

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591768

研究課題名 (和文) 骨軟骨フラグメントの開発

研究課題名 (英文) Development of bone-cartilage fragment

研究代表者

川村 孝一郎 (KAWAMURA KOICHIRO)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：80408533

研究成果の概要：関節リウマチと変形性関節症患者から採取したヒト骨髄幹細胞の骨・軟骨・脂肪細胞分化能を証明した。炎症環境下で骨髄幹細胞の多分化潜在性が維持できるかを検証する目的で、*in vitro* で炎症性サイトカイン IL-1、IL-1、TNF、IL-1 を添加して骨髄幹細胞の多分化能、特に骨細胞分化させた。分化抑制効果と認めるも、抗 TNF 療法製剤である Infliximab 投与により骨分化抑制効果の減弱を示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：幹細胞、軟骨再生、骨再生

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は国民生活問題の中で最も一般的な疾患のひとつで、65 歳以上の人口の約 50% 近くが罹患していると言われている。その治療法としては、ヒアルロン酸関節内投与や理学療法、そして人工関節に代表される関節形成術が主流である。

変形性関節症の病因の一つに軟骨変性が挙げられる。これに対して実際医療では明確な手段は無く、狭い範囲の軟骨変性に対しては、ドリリングによる軟骨様組織形成術やモザイク形成術という、良好な部位からの軟骨骨プラグを採取しそれを罹患部位に移植することが行われている。しかし広範囲な軟骨変性に対しては、人工関節以外、何ら手段がないのが現状である。実験室レベルでは、

軟骨細胞移植や Scaffold を使った *ex vivo* での軟骨様組織の移植などが施行され、6 か月～1 年程度の期間であれば形態的には良好な成績を収めているという報告は多く認められる。しかしその組織は本来の弾性軟骨ではなく、線維性の軟骨様組織であり、多くは 5 年程度で脱落する組織である。以上より現時点では軟骨組織再生として決定的な方法は無いというのが現状であった。

2. 研究の目的

臨床応用として最も生体軟骨に近い形で再生を達成しているのが、モザイク形成術と呼ばれる骨軟骨プラグによる罹患部位への移植術である。その利点は天然の骨軟骨を採取しそのまま移植するため生着率が高いこ

と、そしてその後の組織の維持が極めて良好であることである。しかし Donor である良好な軟骨組織に限界があり、広範囲な軟骨欠損に対しては完全に覆うことができないという欠点があった。

近年、軟骨再生分野で、多機能分化潜在性を秘めた間葉系幹細胞を用いた軟骨再生を試みる研究が多く見受けられるようになった。間葉系幹細胞は、軟骨細胞に比べ細胞採取や培養・増殖が比較的容易であり、また採取元も骨髄・脂肪・筋肉・腱と多彩であることが有利である。また採取後の間葉系幹細胞は培養条件により軟骨・骨・脂肪組織への分化増殖も比較的容易にできることから、組織再生分野ではそれぞれの再生組織について数多くの研究が行われている。

今研究の目的は、前述したモザイク形成での骨軟骨プラグを人工的に作成することを究極目標とした。材料としては当施設で施行される人工関節手術で採取可能な骨髄液を採取し、骨髄由来間葉系幹細胞を単離し、培養、そして骨・軟骨組織を同一細胞より分化させ、最終的には骨組織と軟骨組織とが隣り合った骨軟骨フラグメントを開発することであった。研究責任者は米国で幹細胞研究に関して研鑽を積んできたが、当施設に帰局後は、当施設における骨髄幹細胞の扱いに関する経験が無かったため、そのための骨髄幹細胞の培養・分化のシステムを当施設で開発・定着させることをまず目的とした。そして大量採取の段階で、実際の生体移植に備え炎症環境下での骨髄幹細胞の分化誘導の検証をすることを目的とし、最終的には骨軟骨フラグメントを作成することを目的とした。

3. 研究の方法

当施設では、変形性関節症や関節リウマチ患者の関節破壊に対して年間約 200 例の人工関節手術を施行している。そこで、東京女子医科大学倫理委員会の承認を得て、手術を受けられる患者から、本研究に対する承諾書を得た上で、手術の際に排出される骨髄液を採取し、幹細胞を単離した。

