

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11826

研究課題名(和文) フォーカスト・プロテオーム解析による再生組織成熟シグナルの解明と再生医療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of regenerative tissue maturation signal by focused proteomic analysis and its application to regenerative medicine

研究代表者

上床 喜和子 (Uwatoko, Kiwako)

東京大学・医学部附属病院・登録診療員

研究者番号：20769583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨細胞を播種したインサートに、もう一つのインサートを接着し、軟骨形成および組織液貯留が可能となるデバイスを開発した。細胞播種面を外底面、内底面、内底面+蓋の条件で移植を行った。外底面群は軟骨の成熟が認められたが、内底面群はやや遅れて軟骨の成熟を認めた。内底面群で遅れて軟骨成熟が観察された理由は、メンブレンを介した細胞接触の可能性が推測された。メンブレンを介した直接接触の遮断によって軟骨形成が阻害されたことからgap junctionを介して接触していることが明らかとなった。以上の結果から、ギャップジャンクションの役割とデバイス内に貯留した組織液のプロテオーム解析の関連性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、生体内と培養系における軟骨細胞の成熟過程の違いに着目し、先鋭的なプロテオーム解析を導入した比較検討から、生体内における組織成熟過程に関わる因子やシグナル伝達過程を検討する点に特色がある。本申請により、生体内に移植された軟骨細胞の組織成熟シグナルが解明され、再生軟骨を *in vitro* で構築することが可能になれば、軟骨再生医療の本質的な課題を克服する画期的な成果に繋がる。本研究が口腔外科領域ばかりでなく、整形外科や形成外科領域の骨軟骨疾患への応用など、広く医療に貢献する知見となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The new device was developed to attach another insert to an insert seeded with chondrocytes, allowing for the ability to chondrogenesis and the storage of tissue fluid. The cell seeding surfaces were transplanted under the following conditions: outer basal, inner basal, and inner basal plus lid. The outer basal group showed cartilage maturation, while the inner basal group showed a slightly delayed cartilage maturation. The reason for the delayed cartilage maturation observed in the inner basal group was speculated to be the possibility of cell contact through the membrane. The blockade of direct contact through the insert membrane inhibited chondrogenesis, indicating contact through the gap junction with the membrane separated. Thus, the role of gap junctions and the relevance of the proteome analysis of the tissue fluid stored in the device were clarified.

研究分野：顎顔面領域の再建

キーワード：軟骨再生医療 移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

軟骨再生医療は、再生医療の中でも臨床応用が進んでいる領域で、口腔・顎顔面領域においても、患者自身の軟骨組織から分離・増殖させた軟骨細胞を移植する自家軟骨細胞移植術が臨床応用されている。われわれも、唇裂鼻変形を有する患者に対し、患者由来の耳介軟骨細胞をポリ乳酸足場素材に播種して作製するインプラント型再生軟骨の治験を実施している (UMIN000017734)。組織から単離された軟骨細胞はユニークな特徴を有しており、増殖培養中に軟骨特性を失って脱分化するため基質産生能を喪失するが (von der Mark et al. Nature 1997) 生体内に移植されると再び活性化され、基質産生を再開し組織成熟が進行する。現行の軟骨再生医療はそのような軟骨細胞の特性を活用して行われているが、一方で、軟骨細胞が生体内で組織成熟する分子メカニズムの詳細は未だ不明であり、移植前の再生軟骨に軟骨特性や十分な力学的強度を与えることができない。そのような軟骨再生医療の弱点を克服するため、培養中に脱分化した軟骨細胞を *in vitro* で組織成熟させ、移植時の再生軟骨に強度と組織構造を付与しようとする試みが、多くの研究グループにより取り組まれてきた。しかし、軟骨細胞の基質産生を増加させることはできても、生体内へ移植された時と同等の軟骨成熟や組織形成を誘導することは非常に困難である。申請者らも、培養時に脱分化した軟骨細胞を *in vitro* で組織成熟させる試みとして、医薬品として認可されている液性因子を用いた検討を行い、生理的軟骨組織に匹敵する軟骨基質の産生を誘導する培養法を確立した (Hoshi et al. J Biol Chem 2007)。しかし、この基質誘導培養により基質産生は増加するものの、軟骨細胞を生体内へ移植した際のような組織形成は誘導されず、移植時と培養時の組織成熟過程には根本的な違いがあることが示唆された。したがって、「脱分化した軟骨細胞を *in vitro* で成熟させ、生理的軟骨に匹敵する再生軟骨組織を作る」という軟骨再生医療における長年の課題を克服していくためには、生体へ移植された軟骨細胞を網羅的に解析し、組織成熟シグナルを解明し、*in vitro* において成熟した再生軟骨を誘導する方法の確立が必要不可欠である。

