

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 1日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791956

研究課題名（和文） 再生軟骨組織における免疫特権構築メカニズムの検証と再生軟骨医療への応用

研究課題名（英文） Investigation on the formation of immune privilege in tissue-engineered cartilage and its application on cartilage regenerative medicine

研究代表者

藤原 夕子 (FUJIHARA YUKO)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：50466744

研究成果の概要（和文）：

再生軟骨組織の移植後組織反応における免疫特権の関与を検証した。再生軟骨組織の軟骨領域では、移植後2週で FasL、TGF- β などの免疫特権関連因子の局在が観察された。FasL 機能不全マウス (gld) 由来再生軟骨では、野生型マウス再生軟骨に比較し基質産生の低下を認めた一方、マクロファージの局在は高かった。更に、gld 軟骨細胞はマクロファージ様細胞 RAW264 に対する細胞傷害性が低かったことから、軟骨細胞に発現する FasL が再生軟骨移植における組織反応を抑制し、再生軟骨の成熟に貢献している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Involvement of immune privilege in the transplantation of tissue-engineered cartilage was examined in mice. FasL and TGF- β were expressed on chondrocytes of tissue-engineered cartilage constructs two weeks after transplantation. The constructs of FasL-hypomorphic mice (gld) showed more infiltration of F4/80-positive cells with less accumulation of proteoglycan than those of wild-type mice. When gld chondrocytes were cultured with macrophage-like cell, RAW264, they showed modest cytotoxicity and less induction of apoptosis on RAW264 than those of wild-type mice, suggesting that expression of FasL on chondrocytes could modulate the viability and localization of macrophages, promoting the maturation of tissue-engineered cartilage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：再生医療、再生軟骨、免疫特権

1. 研究開始当初の背景

口腔・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方法が既に臨床応用されている (Yanaga et al Plast Reconstr Surg 2006)。しかし現行法は、患者から採取した軟骨細胞を、足場素材を用いず細胞懸濁液/ゲルの形状で移植する方法を採るため、適応が局所的な軟骨欠損に限られている。適応を多様な症例に拡大するためには、再生組織に3次元形態と力学的強度を付与する足場素材の併用が必要不可欠である。しかしその一方、足場素材は生体にとって異物であるため、移植後に過剰な組織反応を惹起し組織再生を著しく阻害する可能性もある。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いるが、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過度の組織反応により非常に困難となることが知られており、成功例の報告は殆どない。

申請者らはこれまで、足場素材を用いた再生軟骨移植法に関する検討を行ってきたが、足場素材における細胞保持性の改善と投与細胞数の最適化により、正常な免疫機能を有する C57BL/6 J マウスでの軟骨再生に成功した。この研究成果は足場素材を用いた再生軟骨医療の臨床応用に道を開くものではあるが、軟骨再生の改善が、単に軟骨細胞数の増加に伴う軟骨基質産生増加によるものなのか、それとも軟骨細胞の特性に起因する免疫環境の変化によるものなのか、そのメカニズムは依然として不明であった。そこで、一般的な足場素材であるポリ乳酸 (PLLA) 足場素材に C57BL/6 J マウス耳介軟骨細胞を投与して再生軟骨組織を作製し、免疫能が正常な EGFP 遺伝子導入マウスの背部皮下へ同系移植し、ドナー (再生軟骨組織) 由来とホスト (移植動物) 由来の細胞の局在を経時的に追跡した。この実験方法は、遺伝子背景が同じ動物同士の移植 (同系移植) であるため、自家移植と同等の移植系と考えられる。その結果、EGFP により識別される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、軟骨の成熟に比例しマクロファージが著しく減少すること、更にその局在に関しては経時的に非軟骨領域にのみ偏在するようになることが明らかとなった (藤原ほか、第 8 回日本再生医療学会 2009 年)

「免疫特権」とは、眼や脳などの生体の一部の組織に認められる特性で、侵入した抗原に対する免疫応答を積極的に抑制し、惹起される炎症を最小限に抑えるメカニズムである。再生軟骨組織における組織反応の抑制がどのように引き起こされているのかというこ

