

主論文の要旨

**Chondrogenic capacity and alterations in
hyaluronan synthesis of cultured
human osteoarthritic chondrocytes**

〔 培養ヒト変形性関節症軟骨細胞における軟骨形成能と
ヒアルロン酸合成変化 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
運動・形態外科学講座 整形外科学分野

(指導：西田 佳弘 准教授)

大野 洋平

【緒言】

関節軟骨は2型コラーゲン(COL2)及びアグリカン(ACAN)から構成される細胞外基質(ECM)により特有の粘弾性を持つ。ACANはグリコサミノグリカン(GAG)の一種のヒアルロン酸(HA)に結合して軟骨内に保持される。このECMの崩壊や損失が、変形性関節症(OA)の病態に関わる。そしてECM合成には、転写因子SOX9に制御される軟骨分化遺伝子群の発現が必須である。

HAはアイソフォームを3つ持つ合成酵素(HAS)により細胞膜で合成されるが、ヒト軟骨細胞のHAS活性制御、アイソフォーム(HAS1-3)使い分け、産生HA分子量の違い等は、HAの重要な役割にも拘らず未知であり、単層培養継代による影響も知られていない。

自家軟骨細胞移植(ACI)は若年者の局所軟骨欠損に対する術式で、限られた非荷重部軟骨由来細胞の増殖が原則となる。しかし増殖に必要な単層培養継代は、細胞形態や表現型を劇的に変え、その結果COL2は減少、代わりに1型コラーゲンが増加することが知られる。こうした「脱分化」細胞は、関節内へ移植後に軟骨細胞の特徴を取り戻す「再分化」が期待される。しかしこの期待はOA患者には適応されない。OA軟骨由来細胞が、健康な若年軟骨由来細胞のような再分化能を持たないとされる為だが、決め手となる根拠はない。

本研究の目的は、(1)単層培養がOA軟骨細胞の表現型に与える影響、(2)OA軟骨細胞の再分化能と培養増殖が及ぼす影響、(3)HAS アイソフォーム発現パターン及び産生HA分子量の変化、を調べることである。

【対象及び方法】

ヒトOA軟骨を人工膝関節置換術29例(男性6 女性23 平均71歳)の大腿脛骨関節から採取。軟骨片から直接RNAを抽出した検体を"Native cartilage"と定義した。コラゲナーゼで軟骨片から軟骨細胞を単離、 1×10^4 細胞/cm²で単層培養を施行。単離直後の細胞を"Primary"と定義した。コンフルエンスとなった単層培養は、RNA抽出、ペレット培養、単層培養継代に使用。継代番号は細胞をトリプシンで回収し再度単層播種した回数を示す(P1-P4)。

再分化誘導には三次元培養を施行。P1-P4細胞を軟骨分化培養液(TGF- β 3、BMP-2含有)に再懸濁し、 2.5×10^5 細胞を10日間ペレット培養した。またHA分子量解析では、P2細胞をアルジネートビーズに包埋し通常培養液で2週間培養した。

軟骨片、単層培養、ペレットからRNAを抽出しreal time RT-PCRを施行。目的遺伝子ACAN、SOX9、HAS1-3、COL2、GAPDHのプライマーを用い、標準曲線による絶対定量法で解析した。

ペレットの5 μ m切片を作成し、サフラニンO染色、COL2免疫組織染色、HA結合蛋白プローブ(HABP)によるHA染色を施行。

培養液中の硫酸化GAG定量にはDMMB法、HA含有量解析にはELISA、HA分子量解析にはアガロースゲル電気泳動アッセイを施行。

遺伝子過剰発現にはヒトHAS1,2のプラスミドを用い、P1細胞に電気穿孔法で一過性遺伝子導入を行った。

結果は平均±標準偏差で表記。mRNA発現はGAPDHで補正、HASアイソフォームは直接比較し、その他はNative cartilageを1とした。各継代細胞はNative cartilageと比較、ペレット培養は同継代数の単層培養との比較をt検定で解析し、P値<0.05を有意とした。

【結果】

Figure 1

COL2、ACAN、SOX9のmRNA発現は、Native cartilageとPrimaryに有意差を認めず(Figs.1A-C)。これは細胞単離過程自体が軟骨細胞表現型を変えないこと、OA軟骨由来細胞が生体内で脱分化していないことを示唆する。これらの発現はP1継代以降劇的に減少した(Figs.1A-C)。その後の継代でCOL2、SOX9は減少傾向だったが(Figs.1A,B)、ACANは不変(Fig.1C)。ACAN蛋白量の指標となる培養液中GAG放出量もACAN mRNAと同傾向を呈し、PrimaryからP1にかけて減少したものの、P1継代以降は変化しなかった(Fig.1D)。これらの変化と一致して、細胞はPrimaryからP1にかけて劇的に形態を変えた(Fig.1E)。

各継代細胞のペレットは10日間で増大しECMの豊富な生成を示唆すると共に、単層培養で減少したCOL2、ACAN、SOX9発現をNative cartilage同等まで回復した(Figs.1A-C)。細胞はアルジネートビーズ培養後、Primaryに近い形態を取り戻した(Fig.1E)。

Figure 2

ペレット全体に豊富なサフラニンO染色を認め、高度のプロテオグリカン堆積が示された(Fig.2A)。P1-P4間で染色に差を認めず。高倍率下で多くの細胞が軟骨細胞様の円形形態を呈した。COL2免疫染色及びHABP染色も同傾向を示し、いずれも主に細胞周囲基質に染色を認めた(Figs.2B,C)。

Figure 3,4

HAS1-3いずれもNative cartilage及びPrimaryで概ね同等に発現した(Figs.3A,B)。HAS1,2はACAN同様に初期継代で減少した後は変化を認めず。HAS3は初期継代で減少せず、逆にやや増加した状態がその後も続き、HAS1,2に対して優位だった(Fig.3C)。更にHA合成量は継代過程でほぼ一定だった(Fig.3D)。そして前述の軟骨分化遺伝子と同様に、HASアイソフォーム発現パターンもペレット培養によりNative cartilage同様に戻った(Figs.3,4A)。

培養液中のHA分子量をアガロースゲル電気泳動で解析したところ、Primaryの検体はゲルに流れず $>1 \times 10^6$ Daであることが示唆されたが、P1-P4では中分子量HAと同等のバンドを認めた(Fig.4B,C)。HAS1,2を過剰発現したP1細胞では高分子量HA

と同等まで増加した(Fig.4C)。アルジネートビーズ培養した P2 細胞でも同様に分子量が増加した(Fig.4D)。

【考察】

軟骨細胞の遺伝子発現パターンは単層培養継続により劇的に変化し、脱分化と呼ばれる過程を辿る。本研究で、脱分化したOA軟骨細胞がACI後の生体内環境に似た培養下で軟骨細胞表現型を回復できるかを調べた。OA軟骨細胞は、少なくとも第4継代、細胞数にして約625倍増殖後にも軟骨細胞表現型を再活性化でき、将来的にACIをOA関節に適応できる可能性を示した。

ドナーの制約で若者由来の正常関節軟骨コントロールが無いことが本研究の制限である。OA軟骨細胞が、健常軟骨細胞と比べ既に不可逆的变化を来していると言われる一方で、正常軟骨細胞に匹敵する増殖・分化能を持つという報告もある。本研究で若年健常軟骨細胞とOA細胞を直接比較できなかったが、過去に我々は若年健常動物としてウシ関節軟骨細胞を継代、再分化誘導し、SOX9、COL2、ACAN、HAS2に関する同様の变化を報告している。

HASアイソフォーム発現パターンや機能を報告した文献は複数あるが、アイソフォームの使われ方がヒト関節でHA合成や機能に与える影響は知られていない。本研究で3つのアイソフォームはNative cartilageとPrimaryで概ね同等に発現した。競合的RT-PCRによる過去の研究で、正常軟骨細胞ではHAS2がHAS1,3の100倍以上発現している報告を踏まえると、OAがそのパターンを変化させている可能性がある。単層培養後にはHAS3の発現が優位となった。脱分化と再分化でHAS1とHAS3の発現が逆転したことから、アイソフォーム使用の変化が生物学的影響を与えるとまで言えないが、HA合成量が変わらなかったことは、合成されたHA分子量の変化を示す可能性もある。培養細胞株の組換え遺伝子発現による研究で、HAS3が中分子量HA(10^5 - 10^6 Da)を合成する一方、HAS1,2はより大きいHA分子($>2 \times 10^6$ Da)を合成したことが報告されている。本研究では、分子量の大きいHAはPrimaryでのみ認められ、HAS3が優位なP1-P4細胞由来のHAは全て 10^5 - 10^6 Da範囲内であった。更にヒトHAS1,2過剰発現及びアルジネートビーズ培養は、脱分化した細胞が産生するHAの分子量を増加させた。これらの結果はHASアイソフォーム変化とHA分子量変化の関連性を示唆している。

【結語】

脱分化した変形性関節症軟骨細胞は、軟骨分化遺伝子発現を再活性化できる能力を有し、更には試験管内で軟骨様組織を産生した。この結果は、臨床で組織工学医療の細胞資源として高齢患者由来の変形性関節症軟骨組織を使用できる可能性を確かめるものである。ヒアルロン酸合成酵素アイソフォームの変化は、軟骨機能に決定的な影響を与えている可能性があり、産生されるヒアルロン酸の分子量を制御することで、ヒアルロン酸が組織内にアグリカンを保持できる許容量を変えている可能性がある。