2. 研究の目的

培養により脱分化した軟骨細胞を生体へ移植すると、自然と成熟して軟骨組織が形成される。一方、*in vitro* において基質誘導培地で培養された軟骨細胞は、基質産生は増加するものの組織形成は認めない。本申請では、「生体へ移植された軟骨細胞」と「基質誘導培地で培養された軟骨細胞」におけるタンパク発現を、プロテオーム解析により網羅的かつ精緻に解析し、両者の相違から、生体内における組織成熟現象に関与する因子やシグナル伝達経路を明らかにする。さらに得られた知見を基に、*in vitro* で再生軟骨を組織成熟させ、より優れた軟骨再生医療を確立することを目指す。

3. 研究の方法

1. *In vivo* および *in vitro* における軟骨細胞成熟過程の継時的評価

「生体へ移植された軟骨細胞 (*in vivo* 群)」および「基質誘導培地で培養された軟骨細胞 (*in vitro* 群)」の成熟過程について、継時的な比較検討を行う。手術時に切除され治療や診断で必要がないため破棄されているヒト耳介軟骨組織を、インフォームドコンセント後に患者から採取し (東京大学医学部倫理委員会承認済み、#622)、メスで約 1 mm 大の大きさに細切した後、0.15% コラゲナーゼ溶液で 37、24 時間の酵素処理を行う。単離した軟骨細胞を増殖培地にて培養させた後 (P0)、24 well プレートにポリプロピレンプレートのカバースリップ 12mm (Thermo Scientific™) を静置し継代する (P1)。*In vivo* 群については、培養 7 日後に軟骨細胞をカバースリップごとプレートから取り出し、ヌードマウスの腹腔内へ細胞面を腸に向けて移植する。*In vitro* 群では、カバースリップ (P1) での培養 7 日後に増殖培地を吸引し、基質誘導培地 (BMP-2、insulin、甲状腺ホルモン T3 添加 DMEM/F12; Hoshi et al. J Biol Chem 2007) で培養する。*In vivo* 群、*in vitro* 群ともに 1、2、3、4 週で回収し、トルイジンブルー染色、ヘマトキシリンエオジン染色で組織学的に軟骨細胞の成熟過程を評価する。また、ISOGEN (ニッポンジーン) により RNA を抽出し、軟骨分化マーカーである I, II, X 型コラーゲン、アグリカンの遺伝子発現を real-time RT-PCR (Applied BioSystem 社製 7500 Fast Real-Time PCR Systems、現有) により検討する。また、一部のサンプルについては M-PER によりタンパクを抽出し、glycosaminoglycan (GAG) を定量測定する。以上から、腹腔内へ移植された軟骨細胞および基質誘導培地で培養された軟骨細胞の成熟過程の相違を比較する。