単離した骨髄幹細胞は増殖培養を繰り返し、規定の細胞数に達した時点で、その単離した幹細胞の分化能を示すかどうかを確認する意味で、骨・軟骨・脂肪に分化誘導した。また当施設の性格上、関節リウマチ患者が手術患者の大半を占めるため、幹細胞の採取不足を補う意味で、関節リウマチ患者からも骨髄幹細胞を採取し、分化誘導が通常の細胞と同様に行われるかを実験検証した。また変形性関節症などの炎症環境、特にサイトカインの存在下において、骨髄幹細胞が通常の分化・誘導をするかを検証した。

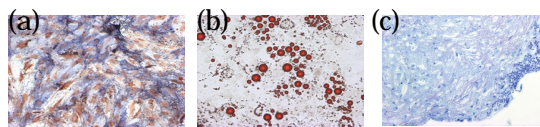
4. 研究成果

研究開始当初は変形性膝関節症患者、関節リウマチによる膝関節変形患者の人工関節手術の際に、骨髄を採取し、幹細胞の単離を試みた。ところが、膝関節周囲の骨髄には幹細胞の含有率が極めて低く、単離増殖が困難な状況となった。一方、変形性股関節症や関節リウマチ患者の股関節～骨幹部の骨髄からは幹細胞の単離が容易で、定着も良好であったため、以後は股関節症例を中心に骨髄を採取することとなった。2 年間を通して採取した骨髄は 20 症例で、うち採取できても増殖培養が可能となった症例は 12 症例 (60%) だった。

(1) 骨髄幹細胞の多分化能の検証

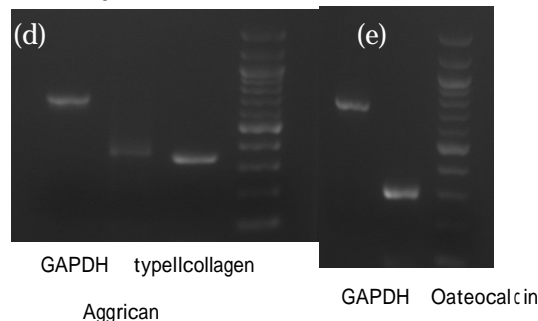
従来リウマチ患者の骨髄間細胞はサイトカインの影響のため分化誘導が抑制されている可能性が言われていたが、正式な報告はなかった。そこで当施設でもっとも採取が多かった関節リウマチ患者の増殖培養した細胞に対して、分化誘導を試みた。タンパクの産生を各組織染色で評価、また遺伝子レベルでのタンパク発現を RT-PCR で検証した。

骨・軟骨・脂肪細胞分化時の組織像



(a) 骨分化像 (ALP 染色) (b) 脂肪分化像 (Oil Red 染色) (c) 軟骨分化像 (Toluidine 染色)

RT PCR



(d) 軟骨分化させた骨髄幹細胞の RT-PCR の結果。Aggrecan と Type II collagen の発現を認めた。(e) 骨分化させた骨髄幹細胞。

Osteocalcin の発現を認めた。以上より、関節リウマチ患者の骨髄から採取した幹細胞でも多分化潜在性を維持していることが確認された。

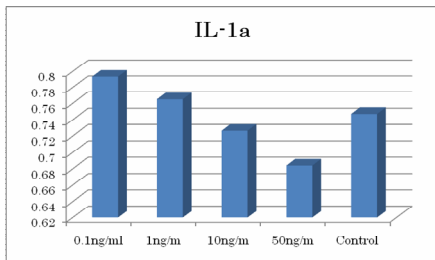
(2) 炎症性サイトカインの影響

次に、実際に変形性関節症や関節リウマチによる関節炎を呈した骨・軟骨組織に幹細胞が分化するかどうかと検証する必要がある

った、そこで、Invitroによる炎症環境下で骨髄幹細胞が本来の組織再生能を維持できるかどうかという考えから、炎症性サイトカインであるTNF、IL-1、IL-1、IL-6を添加し、特に骨分化を呈するかどうかを検証した。