とに関しては現段階では不明であるが、生理的軟骨組織も免疫特権組織であることを鑑みると、再生軟骨組織が組織成熟の過程で免疫特権を構築し、積極的に異物組織反応を制御し、再生軟骨を生着・安定させている可能性も推察される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、足場素材を用いた再生軟骨における異物組織反応抑制 (免疫特権) の構築メカニズムを解明すると共に、得られた知見を再生軟骨移植の組織反応制御に反映させ、再生軟骨医療の発展に貢献することである。

3. 研究の方法

1) 生理的軟骨組織およびマウス軟骨再生モデルにおける免疫特権関連因子の発現・局在解析

マウスの耳介軟骨組織に関して、組織学的観察、免疫組織化学的観察により、免疫特権関連因子の発現や局在を検討した。検討する因子としては、これまで眼や脳などにおいて免疫特権への関与が報告されている MHC Class I/II 分子、transforming growth factor- β (TGF- β)、Fas ligand (FasL)、macrophage migration inhibitory factor (MIF)、ニューロペプチド (Vasoactive intestinal polypeptide (VIP)、Substance P とした。また、マウス軟骨再生モデルにおける免疫特権因子の発現・局在解析を行うため、純系マウス C57BL/6J の耳介軟骨から単離・培養した軟骨細胞 (1×10^8 cells/mL) を、ポリ乳酸 (PLLA) 多孔体へ播種して作製し、再生軟骨を作製した。作製した再生軟骨を、同じ遺伝子型を持つ同系マウスの背部皮下へ移植した。継時的に再生軟骨組織を摘出し、上記と同様に免疫特権関連因子の発現・局在変化を追跡した。

2) 培養軟骨細胞の再分化と免疫特権関連因子の発現との相関性解析

マウス耳介組織からコラゲナーゼ処理にて単離し、増殖培養させた脱分化軟骨細胞、ならびにその脱分化軟骨細胞を再分化誘導 (Liu et al. J Biol Chem 2007) した軟骨細胞を用いて、培養細胞の再分化と免疫特権関連因子の発現との相関性を real time RT-PCR で検討した。

3) 軟骨細胞とマクロファージの共培養系における軟骨細胞の免疫制御の検証

マウスマクロファージ RAW264 とマウス耳介軟骨細胞との共培養系において、共培養において、マウス耳介細胞が有する細胞傷害作用を cytotoxic assay (CytoTox 96[®] Non-Radioactive Cytotoxicity Assay) で検討した。

4) 免疫特権関連因子のノックアウトマウスを用いた再生軟骨移植における機能検討
FasL の機能障害を有するマウス

C57BL6/J-gld/gld マウス (gld) の耳介軟骨細胞を単離した後、第 1 項の方法を用いて再生軟骨組織を作製し移植した。経時的に再生軟骨組織を採取し、組織学的観察および GAG 定量により軟骨成熟を検討した。更に、RAW264 との共培養時の培養上清をプロテオーム解析し、選定した因子のリコンビナントタンパクを軟骨細胞の 3 次元培養に添加し、軟骨細胞に FasL 発現を誘導する因子を同定した。

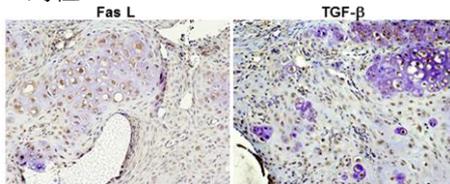
5) 免疫特権の再生軟骨医療への応用の検討
上記で同定した因子を、再生軟骨組織の移植前培養に添加した。移植後 2 週で再生軟骨組織を摘出し、組織学的評価を行った。

4. 研究成果

1) 生理的軟骨組織およびマウス軟骨再生モデルにおける免疫特権関連因子の発現・局在解析

耳介軟骨組織の軟骨細胞において、Fas ligand (FasL) や Transforming growth factor- β (TGF- β) の局在が認められた。一方、マウス耳介軟骨細胞をポリ乳酸 (PLLA) 多孔体へ播種し、背部皮下へ同系移植した再生軟骨組織では、移植後 2 週で FasL、TGF- β 、Substance P などの著明な局在が観察された。(図 1)