2. 軟骨細胞の成熟過程に関わる因子の網羅的検索

In vivo および *in vitro* における軟骨細胞の組織成熟過程に関わる分子を、網羅的に検索する。第 1 項に準じてカバースリップへ播種した軟骨細胞を準備し、ヌードマウスの腹腔内へ移植、あるいは基質誘導培地で培養する。第 1 項の検討で *in vivo* 群と *in vitro* 群の差が顕著になる時期を目安にカバースリップを回収し、M-PER によりタンパクを抽出する。そ

それぞれの細胞抽出液全体を二次元電気泳動にかけ、スポットの差を比較検討する。その際、2次元電気泳動マップ(Swiss Institute of informatics: ExPASy server)のデータベースを利用し、生体内と培養時の組織成熟過程で関わる分子の網羅的検索を行う。質量分析によるタンパク同定を行い、両群の比較から *in vivo* 群特異的に発現し、組織構築に関与していると推察される候補分子を模索する。また、シグナル伝達因子に関しては、試料内での含有量が微量であるため、通常の2次元電気泳動では候補分子の選定が困難になる。それぞれの試料をリン酸化タンパク質フラクションカラムにより濃縮し、フォーカスド・プロテオーム解析を行う。

3. 組織成熟シグナル伝達機構の解明と促進因子の選定

選定分子の更なる解析により、生体における軟骨細胞の組織成熟に関わるシグナル経路を解明し、その促進因子を選定する。第1項に準じて、マウス腹腔へ移植した軟骨細胞からタンパクを抽出する。上記で選定した候補分子のウェスタンブロットティングにより、その継時的な発現変化を検証する。併せて、シグナル伝達に関わる候補分子については、上流あるいは下流分子についても、ウェスタンブロットティングを行い、関与するシグナル伝達経路を模索する。また、腹腔へ移植したカバースリップ上の軟骨細胞について、候補分子の免疫組織化学染色を行い、軟骨成熟過程に伴う候補因子の局在変化を観察する。以上を総合的に勘案し、生体内における軟骨細胞の組織成熟誘導との関連が示唆される因子を選定し、シグナル伝達経路を解明する。

4. 選定因子の軟骨成熟促進効果の検証

選定した因子について、培養軟骨細胞での軟骨成熟促進効果を検証する。選定因子の恒常活性型あるいは抑制型遺伝子をクローニングし、レンチウイルスにそれぞれの遺伝子を組み、ヒト耳介軟骨細胞(P0)に導入する。第1項と同様にカバースリップに播種し、DMEM/F12および組織成熟誘導培地にて培養する。培養1,2,3,4週で、カバースリップごと回収し、組織学的観察、免疫組織化学的観察、遺伝子発現、生化学的定量を行う。恒常活性型遺伝子を導入した軟骨細胞が組織成熟し、生体へ移植した際と同等の組織形成が誘導されるかを検証する。

5. 軟骨成熟促進因子を活用した培養法の確立

上記で検証された軟骨成熟促進因子が液性因子である場合は、第1項に準じて軟骨細胞を培養する際に、培地中へ種々の濃度で添加し、*in vitro* で培養軟骨細胞の組織成熟を誘導する。関与するシグナル経路の全容が明らかになっている場合には、そのリガンドやシグナル伝達関連化合物により刺激し、その効果を検証する。リガンドや化合物の入手が困難な場合は、細胞毒性や安全性を考慮し、リポフェクション法により因子の遺伝子導入を行う。成熟促進因子の刺激下で軟骨細胞を4週間培養した後に、第1項に準じて組織学的観察、免疫組織化学的観察、遺伝子発現、生化学的定量を行い、*in vitro* で軟骨組織形成を促進する培養法を検討する。

