecular patterns (DAMPs), and activates immunological responses, affecting the outcomes of transplanted tissues. In this study, we intentionally prepared necrotic chondrocytes to be gradually dying and releasing DAMPs, and investigated how the viability of chondrocytes could affect the maturation of tissue-engineered cartilage. It was suggested that DAMPs from necrotic chondrocytes could prompt migration of more immune cells, worsening the maturation of tissue-engineered cartilage.

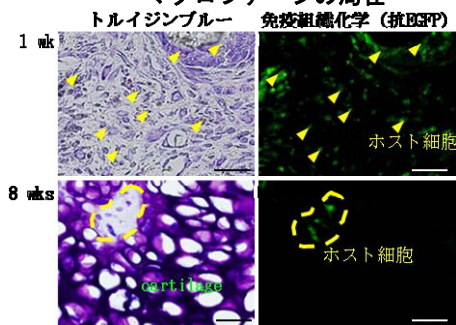
研究分野：軟骨再生医療

キーワード：軟骨再生医療 DAMPs

1. 研究開始当初の背景

顎顔面領域の軟骨再生医療は、隆鼻術やオトガイ形成に対して、自家軟骨細胞を移植する治療法が既に臨床応用されている (Yanaga et al *Plast Reconstr Surg* 2006)。しかし、足場素材を用いず細胞懸濁液/ゲルの形状で移植する既存法は、強度の保持や3次元形態の維持が困難である。われわれは、顎顔面領域における軟骨再生医療には、足場素材の併用が必要不可欠であると考え、効率の良い軟骨細胞培養法の確立や適切な足場素材の導入を検討し、自家耳介軟骨細胞とポリ乳酸足場素材から構成されるインプラント型再生軟骨を開発した (Tanaka, Hoshi et al. *Biomaterials* 2010, Takato, Fujihara, Hoshi et al. *Oral Sci Int* 2014)。移植された再生組織が着生し、組織成熟が促進されるためには、組織反応の制御が重要な課題となる。実際、1990年代より米国ハーバード大学をはじめ、国内外の多くの研究グループが足場素材を用いた軟骨再生を試みてきたが、免疫不全動物であるヌードマウスでは成功するものの、正常な免疫系を有する動物では組織反応により組織成熟が阻害され、ハードルが高くなることが知られている。われわれは、足場素材と軟骨細胞から構成される再生軟骨の移植後組織反応を詳細に解析する目的で、正常な免疫能を有する EGFP 遺伝子導入マウス (EGFP-C57BL/6J) をホストに再生軟骨の同系移植を行い、EGFP 蛍光を指標にホスト由来細胞の動態を経時的に追跡した。その結果、ホスト由来細胞はその殆どが F4/80 陽性のマクロファージであり、移植後急激に増加した後、軟骨の成熟が進む移植後2週以降、著しく減少することが明らかとなった (Fujihara, Hoshi et al. *Biomaterials* 2010) (図1)。われわれは、移植後早期の組織反応を制御することが、組織成熟に促進的に働くと考えている。

図1 再生軟骨組織におけるマクロファージの局在



移植後1週で散在性に局在しているホスト由来細胞は経時的に減少し、移植後8週では非軟骨領域にのみ偏在する。

多細胞生物は、病原菌の病原微生物関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) を認識し、生体防御反応としての炎症反応を惹起するメカニズムを有している。しかし近年の研究により、外来性の病原微生物のみが、組織や細胞にダメー

ジとなるわけではないことが明らかとなってきた。生体内においては、組織や細胞の損傷は、危険関連分子パターン (danger-associated molecular patterns, DAMPs/Alarmin) として認識され、自己由来の起炎性因子となる (図2)。従って、細胞を用いる再生医療において、細胞培養から移植後早期にかけた非生理的環境により誘発された細胞傷害は、移植細胞からの DAMPs 放出を促し、たとえ自己細胞を用いた場合でも、組織反応の増悪をもたらす可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、培養過程で傷害を受けた軟骨細胞から放出される DAMPs が再生軟骨移植において惹起する組織反応や組織成熟へ与える影響を解明するとともに、得られた知見を再生組織移植の組織反応制御に反映させ、再生医療の発展に貢献することを目指す。

3. 研究の方法

1. Necrotic 細胞の作製

DAMPs を放出する細胞 (Necrotic 細胞) を作製するため、10cm dish に播種した C57BL/6J マウス耳介軟骨細胞を、55°C で 30 分間熱処理した。PBS で 2 回洗浄後、Isogen で RNA を回収し遺伝子発現を検討した。一部の培養皿には DMEM/F12 を添加し、継時的な細胞生存率を追跡した。

