

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462347

研究課題名(和文) PTH間欠投与が関節軟骨修復過程における間葉系幹細胞の動員と軟骨分化に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effect of parathyroid hormone on chondrogenic differentiation from mesenchymal stem cells

研究代表者

熊谷 研 (KUMAGAI, Ken)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：10468176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞(MSC)を用いてPTH投与による軟骨分化への影響を調査した。PTHの投与量を変えて軟骨分化に対する作用を解析した結果、MSCの軟骨分化誘導は低～中等度用量のPTHにより促進される一方、高用量のPTHでは軟骨分化は抑制された。PTHを連続投与した場合と間欠投与した場合とでMSCの軟骨分化に対する効果を比較した結果、連続投与した場合に比べ間欠投与した場合の方が軟骨分化は促進されることが示された。以上の結果より、PTHがMSCからの軟骨分化誘導を促進することが示され、関節軟骨の再生医療や変形性関節症に対する新しい治療戦略になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The present study demonstrated that chondrogenic differentiation of Mesenchymal stem cells (MSCs) was modulated by parathyroid hormone (PTH). The results revealed that PTH has opposite effects on chondrogenesis when administered at different concentrations. Namely, low to moderate concentrations of PTH promoted chondrogenic differentiation of MSCs, whereas chondrogenesis of MSCs was inhibited and not stimulated by a higher concentration of PTH. Based on clinical experience with the efficacy and safety of PTH for bone metabolism, PTH may also be useful clinically for cartilage repair.

研究分野：医歯薬学

キーワード：軟骨分化 PTH 間葉系幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

関節軟骨には血管が存在せず、周囲を基質に囲まれた軟骨細胞はほとんど分裂増殖しないため、その再生能力は非常に乏しいとされている。整形外科疾患において関節軟骨の再生は困難であるが、需要の高い重要な課題である。

一般に関節軟骨欠損を修復する治療法として、臨床では自家骨軟骨移植や同種骨軟骨移植が行われてきた。前者においては採取部位に生じる欠損や採取量の限界などの問題があり、後者では免疫、感染などの問題がある。この問題を解決すべく、自己の体性幹細胞やiPS細胞を用いた組織再生の研究が行われている。生体自身が有する自己修復能を増強することで修復を試みる方法として成長因子、ホルモン等の投与、あるいはそれらを遺伝子導入した細胞の移植により組織を再生させる研究が行われており、軟骨再生を促進する手段として期待されている。一方では手技の煩雑さ、コスト、安全性の問題やCPC等の施設設置の問題を克服する必要があり、実際の臨床の場では未だ普及していないのが現状である。

新しい治療法には常に安全性の確保が要求されるが、最近、骨粗鬆症治療薬としてPTH製剤が本邦で承認され、実際の臨床で使用可能となった。PTHは間欠投与により骨形成作用を示し、臨床においてその有用性が報告されている。動物の骨折モデルに対しても、PTHの間欠投与は骨折治癒の全過程にわたって作用し骨折治癒を促進することが報告されており、特に仮骨の軟骨形成を促進することは注目すべき点である。また最近の話題として、動物モデルにおけるPTHの間欠投与が骨軟骨欠損修復を促進したと報告されている。したがって、PTHの間欠投与が軟骨修復機転に及ぼす影響について、修復に関与する細胞の由来とその動員・分化の観点から調査することは非常に興味深い研究課題であると考えられた。

## 2. 研究の目的

PTH/PTHrP受容体は軟骨細胞に存在し、PTHは軟骨細胞に対して生理的な作用を有することが知られている。しかしながら、PTHがMSCの軟骨分化にどのような影響を及ぼすか、不明な点も残されている。本研究では、PTHと軟骨分化に関する先行研究の成果をふまえ、(1)PTHが間葉系幹細胞(MSC)からの軟骨分化を促進するという仮説のもとに研究を行う。また、(2)PTHの投与方法の違い(間欠または連続投与)が軟骨分化に及ぼす影響について調査を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 軟骨細胞の分化誘導とPTH投与

マウス骨髄由来MSCを継代し、ペレット培養にて軟骨分化誘導を行った。培地は軟骨分化誘導培地にPTHをそれぞれの濃度

(0.1,1,10,100nM)で添加したものをを用いた。PTHを添加しないもの(PTH0)を対照とした。培地を2日ごとに交換し、21日間培養を行った。

### (2) PTH投与方法の違いと軟骨分化誘導

軟骨分化誘導培地にPTHを100nMの濃度で培地に加え準備し、48時間を1サイクルとして連続投与または間欠投与を行った。

間欠投与群は、最初の6時間にPTHを含む培地にて培養し、次の42時間にPTHを含まない培地に交換し、インキュベートを行った。2日目以後、同じサイクルで培地交換を行った。

