

令和 6 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10038

研究課題名(和文) シングルセル解析を用いた再生軟骨移植の組織成熟シグナルの解明

研究課題名(英文) Elucidation of tissue maturation signals in translation of tissue-engineered cartilage using single cell analysis

研究代表者

藤原 夕子 (Fujihara, Yuko)

東京大学・医学部附属病院・客員研究員

研究者番号：50466744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：現行の軟骨再生医療は、培養中に脱分化する軟骨細胞が、生体内に移植されると自然に成熟する過程を活用して行われているが、その分子メカニズムの詳細は未だ不明である。本研究では、再生軟骨移植後の組織成熟に伴い特性や局在を変化させていく軟骨細胞やマクロファージに焦点をあて、組織成熟のメカニズムを明らかにしていくことを目指している。

マウス耳介軟骨細胞をポリ乳酸足場素材へ播種して再生軟骨組織を作製し、マウスの背部皮下へ移植した。再生軟骨組織を経時的に摘出し、細胞を単離しポピュレーションを解析した。また、トルイジンブルー染色で組織学的に軟骨細胞の成熟過程を評価し、遺伝子発現との相関を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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、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。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困難である。また、再生医療において、移植した再生組織を長期的に維持していくためには、移植後の組織反応を制御していく必要もある。本研究は、移植された再生軟骨組織を構成する細胞を解析することにより、移植後の成熟過程や組織反応を解明するための一助となる研究である。

研究成果の概要(英文)：Current cartilage regenerative medicine utilizes the process in which chondrocytes dedifferentiate during culture but mature naturally when transplanted in a body. However, the details of this molecular mechanism are still unknown. In this study, we aim to clarify the mechanism of tissue maturation by focusing on chondrocytes and macrophages, which alter characteristics and localization during the maturation of tissue-engineered cartilage. Mouse tissue-engineered cartilage was prepared using auricular chondrocytes and polylactic acid scaffold, which was then subcutaneously transplanted into the back of a mouse. Regenerated cartilage tissue was excised over time, cells were isolated, and their populations were analyzed. In addition, the maturation of tissue-engineered cartilage was evaluated histologically using toluidine blue staining, and the correlation with gene expression was examined.

研究分野：再生医療

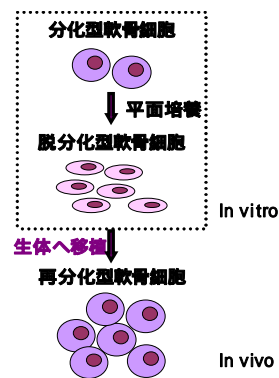
キーワード：軟骨再生医療 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

生活の質 (quality of life: QOL) という概念がますます重要視される現代社会では、医療においても、より低侵襲に最良の治療効果を発揮する治療法の開発が望まれる。骨軟骨疾患を対象とする口腔・顎顔面領域においても、先天異常、外傷や腫瘍切除後に生じる組織欠損を補う再建術として、従来法を凌駕する新たな技術開発が期待されており、再生医療の応用が注目されている。

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、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を開発し臨床導入を開始している (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困難である。移植後の成熟不全の懸念を払拭し安定した治療効果を維持するためには、生体内における軟骨細胞の成熟メカニズムを解明し、in vitroにおいて再生軟骨を成熟させる方法の確立が必要不可欠である。



2. 研究の目的

再生医療において安定した組織形成を長期的に実現するためには、移植後の組織反応を把握し制御していく必要がある。これまでの検討で、耳介軟骨細胞とポリ乳酸足場素材で構成される再生軟骨組織をマウスへ移植すると、再生軟骨の成熟が進行する移植後 1-2 週にかけて、マクロファージの局在が増加することが観察された [Fujihara et al. Biomaterials 2010]。マクロファージにはサブタイプが存在することが知られているが、再生軟骨移植では、移植後早期に炎症性マクロファージ (M1) が増加した後、軟骨基質の成熟が進行する移植後 1-2 週にかけて組織修復性マクロファージ (M2) が優位になることが観察された [Fujihara et al. Tissue Eng Part A 2020]。更に、培養軟骨細胞に M2 マクロファージの培養上清を添加すると、軟骨基質タンパクの型コラーゲンなどの発現が上昇することから [Fujihara et al. 投稿準備中]、再生軟骨の成熟過程は、マクロファージと軟骨細胞の相互作用により進行していくことが推察される。一方で、移植された再生組織内での軟骨細胞の成熟過程や、相互作用するマクロファージには多様性があり、組織成熟の本質を解明していくためには細胞集団としての解析では不十分であることも課題となった。