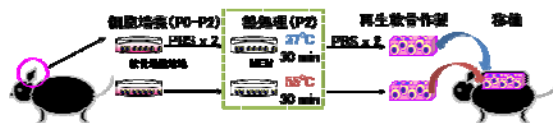


2. 細胞の腹腔投与

Necrotic 細胞が惹起する免疫反応を検証するため、上記の熱処理直後の normal および necrotic 細胞 (10⁷ viable cells/mL, Hank's buffered saline) を、C57BL/6J マウス腹腔へ 2 mL 投与した。投与6日後に、腹腔内の細胞を回収して播種し、4 時間後の接着細胞を、腹腔マクロファージとしてカウントした。

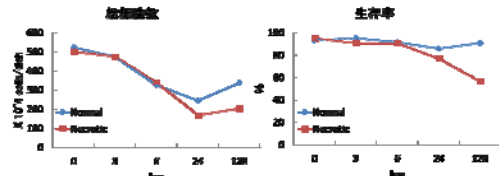
3. 再生軟骨移植

C57BL/6J マウスから、耳介軟骨細胞を採取し、増殖培養した。熱処理後の細胞を回収し、PLLA 多孔性足場素材に播種して再生軟骨を作製した。背部皮下へ同系移植した再生軟骨組織を継時的に摘出し、組織学的、免疫組織化学的に評価すると共に、軟X線撮影、骨密度測定を行った。



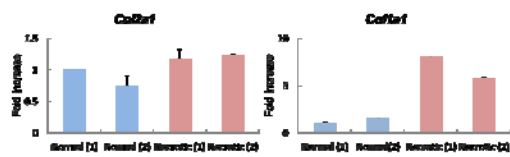
4. 研究成果

1. Necrotic 細胞の総細胞数と生存率



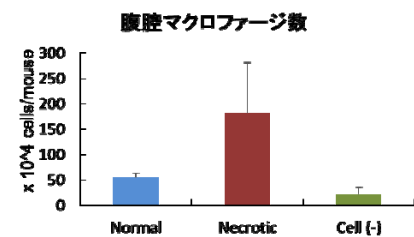
マウス耳介軟骨細胞 (P2) を 55°C で 30 分間熱処理して、Necrotic 細胞を作出した。Necrotic 細胞は、処理後 6 時間までは熱処理を行わなかった細胞 (Normal) と同等の総細胞数、生存率を示した。しかし、移植後 1 日目あたりから、Necrotic 細胞では総細胞数や生存率が低下することが示された。

2. Necrotic 細胞の遺伝子発現



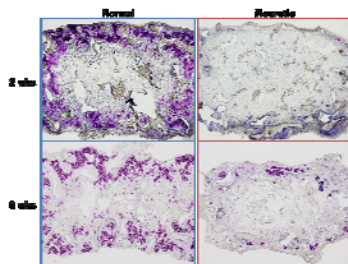
熱処理直後の Necrotic 細胞の遺伝子発現を、real-time RT-PCR で検討した。Necrotic 細胞では、熱処理を行わなかった Normal 細胞と比較し、II 型コラーゲン (*Col2a1*) の発現は増加傾向を示し、I 型コラーゲン (*Col1a1*) は、著しく発現上昇した。

3. Necrotic 細胞が惹起する免疫反応



Normal および necrotic 細胞 (2×10^7 viable cells) を、C57BL/6J マウス腹腔へ投与し、惹起される免疫反応を検討した。投与 6 日目の腹腔マクロファージ数は、necrotic 細胞を投与した際に最も多く、細胞が壊死に陥る過程で放出された DAMPs により、マクロファージが遊走し、自然免疫が惹起されている可能性が示唆された。