6. 軟骨再生医療への応用

前項で確立した培養法により、軟骨としての組織形状と十分な強度を有する再生軟骨を *in vitro* で作製し、それを移植することにより軟骨再生医療への応用を検討する。ヒト耳介軟骨細胞(2 x 10⁷ 細胞)をポリ乳酸多孔体(5 x 5 x 3 mm)に播種して再生軟骨組織を作製し、前項で検討した方法を用いて前培養する。ヌードマウス皮下へ移植した後2,8週で再生軟骨組織を摘出し、第1項に準じた組織学的観察、組織化学的観察、遺伝子発現、生化学的定量、生体力学的評価を行う。さらに大型動物での検討として、ビーグル犬(オス6ヶ月齢)耳介軟骨から軟骨細胞を採取し、同様に再生軟骨を作製、前培養し、同一個体のビーグル犬を移植する。移植後8週での軟骨再生を評価することにより、軟骨成熟促進因子の軟骨再生医療への応用を探る。

4. 研究成果

まずヒト軟骨細胞播種カバースリップに関する比較検討を行った。移植は腹腔内および背部皮下に移植し、移植部位での軟骨形成の違いも検討した。腹腔内移植では、大網・腹膜との接触により軟骨形成が惹起されるという報告(Buyukdogan Ket al. Acta Orthop Traumatol Turc. 2016 Oct;50(5):539-543.)を元に、閉鎖空間である腹腔内に貯留した宿主側の因子を検索、同定するため腹腔内を移植場所として選択した。結果として軟骨形成は認めるものの移植細胞が接触する臓器は様々で、回収時にカバースリップの局在は一定しなかった。そのため腹腔内を一定の条件として扱うことは難しく、発現因子の同定のためにはやや煩雑と思われた。軟骨の成熟に関して一定の経過が得られず、解析すべきタイミングの把握がやや困難である。背部皮下移植は、軟骨の成熟は良好であるが、宿主皮下組織と直接接触している環境での移植であるため、回収検体の識別が困難である。そこで、より解析が容易となる条件の検討を行った。軟骨細胞の一定の部位への局在化タイムポイントを限定して解析する必要があるため、タンパクを含む組織液は透過可能だが細胞の透過を制限する大きさの小孔をもち細胞同士の非接触性の共培養に用いられるメンブレンに注目した。コーニング社のポリカーボネート製COSTAR スナップウェルインサート(直径2cm 高さ5mm)で細胞は透過しないポア 0.4 μm に細胞を播種

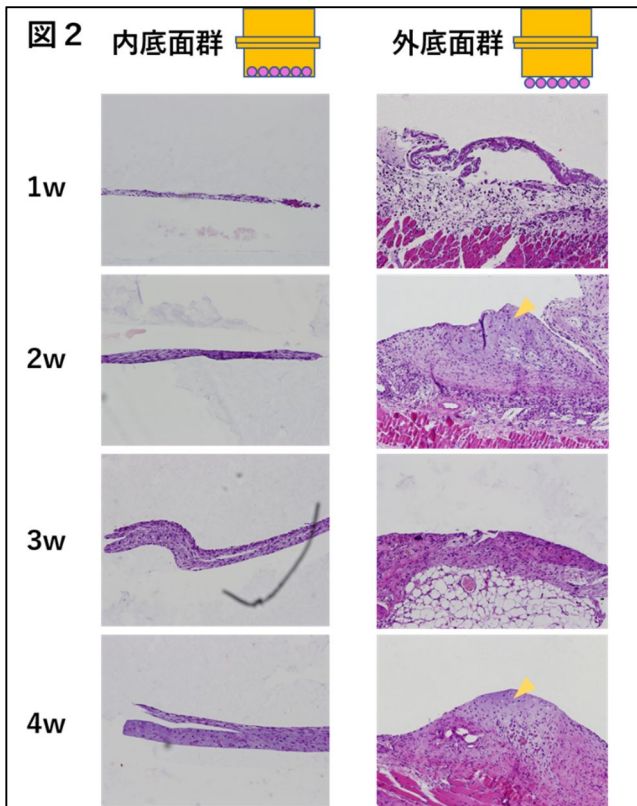
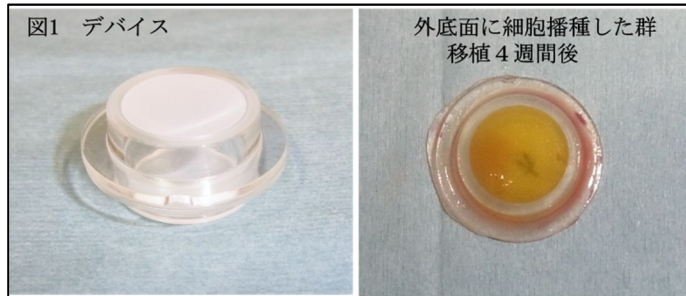
し、もう一つのインサートを接着させることにより、軟骨形成の有無および組織液貯留が可能となるデバイスを開発した。軟骨が成熟する群として宿主細胞と軟骨細胞が直接接触するデバイス外底面へ軟骨細胞を播種する外底面群を設定した(図1)。