近年の急速な分析技術革新により、組織全体の平均値としてではなく、1細胞ごとの動的変化として組織内の細胞を解析し、生命現象を紐解くことが可能となってきている。本研究ではシングルセル解析を導入し、再生軟骨組織を構成する細胞の多様性や経時的変化を可視化することにより、組織成熟の分子メカニズムを明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 再生軟骨組織の細胞単離条件の検討と細胞特性評価

C57BL/J マウス耳介組織から軟骨細胞を単離し培養増殖させた後、ポリ乳酸足場素材 (5x5x3 mm) へ播種して再生軟骨組織を作製し、EGFP-C57BL/J マウス (グリーンマウス) の背部皮下へ移植した。移植後再生軟骨組織を摘出し、半割した組織をハサミで細切し、HBSS やコラーゲナーゼ処理にて細胞を単離し有利な条件を検討した。単離した細胞をフローサイトメトリーにて評価し、マクロファージの特性を解析した。半割した再生軟骨組織の残りについては、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した。

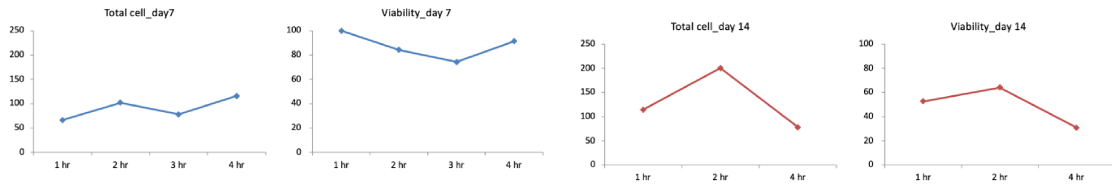
(2) Clodronate liposome を用いた再生組織移植におけるマクロファージの特性評価

Clodronate liposome を腹腔内投与すると、マクロファージを抑制することが可能となる。マクロファージの特性の違いによる再生軟骨組織の成熟への影響を評価するため、マウス再生軟骨移植を行い、移植後に clodronate liposome を 200μL 腹腔内投与した。前項に準じてマクロファージの特性評価、再生軟骨組織の組織学的評価を行なった。

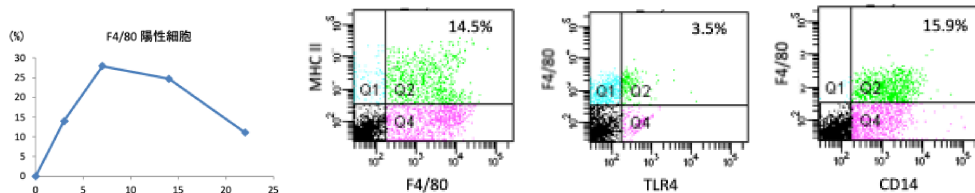
4. 研究成果

(1) 再生軟骨組織の細胞の単離条件の検討と細胞の特性評価

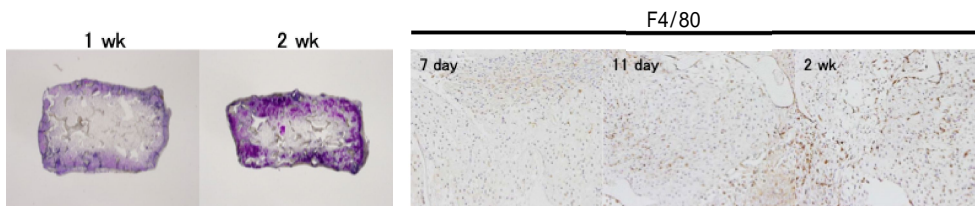
C57BL/J マウス耳介組織から軟骨細胞を単離し培養増殖させた後、ポリ乳酸足場素材 (5x5x3 mm) へ播種して再生軟骨組織を作製し背部皮下へ移植した。移植後 7, 10, 14, 21 日で再生軟骨組織を摘出し、半割した組織をハサミで細切り、0.3% コラゲナーゼ処理にて細胞を単離し総細胞数と生存率を計測した。移植後 14 日の再生軟骨組織から細胞を単離する場合、生存率は低下傾向を示した。生存率を維持でき、かつ必要十分量の細胞数を確保するため、コラゲナーゼ処理時間は 1 時間半で行うこととした。



再生軟骨組織から得られた細胞を、フローサイトメトリーで解析した。F4/80 陽性は移植後 1 週間で増加し、2 週にかけて減少した。F4/80 に加え、MHC II, TLR4, CD14 の抗体を使用し、再生軟骨組織内のマクロファージの特性を評価した。移植後 10 日で、F4/80 陽性 MHCII 陽性細胞は 14.5%、F4/80 陽性 TLR 陽性細胞は 3.5% であり、一般に M1 マクロファージの指標とされるマーカーで評価しても陽性率は異なり、特性の異なる細胞が混在していることが示唆された。一方で M2 マクロファージの指標として F4/80 陽性 CD14 陽性細胞で解析したところ 15.9% であった。

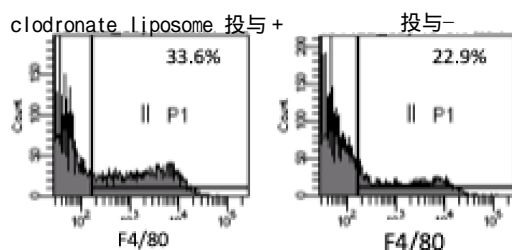


半割し組織用に保存していた検体を用いて、組織学的評価を行なった。トルイジンブルー染色では移植後 1-2 週にかけてメタマゾー領域が増大し、基質産生が増加し組織成熟が進行している時期であることが確認された。抗 F4/80 抗体を用いた免疫組織科学染色では、移植後 1-2 週にかけて陽性細胞の局在が増加していることが観察された。

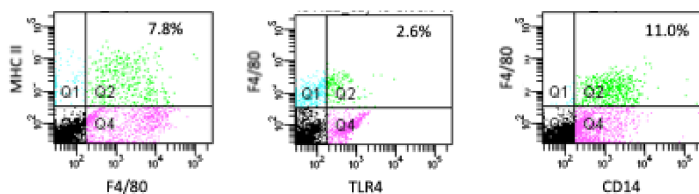


(2) Clodronate liposome を用いた再生組織移植におけるマクロファージの特性評価

C57BL/J マウス耳介組織から軟骨細胞を単離し培養増殖させた後、ポリ乳酸足場素材 (5x5x3 mm) へ播種して再生軟骨組織を作製し背部皮下へ移植した。移植後に clodronate liposome を 200ul 腹腔内投与した。上記と同様に細胞を単離しフローサイトメトリーで評価したところ、移植後 10 日目で再生軟骨組織内の F4/80 陽性細胞は 30% 程度減弱していることが観察された。



移植後 10 日で、F4/80 陽性 MHCII 陽性細胞は 7.8%、F4/80 陽性 TLR4 陽性細胞は 2.6%であった。M2 マクロファージの指標として F4/80 陽性 CD14 陽性細胞で解析したところ 11.0%であった。陽性率はそれぞれの分画で減少したが、減少率は分画により差があることが示された。F4/80 陽性 MHCII 陽性および F4/80 陽性 CD14 陽性の分画を遺伝子解析の対象とした。



マウス再生軟骨移植において、F4/80 陽性細胞は移植後 1 週間から 2 週間にかけて増加し、同時期に組織学的検討で軟骨基質の増加が認められた。一般に M1、M2 マクロファージの指標とされるマーカーで評価しても陽性率は異なり、特性の異なる細胞が混在していることが示唆された。Clodronate liposome によりマクロファージを抑制すると、マクロファージ全体として局在は減少したが、減少率は分画により差があることが示された。組織学的解析では Clodronate liposome の投与により基質産生は増加傾向を示すため、差のあった分画が基質産生の増加に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

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

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Kanda Kengo, Asawa Yukiyo, Inaki Ryoko, Fujihara Yuko, Hoshi Kazuto, Hikita Atsuhiko | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Requirement of direct contact between chondrocytes and macrophages for the maturation of regenerative cartilage | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 22476 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-01437-6 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 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 藤原夕子, 小島哲也, 疋田温彦, 星和人 |
| 2. 発表標題 再生軟骨移植におけるエクソソームの役割 |
| 3. 学会等名 第78回日本口腔科学会学術集会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 米永 一理, 西澤 悟, 浅輪 幸世, 藤原 夕子, 古村 眞, 星 和人 |
| 2. 発表標題 自動細胞数計測装置のヒト耳介軟骨細胞における有用性の検討 |
| 3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 藤原夕子, 疋田温彦, 星和人 |
| 2. 発表標題 再生軟骨移植におけるダメージ関連分子パターン(DAMPs)の影響 |
| 3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会 |
| 4. 発表年 2022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 | 疋田 温彦 (Hikita Atsuhiko) (60443397) | 東京大学・医学部附属病院・特任教授 (12601) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|