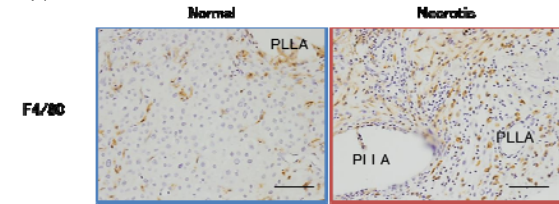
4. Necrotic 細胞を用いた再生軟骨移植



Normal および necrotic 細胞を用いて再生軟骨組織を作製し、C57BL/6J 背部皮下へ同系移植した。移植後 2 週、8 週で再生軟骨組織を

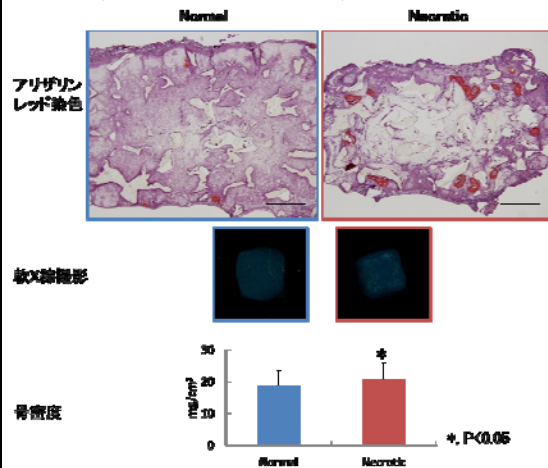
摘出し、トルイジンブルー染色を行った。Necrotic 細胞を用いた再生軟骨組織では、メタクロマジー領域が狭く、基質の蓄積が低下していることが観察された。

5. 再生軟骨組織におけるマクロファージの局在



再生軟骨移植後 2 週のマクロファージの局在を、抗 F4/80 抗体を用いた免疫組織化学染色で検討した。Necrotic 細胞を用いた場合には、再生軟骨組織内の F4/80 陽性細胞の局在が高く、細胞から放出された DAMPs により、マクロファージの局在が増加している可能性が推察された。

6. 軟骨再生における石灰化



一部の移植後 8 週のサンプルで、石灰化が観察されたため、normal と necrotic 細胞を用いた再生軟骨移植における石灰化の程度を検討した。アリザリンレッド染色により石灰化領域を検出したところ、necrotic 細胞を用いた際に、石灰化領域が増加する傾向が示唆された。軟 X 線撮影においても、necrotic 細胞を用いた再生軟骨で、石灰化と推察される不透過性領域の増加が観察された。また、necrotic 細胞を用いた再生軟骨で、有意に骨密度の上昇を認めた。Scale bars, 1 mm.

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 2 件)

1. Fujihara Y, Hikita A, Takato T, Hoshi K. Roles of macrophage migration inhibitory factor in cartilage tissue engineering. *J Cell Physiol*. 2018 Feb;233(2):1490-1499.
2. Fujihara Y, Nitta N, Misawa M, Hyodo K, Shirasaki Y, Hayashi K, Kosaka R, Homma K,

Numano T, Kuribayashi S, Watanabe Y, Sato J, Ohtomo K, Takato T, Hoshi K. T2 and Apparent Diffusion Coefficient of MRI Reflect Maturation of Tissue-Engineered Auricular Cartilage Subcutaneously Transplanted in Rats. Tissue Eng Part C Methods. 2016 May;22(5):429-38.

3.

[学会発表] (計 4 件)

1. Fujihara Y, Hikita A, Hoshi K. : Roles of macrophage migration inhibitory factor in cartilage tissue engineering. 13th World Congress on Inflammation, July 8-12, 2017, London UK. Hilton London Metropole

2. Fujihara Y, Hikita A, Takato T, Hoshi K. : Roles of macrophages in transplantation of tissue engineered cartilage in mice. International Congress of Immunology 2016, August 21-26, 2016, Melbourne, Australia, Melbourne Convention and Exhibition Centre

3. Fujihara Y, Hikita A, Saijo H, Kanno Y, Takato T, Hoshi K : Basic and clinical research on custom-made artificial bone and tissue-engineered cartilage in oral and maxillofacial region. 2015 4th TERMIS World Congress, September 8-11, 2015, Boston, MA, USA, Boston Marriott Copley Place

4. 藤原夕子: 歯科分野における再生医療. ニューセラミックス懇話会第 219 回研究会 バイオ関連セラミックス分科会第 49 回研究会. 大阪 (株式会社島津製作所 関西支社 マルチホール). 2015 年 10 月 23 日.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 夕子 (FUJIHARA, Yuko)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号 : 50466744

(2) 研究分担者

星 和人 (HOSHI, Kazuto)
東京大学・医学部附属病院・教授
研究者番号 : 30344451

(3) 連携研究者

高戸 毅 (TAKATO, Tsuyoshi)
東京大学・医学部附属病院・登録診療員
研究者番号 : 90171454

(4) 研究協力者
該当なし