連続投与群は最初の6時間、次の42時間ともにPTHを含む培地にて培養し、2日ごとに培地交換を行った。

対照群は最初の6時間、次の42時間ともに軟骨分化誘導条件のみでPTHを含まない培地にて培養し、2日ごとに培地交換を行った。

各群とも21日目まで培養を行った。

### (3) 軟骨分化に対する評価

上記の実験に対し、以下の評価を行った。

組織学的評価：パラフィン切片を作製し、アルシアンブルー染色、II型コラーゲン免疫染色を行った。

mRNA発現の定量：リアルタイムRT-PCRにてCollagen type II  $\alpha 1$  (Col2a1), Collagen type X  $\alpha 1$  (Col10a1), Collagen type I  $\alpha 1$  (Col1a1), Sox9, Smad3, type 1 PTH/PTHrP receptor (PTH1R)のmRNA発現量を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 軟骨分化に対する組織学的評価

MSCの軟骨分化を組織学的に確認するため、ペレットにて3週間培養した後、アルシアンブルー染色を行った(図1上段)。アルシアンブルーにより軟骨細胞外基質のプロテオグリカンが青く染色されるが、PTHを含まない培地にて軟骨分化誘導した対照にて染色が確認された。PTHを添加した場合、0.1nMでは対照とほぼ同程度に染色されたが、1nMと10nMでは対照と比較して強い染色性が確認された。一方、PTH100nMでは対照とほぼ同程度かそれより弱く染色された。形態学的には、大きな円形の核を有する軟骨様の細胞は、他と比較してPTH10nMにおいて優位に観察された。

さらに軟骨分化の程度を確認するため、軟骨基質の主要成分であるII型コラーゲンの免疫染色を行った(図1下段)。PTHを含まない対照において発現を確認した。PTHを添加した場合、0.1nM、1nM、10nMと用量の増加に伴って発現が強くなる傾向が観察された。しかしながらPTH100nMでは染色性は弱くなり、この傾向はアルシアンブルーにおけるものと同様であった。これらの結果

より、MSC の軟骨分化誘導は低～中等度用量の PTH により促進される一方、高用量の PTH では逆に抑制されることが示された。

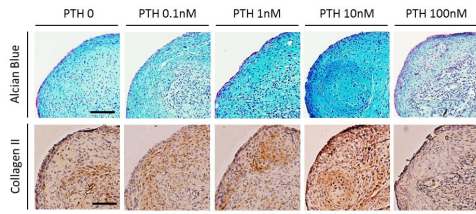


図1 MSC からの軟骨分化誘導 3 週後の組織におけるアルシアンブルー染色像(上段)および II 型コラーゲン免疫染色像(下段)

(2)PTH が軟骨分化に関するマーカーの発現に及ぼす影響

PTH が MSC の軟骨分化早期に及ぼす影響を評価するため、培養 3 日目および 7 日目の I 型、II 型、X 型コラーゲンの mRNA 発現量を測定した。

軟骨分化マーカーである II 型コラーゲン(Col2a1)の発現は対照と比較して PTH1nM と 10nM において有意に増加した。一方、PTH100nM では対照と比較して有意に発現が減少した。(図 2A)

軟骨肥大化のマーカーである X 型コラーゲン(Col10a1)の発現は PTH いずれの用量においても対照との差は確認されなかった。(図 2B)

さらに軟骨肥大化および骨分化マーカーの一つである I 型コラーゲン(Col1a1)の発現を測定した結果、PTH いずれの用量においても有意な変化はみられなかった。(図 2C)

これらの結果より、MSC からの早期軟骨分化は低～中等度用量の PTH により促進され、高用量の PTH で抑制されることが示された。

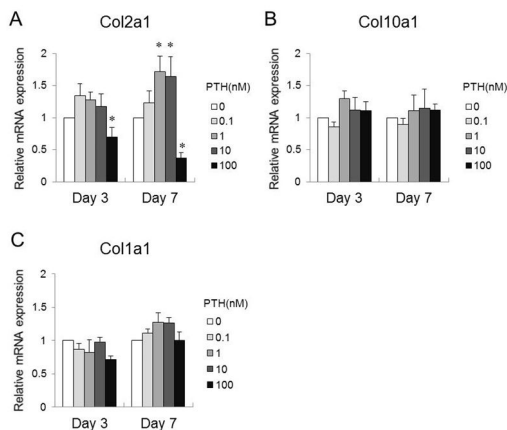


図2 MSC からの軟骨分化における PTH 投与がコラーゲンの mRNA 発現に及ぼす影響

A: Col2a1 B: Col10a1 C: Col1a1 N=8, \*P <0.05

(3)軟骨分化関連因子および PTH 受容体に及ぼす影響

軟骨分化に必須とされる TGF-β シグナル

に關与する転写因子 Sox9 とその関連シグナル分子 Smad3 の mRNA 発現量を測定した。また、PTH 受容体(PTH1R)の mRNA 発現量についても評価した。