成熟がないであろう群としてはデバイス内底面へ軟骨細胞を播種

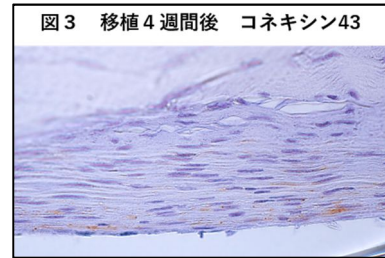
する内底面群を設定した。カバースリップと同様に P1 でインサートへ軟骨細胞を播種し、1 週間培養したのちコンフルエントを確認しデバイスを作成、ヌードマウスの背部皮下へ移植する。回収は 1, 2, 3, 4 週とした。内底面群の結果は、おおよそ 3 週目までは軟骨基質の成熟は認められないが、細胞は重層に増殖する傾向にあった。4 週目において軟骨ラクナ、強塩基性の所見など軟骨組織様の所見が認められることが多く、8 週目ではさらなる軟骨基質の成熟が認められる。軟骨播種カバースリップの背部皮下移植と比較してやや遅れて軟骨の成熟が認められた。軟骨成熟に関する時間経過は比較的安定している。外底面群の結果は、回収時の所見は、2・3 週目くらいからデバイス底面にやや硬さのあるペレット様の組織を認め、3・4 週目ではほぼ全例に軟骨様の硬さのある組織を認めた。3・4 週目において組織回収時に軟骨様組織の局在は不均一であった。そのため一部組織切片では明らかな軟骨成熟を認めていないと思われる。総じて背部皮下への軟骨細胞播種カバースリップの移植とおおよそ類似した軟骨成熟の過程を観察した。以上の結果より、外底面群において、軟骨細胞播種カバースリップの *in vivo* への移植と同様に軟骨の成熟が認められた(図2)。

軟骨成熟の有無で外底面群と内底面群の比較を考えていたが、内底面群においても外底面群よりやや遅れて軟骨の成熟を認めた。またその時間経過は比較的安定していた。デバイスへの組織液貯留量は一定しており、1 週で 0.5ml、2 週以降はほぼデバイス内を満たし 1.0ml 程度であった。性状も淡黄色で透明とほぼ均一であった。次に、内底面群は遅れて軟骨成熟がえられた理由として、インサートメンブレンを介した細胞接触の可能性を推測した。メンブレンを介した軟骨細胞同士の接触の報告もある (Articular chondrocyte network mediated by gap junctions: role in metabolic cartilage homeostasis, Maria D Mayan et.al., Ann Rheum Dis. 2015 January ; 74(1): 275-284.) ことから、デバイス内軟骨細胞と宿主細胞は直接接触しないと想定していたが、メンブレンを隔てた状態で gap junction を介して接触している可能性も考えられた。そこで、メンブレン