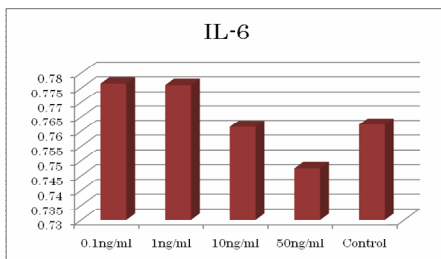
96well plateに骨髄幹細胞を培養させ、XTT 吸光度試験により細胞活動を吸光度計で測定した。細胞が定着後にIL-1、IL-6、TNF、IL-1各サイトカインを0.1、1、10、50ng/mlで添加し、3日間培養し、XTT試薬を添加し、吸光度を測定した。

a) IL-1 の影響



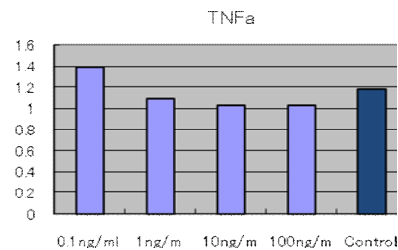
0.1ng/ml から濃度依存性で抑制が増強されたことが認められた。IL-1 10ng/ml以上の濃度で、コントロール群（サイトカイン非添加群）に比べ細胞活性が抑制されていることが観察された。

b) IL-6 の影響



コントロール群に比べ、IL-6が1ng/mlまでは抑制はほとんどなかったが、10ng/ml以上の濃度では、細胞活性が抑制されていることが観察された。またこの同濃度以上では濃度依存性で抑制が強いことも認められた。

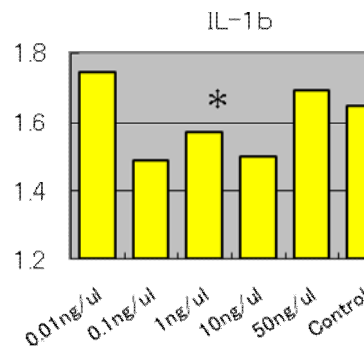
c) TNF の影響



TNF 1ng/ml以上の濃度で細胞活性が抑制されていることが認められた。実際の関節リウマチ患者では、血中濃度が10ng/ml前後で

ことが報告されていて、これを鑑みると、今回の条件は生体での骨髄幹細胞の状態と類似しているものと考えた。

D) IL-1



コントロール群と比較して、0.1ng/ml以上の濃度で細胞活性が抑制されていることが観察された。一方50ng/mlでは活性がコントロール群より大きくなっている。高濃度のIL-1bでは骨髄幹細胞の活性が強い可能性があり、分化誘導能が増強している可能性を示唆できた。

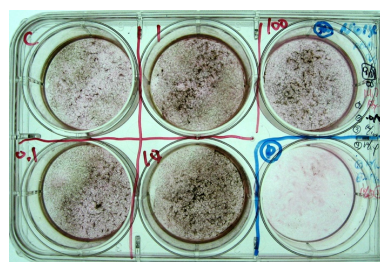
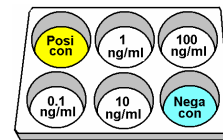
(3) IL-1、TNF の骨細胞分化の影響

次に、上結果を踏まえ、サイトカインによる骨細胞分化の影響を検証した。

a) IL-1bの影響

骨髄幹細胞を6~12 wells plateに巻き、Confluence後に骨分化培地とIL-1bを書く同度（右図）で添加し、骨分化能を評価した。

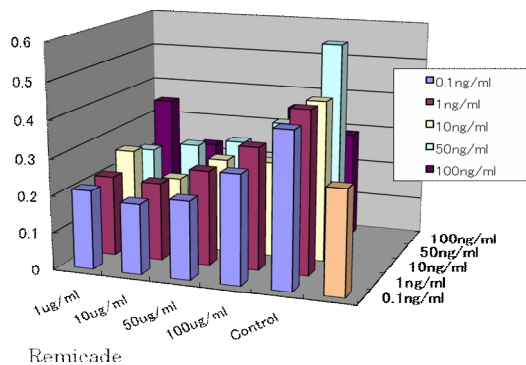
培養培養21日目、Von kossa染色によりMineralizationを検証した。



コントロールと比較し1ng/ml以上で、Mineralization（黒色）の増強を認めた。骨髄分化能に関しては特に骨分化に関しては増強する可能性があり、今後さらに追及する必要があると考えた。またウイルスを使用しないで、ex vivoで骨分化を増強できる可能性があり、今後さらなる検証を継続することを考えている。