Sox9 の発現は培養 7 日目において対照と比較して PTH0.1nM、1nM、10nM において有意に増加した。一方、培養 3 日目の PTH100nM では Sox9 の発現は有意に減少した。Sox9 の発現量と PTH 用量との関係は II 型コラーゲンのそれと同様の傾向を示した。(図 3A)

Smad3 の発現は、培養 3 日目の PTH100nM で減少したが、培養 7 日目では PTH いずれの用量においても有意な差はみられなかった。(図 3B)

PTH1R の発現は培養 7 日目において対照と比較し PTH1nM、10nM において有意に増加した。一方、PTH100nM では PTH1R の発現は有意に減少した。この傾向は Sox9 および II 型コラーゲン発現量と PTH 用量の関係と同様の傾向を示した。(図 3C)

したがって PTH による MSC の軟骨分化に対する作用は PTH 受容体の発現に依存することが推察された。また、MSC からの早期軟骨分化において PTH の作用は Smad3 発現とは独立したものであることも推察された。

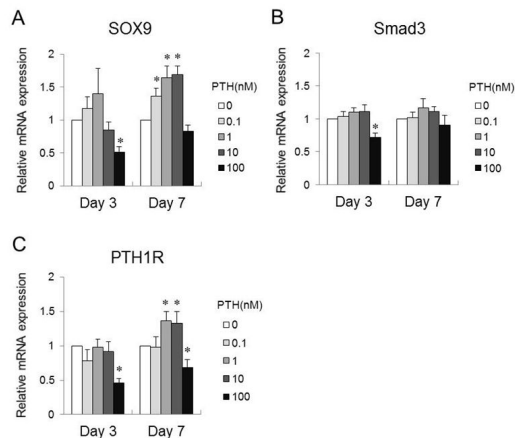


図3 MSC からの軟骨分化誘導に対する PTH 投与が軟骨分化関連因子および PTH 受容体の mRNA 発現に及ぼす影響

A: Sox9 B: Smad3 C: PTH1R N=8, \*P <0.05

(4)PTH 投与方法の違いが軟骨分化に及ぼす影響

PTH 投与方法の違いが軟骨分化に及ぼす影響について評価するため、PTH の間欠的投与と持続的投与の条件で軟骨分化関連マーカーの mRNA 発現量を比較した。

Col2a1 の発現は PTH 間欠投与において有意に増加し、連続投与では有意な差はみられなかった。(図 4A)

Col10a1 の発現は PTH 連続投与で対照と差はなく、間欠投与で増加したものの、有意な変化ではなかった。(図 4B)

Col1a1 の発現はいずれの条件においても

有意な差はみられなかった。(図4C)

Sox9の発現はPTH連続投与で変化はなく、間欠投与で有意に増加した。(図4D)

PTH1Rの発現はPTH間欠投与において有意に増加し、連続投与では有意な差はみられなかった。(図4E)

以上の結果より、PTHを間欠投与する方法により、連続投与と比較して軟骨分化を促進することが示された。また、PTH間欠投与による軟骨分化促進効果はPTH受容体の発現増加を伴うことが確認された。

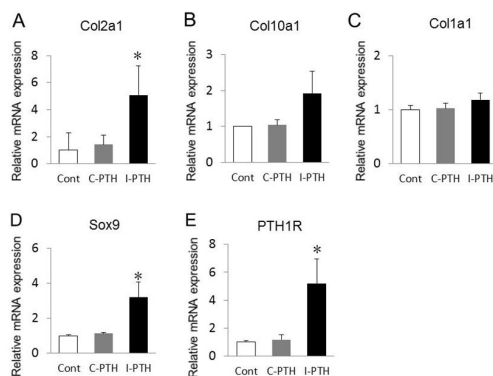


図4 PTH投与方法の違いがMSCからの軟骨分化に及ぼす影響

A: Col2a1 B: Col10a1 C: Col1a1 D: Sox9 E: PTH1R  
Cont: 対照 C-PTH: PTH連続投与 I-PTH: PTH間欠投与

N=8, \*P < 0.05

#### (5)まとめ

MSCの軟骨分化誘導は10nMまでの低～中等用量のPTHにより促進された。一方、100nMの高用量のPTHでは軟骨分化は抑制された。このPTHによるMSCの軟骨分化に対する作用はPTH受容体の発現と関連した。PTHの軟骨分化に対する作用は転写因子Sox9の発現を介するものであるが、Smad3発現とは独立したものであることも推察された。また、PTH投与方法の違いが軟骨分化に影響を及ぼし、間欠投与により軟骨分化が促進されることが示された。PTH間欠投与による軟骨分化促進効果はPTH受容体の発現増加を伴うことが確認された。