を介した細胞接触の遮断としてメンブレンの外側にポリカーボネート板を接着させ、完全に遮断したところ、栄養状態の悪化などからの明らかな細胞死は観察されなかった。デバイスへの組織液の貯留に関しては、内底面群と比較して量的、質的に著明な変化を認めなかった。軟骨細胞が基質を産生し成熟した所見は観察されなかったことから、内底面群はインサートメンブレンを通して gap junction によって細胞接触をすることにより軟骨成熟が遅延して生じていることが示唆された。次に、gap junction が軟骨形成および成熟に関連していることが明確になったため、ギャップ結合の構成成分の一つであるコネキシン 43 (Cx43) が移植後、移植細胞において局在が観察されるかを調べるため、Cx43 抗体をもちいて免疫染色を行った。移植 4 週間後の組織所見において、移植細胞が形成した組織内に Cx43 陽性細胞が散在していた。ギャップ結合は、1~2 nm の孔をもった六角柱状のタンパク質複合体 (ヘミチャネル) が細胞膜上に存在し、隣接する細胞のヘミチャネルと 2~4 nm の隙間 (ギャップ) を挟んで相対し、両細胞間の物質交換を可能にする。一方、ヘミチャネル構造には細胞間結合にかかわらず、自己分泌や傍分泌にかかわるものも報告されており、単にヘミチャネルとよばれる。これらのチャネルは、分子量 1 kDa 程度以下の分子のみ、すなわち、イオン、cAMP、ATP、イノシトールリン酸などが通過できる。このことから、移植した細胞においても Cx43 の陽性局在が観察されたことから、ヘミチャネル



ル構造として物質交換をしている可能性が考えられた(図3)。したがって、gap junctionのヘミチャンネルで交換された物質とデバイス内に貯留した組織液との関連性があることが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hoshi K, Fujihara Y, Yamawaki T, Harai M, Asawa Y, Hikita A	4. 巻 149(4)
2. 論文標題 Biological aspects of tissue-engineered cartilage	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Histochem Cell Biol	6. 最初と最後の頁 375-381
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00418-018-1652-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 上床喜和子、須佐美隆史、市ノ川義美、兼古晃輔、大久保和美、井口隆人、岡安麻里、星和人	4. 巻 28(3)
2. 論文標題 矯正歯科治療・顎矯正術・舌縮小術を行ったOpitz症候群の1例	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Jpn. J. Jaw Deform	6. 最初と最後の頁 235-244
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡安 麻里, 大久保 和美, 須佐美 隆史, 井口 隆人, 内野 夏子, 高橋 直子, 上床 喜和子, 松林 幸枝, 谷口 明紗子, 杉山 円, 末永 英之, 西條 英人, 星 和人
2. 発表標題 外科的矯正治療および矯正歯科治療単独治療を行った片側性唇顎口蓋裂患者の治療後の顔面形態の比較
3. 学会等名 第42回 日本口蓋裂学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西條 英人, 井口 隆人, 岡安 麻里, 末永 英之, 杉山 円, 谷口 明紗子, 大久保 和美, 内野 夏子, 高橋 直子, 上床 喜和子, 松林 幸枝, 須佐美 隆史, 星 和人
2. 発表標題 口腔前庭形成術後における保護床の比較
3. 学会等名 第42回 日本口蓋裂学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤原 夕子, 西條 英人, 倉林くみ子, 末永 英之, 浅輪 幸世, 西澤 悟, 金澤三四郎, 宇都 さくら, 稲木 涼子, 杉山 円, 米永 一理, 疋田 温彦, 高戸 毅, 星 和人
2. 発表標題 インプラント型再生軟骨移植を用いた唇裂鼻変形の修正術における顔貌変化の評価
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	藤原 夕子 (Fujihara Yuko) (50466744)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	
研究分担者	西條 英人 (Saijyo Hideto) (80372390)	東京大学・医学部附属病院・准教授 (12601)	
研究分担者	星 和人 (Hoshi Kazuto) (30344451)	東京大学・医学部附属病院・教授 (12601)	