図 1 再生軟骨組織における FasL, TGF- β の局在



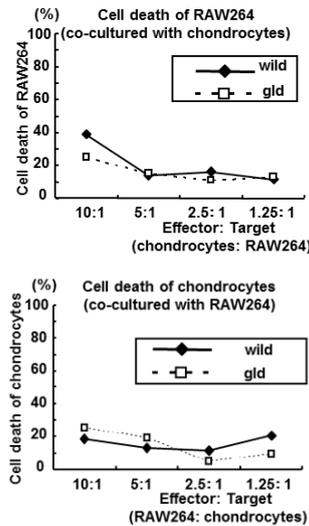
2) 培養軟骨細胞の再分化と免疫特権関連因子の発現との相関性解析

培養軟骨細胞の再分化と免疫特権関連因子の発現との相関性を real-time PCR を用いて検討したところ、FasL と軟骨分化マーカー II 型コラーゲンの発現は相関せず、むしろ逆相関する傾向を示した。

3) 軟骨細胞とマクロファージの共培養系における軟骨細胞の免疫制御の検証

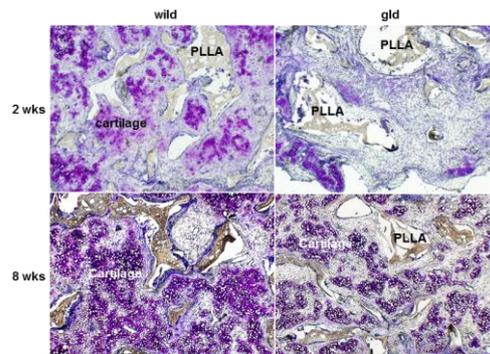
Cytotoxic assay において、軟骨細胞は RAW264 に細胞死を誘導した一方、RAW264 は軟骨細胞に細胞傷害作用を示さないことが明らかとなった。更に、FasL 機能不全を有する gld マウスから採取した軟骨細胞で同様に検討したところ、野生型マウス由来軟骨細胞と比較し RAW264 に対する細胞死誘導能が低下することが示された。(図 2)

図 2 RAW264 および軟骨細胞に誘導される細胞死



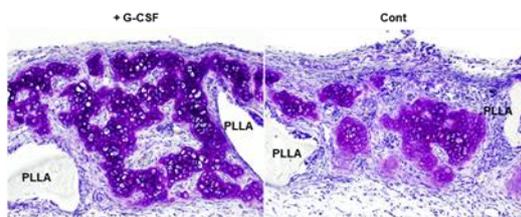
4) 免疫特権関連因子のノックアウトマウスを用いた再生軟骨移植における機能検討
gld 再生軟骨では、トルイジンブルー染色や GAG 定量で、野生型再生軟骨 (wild) に比較し基質産生の低下を認めた (図 3)。F4/80 陽性細胞は gld 再生軟骨で密にみられ、軟骨細胞の FasL によるマクロファージの局在制御が推察された。また、再生軟骨組織のヒト耳介軟骨細胞において、成熟刺激で基質産生を誘導したところ FasL 遺伝子の発現に変化はなく、むしろマクロファージ様細胞 RAW264 との共培養により発現が上昇した。共培養時の培養上清をプロテオームアレイにより解析し、RAW264 単独群と比較したところ G-CSF が高値を示した。G-CSF を軟骨細胞の基質産生誘導時に添加すると、FasL の発現が上昇することが確認された。

図 3 マウス再生軟骨組織のトルイジンブルー染色



5) 免疫特権の再生軟骨医療への応用の検討
再生軟骨組織の移植前培養にG-CSFを添加したところ FasL 発現が誘導され、無添加の群と比較し移植後のマクロファージの減少と基質の蓄積が観察された。(図4)

図4 移植前培養にG-CSFを利用した再生軟骨移植



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計8件)