b)TNF の影響（炎症環境下で生物学的製剤の検討）

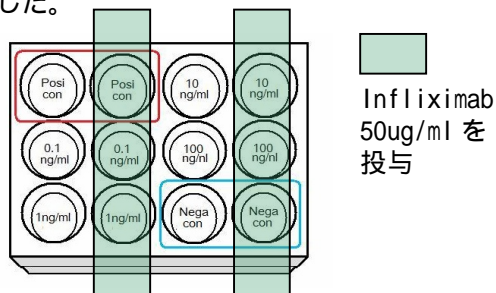
関節リウマチの治療法の一つに抗 TNF 製剤（生物学的製剤）が現在その効果により劇的な効果あげていることは周知の事実である。またその効果の一つに挙げられているのは、破壊された関節の特に関節周囲の骨糜爛を修復するという報告も散見されるようになった。そこで、骨再生の要因のひとつに幹細胞による組織再生が考えられ、現在我々のテーマである TNF 効果の検証に影響することもあり、今回 in vitro で TNF の影響とともに、生物学的製剤の影響を検証した。生物学的製剤は、実際の治療に使用し破棄すべき Infliximab の残薬を、施設長の許可を得た上で、実験に使用した。



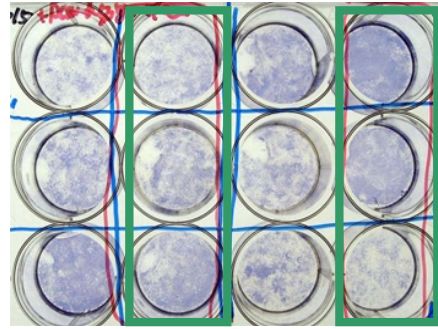
上記は、骨髄幹細胞を 96 well plate に巻き、細胞が定着した上で、TNF 0.1、1、10、50、100ng/ml の濃度と、Infliximab を実際の投与濃度に近い 1、10、50、100ug/ml で投与、3 日間培養の後に細胞活性を XTT 吸光度により測定した。

結果、infliximab の濃度依存的に細胞活性が強いことが観察された。最も細胞活性が高値だったのが、TNF 50ng/ml に対して Infliximab 100ug/ml を投与した群であった。遊離していた TNF との結合と、TNF レセプターへの関与が示唆されるが、今後のさらなる追及が必要である。

次に TNF を 0.1、1、10、100ng/ml の濃度に対して Infliximab 50ug/ml（生体内濃度に近似）で投与し、Infliximab の効果（TNF の効果減弱を検証した（下図）。検証は培養 1 週で ALP 染色により ALP 産生の程度を評価した。



結果



■ Infliximab 50ug/ml を投与

Infliximab 投与群で有意に ALP 染色が強く認められた。これにより、Infliximab が TNF の効果を減弱していることが考えられた。

TNF の骨髄幹細胞の骨芽細胞分化への影響は、10ng/ml を中心に抑制される傾向があり、関節リウマチ患者での血中濃度に近似していた。また Infliximab はその抑制効果を減弱する傾向を in vitro で示したと考えている。

以上よりサイトカイン存在下で骨髄幹細胞の分化誘導に関して能力維持をしていることが証明された。また IL-1 は一般的な関節炎の in vitro モデルとして汎用されてきたが、高濃度の添加で骨分化能が増強される傾向にあった。

現在 IPS 細胞による組織再生に注目されているが、ウイルスを使用した細胞を実際に生体に導入するには社会的なコンセンサスが得られにくいと考えられる。また上記細胞は特に一部にガン遺伝子が使用されている以上、癌化への懸念が否めないこともあり、ウイルスを使用しない万能細胞が待たれるところである。そのような意味で、骨髄幹細胞のサイトカインによる分化誘導法は今後も研究を進める価値はあると考えている。また高濃度のサイトカイン下では分化が強化される可能性もあり、他のサイトカインや炎症環境下での幹細胞を調査する必要もある。

今後は、ウイルスを使用しないで分化能、特に骨分化能が増強されることが証明されれば、骨折などの骨癒合の治療短縮などの応用が期待できると考えた。今後、この分化での証明をしていく予定である。

また今回使用を予定していたナノファイバーによるバイオリクターに関しては、そのナノファイバー技術は医療施設レベルでの作成は極めて困難であった。初発である米国の施設も同様で、いまだ市販化されることは無く、工学部とのコラボレートが必須であり、今後この分野を進めていくことへの障害となることである。

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)

[学会発表](計 0件)
ただし今年度日本整形外科学会基礎学術集
会に演題を提出している。

6. 研究組織

(1)研究代表者

川村 孝一郎 (KAWAMURA KOICHIRO)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：80408533

(2)研究分担者

桃原 茂樹 (MOMOHARA SHIGEKI)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：00190984

(3)連携研究者

なし