#### 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7件)

1. Kumagai K, Akamatsu Y, Kobayashi H, Kusayama Y, Koshino T, Saito T. Factors affecting cartilage repair after medial opening-wedge high tibial osteotomy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2016 Mar 31. [Epub ahead of print] (査読有り)
2. Kobayashi H, Akamatsu Y, Kumagai K, Kusayama Y, Aratake M, Saito T. Is the

surgical epicondylar axis the center of rotation in the osteoarthritic knee? *J Arthroplasty.* 2015; 30(3):479-83. (査読有り)

3. Koshino T, Sato K, Umamoto Y, Akamatsu Y, Kumagai K, Saito T. Clinical results of unicompartamental arthroplasty for knee osteoarthritis using a tibial component with screw fixation. *Int Orthop.* 2015; 39(6):1085-91. (査読有り)
4. 齋藤知行, 熊谷研: 強固な内固定材と人工骨を併用した opening wedge 法による高位脛骨骨切り術の術後 5～10 年成績. *臨床雑誌整形外科*, 66(7): 685-688, 2015.(査読無し)
5. 熊谷研, 齋藤知行: いま学ぶ 高位脛骨骨切り術 術前・術後看護とリハビリテーション. *整形外科看護*, 20(2): 196-203, 2015. (査読無し)
6. Zhang Y, Kumagai K, Saito T. Effect of parathyroid hormone on early chondrogenic differentiation from mesenchymal stem cells. *J Orthop Surg Res.* 2014; 9:68. doi: 10.1186/s13018-014-0068-5. (査読有り)
7. Saito T, Kumagai K, Akamatsu Y, Kobayashi H, Kusayama Y. Five- to ten-year outcome following medial opening-wedge high tibial osteotomy with rigid plate fixation in combination with an artificial bone substitute. *Bone Joint J.* 2014; 96-B(3):339-44. doi: 10.1302/0301-620X.96B3.32525. (査読有り)

[学会発表](計5件)

1. Ken Kumagai, Yasushi Akamatsu, Hideo Kobayashi, Yoshihiro Kusayama, Tomihisa Koshino, Tomoyuki Saito. Joint-preserving surgery for spontaneous osteonecrosis of the knee. The 89th Annual Meeting of the Japanese Orthopaedic Association, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2016, May 12.
2. 熊谷研, 赤松泰, 小林秀郎, 草山喜洋, 腰野富久, 齋藤知行. 特発性膝骨壊死に対する関節温存手術. 第7回 JOSKAS, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市), 2015年6月18-20日
3. 熊谷研, 赤松泰, 小林秀郎, 草山喜洋, 三橋祥太, 小林明裕, 腰野富久, 齋藤知行. Opening wedge 法による高位脛骨骨切り術後の関節軟骨修復の評価. 第88回日本整形外科学会学術総会, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市), 2015年5月21-24日
4. Ken Kumagai, Yun Zhang, Tomoyuki Saito. Effect of parathyroid hormone on early chondrogenic differentiation from mesenchymal stem cells. Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, Las Vegas, NV, March 28-31, 2015
5. 熊谷研, 赤松泰, 小林秀郎, 草山喜洋, 齋藤知行: 副甲状腺ホルモンがマウス大腿骨骨切りモデルの骨形成と末梢血由来骨

前駆細胞のホーミングに与える影響. 第  
29 回日本整形外科学会基礎学術集会, 城  
山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市), 2014  
年 10 月 9-10 日

〔図書〕(計 3 件)

1. 熊谷研, 齋藤知行: 3 章 思春期 Q7 若年  
期に膝関節痛が発生するのはなぜですか.  
「骨」を知る 53 の質問. 医薬ジャーナル  
社, 76-78, 2015
2. 齋藤知行, 熊谷研: 変形性膝関節症にお  
ける保存的治療の限界・手術的治療の適応.  
変形性膝関節症の運動療法ガイド. 日本  
医事新報社, 164-168, 2014
3. 齋藤知行, 熊谷研: 高位脛骨骨切り術  
(opening wedge 法). 変形性膝関節症  
の運動療法ガイド. 日本医事新報社,  
169-175, 2014

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

熊谷 研 (KUMAGAI, Ken)  
横浜市立大学・医学部・講師  
研究者番号: 10468176

##### (2)研究分担者

齋藤 知行 (SAITO, Tomoyuki)  
横浜市立大学・医学研究科・教授  
研究者番号: 30170517

##### (3)連携研究者

該当なし