1. Ko EC, Fujihara Y, Ogasawara T, Asawa Y, Nishizawa S, Nagata S, Takato T, Hoshi K. BMP-2 Embedded Atelocollagen Scaffold for Tissue-Engineered Cartilage Cultured in the Medium Containing Insulin and Triiodothyronine-A New Protocol for Three-Dimensional In Vitro Culture of Human Chondrocytes. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012 May;18(5):374-86. (査読有)
doi:10.1089/ten.tec.2011.0217.
2. Tanaka Y, Saijo Y, Fujihara Y, Yamaoka H, Nishizawa S, Nagata S, Ogasawara T, Asawa Y, Takato T, Hoshi K. Evaluation of the implant type tissue-engineered cartilage by scanning acoustic microscopy. *J Biosci Bioeng*. 2012 Feb;113(2):252-7. (査読有)
doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.10.011.
3. Kanazawa S, Fujihara Y, Sakamoto T, Asawa Y, Komura M, Nagata S, Takato T, Hoshi K. Tissue responses against tissue-engineered cartilage consisting of chondrocytes encapsulated within non-absorbable hydrogel. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011 Sep 13. doi: 10.1002/term.458. (査読有)
doi: 10.1002/term.458.
4. Ko EC, Fujihara Y, Ogasawara T, Asawa Y, Nishizawa S, Nagata S, Takato T, Hoshi K. Administration of the insulin into the scaffold atelocollagen for tissue-engineered cartilage. *J Biomed Mater Res A*. 2011 May;97(2):186-92. (査読有)
doi:10.1002/jbm.a.33046.
5. Yonenaga K, Nishizawa S, Akizawa M, Asawa Y, Fujihara Y, Takato T, Hoshi K. Utility of NucleoCounter for the chondrocyte count in the collagenase digest of human native cartilage. *Cytotechnology*. 2010 Dec;62(6):539-45. (査読有)
doi: 10.1007/s10616-010-9304-y.
6. Yonenaga K, Nishizawa S, Fujihara Y, Asawa Y, Sanshiro K, Nagata S, Takato T, Hoshi K. The optimal conditions of chondrocyte isolation and its seeding in the preparation for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010 Dec;16(6):1461-9. (査読有)
doi:10.1089/ten.tec.2009.0597.
7. Tanaka Y, Yamaoka H, Nishizawa S, Nagata S, Ogasawara T, Asawa Y, Fujihara Y, Takato T, Hoshi K. The optimization of porous polymeric scaffolds for chondrocyte/atelocollagen based tissue-engineered cartilage. *Biomaterials*. 2010 Jun;31(16):4506-16. (査読有)
doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.02.028
8. Iwata K, Asawa Y, Fujihara Y, Tanaka Y, Nishizawa S, Nakagawa T, Nagata S, Takato T, Hoshi K. The effects of rapid- or intermediate-acting insulin on the proliferation and differentiation of cultured chondrocytes. *Curr Aging Sci*. 2010 Feb;3(1):26-33. (査読有)
doi: 10.2174/1874609811003010026

[学会発表] (計5件)

1. Fujihara Y et al. Chondrocytes in tissue-engineered cartilage using scaffolds could suppress tissue reactions through formation of immune privilege. 10th World Congress on Inflammation. 2011/6/25-29 Paris France
2. 藤原 夕子 ほか 耳介軟骨細胞における Fas ligand の発現メカニズムの検討と再生軟骨移植への応用 第10回再生医療学会総会 2011/3/2 東京
3. 藤原 夕子 ほか 再生軟骨組織における免疫特権因子の発現と機能 第七回医工連携研究会 2011/2/2 東京
4. Fujihara Y et al. Chondrocytes could suppress the viability of macrophages, modulating tissue reactions in tissue-engineered cartilage. Regulatory Myeloid Cells 2010/10/21-24 Virginia USA
5. Fujihara Y et al. Fas ligand on chondrocytes could worsen viability of macrophages, modulating tissue reactions in tissue-engineered cartilage. 14th International Congress of Immunology

2010/8/22-27 Japan (Kobe)

[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・特任助教

研究者番号：50466744

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし