

主論文の要旨

Osteoarthritis-derived chondrocytes are a potential source of multipotent progenitor cells for cartilage tissue engineering

〔 軟骨再生における変形性関節症由来軟骨細胞の可能性 〕

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)

小田 智之

【目的】

自家培養軟骨細胞移植（ACI）において、単層培養増殖過程で脱分化した軟骨細胞は生体内で再分化すると考えられるが、変形性関節症（OA）への適応に関しては、変形性関節症由来軟骨細胞（OACs）の再分化能や軟骨基質の再構築能力の低下が予想されるため問題があるとされている。一方で、間葉系幹細胞は多分化能を持つことが知られており、ACIをはじめとして、それ以外の分野においても既に臨床応用されている。我々はこれまで OACs の性質について調査し、進行した OA 患者から採取した細胞でも軟骨基質の再構築能力が保たれていることを報告してきた。また近年、軟骨組織には多分化能を持つ細胞が存在し、OA ではその割合が増加していると報告されている。しかし、それは OACs そのものが間葉系幹細胞と同様に多分化能をもつということではなく、OACs の性質についてはいまだ不明な点が多い。そして、OACs が間葉系幹細胞と同様に多分化能をもつという報告は渉獵しえた範囲では未だない。よって我々はヒト OACs が再生医療のセルソースになりえるかを探るため、OACs の細胞表面マーカー、増殖能、多分化能を調べ、骨髄由来間葉系幹細胞（MSCs）と正常軟骨細胞（ACs）の結果と比較することを目的とした。

【方法】

人工膝関節置換術時に軟骨片と骨髄を採取し、軟骨片から OACs を、骨髄から MSCs を単離し、単層培養した。ACs は人工骨頭置換術、Bankart 修復術時に軟骨を採取し単層培養した。OACs、MSCs、ACs の細胞表面マーカーをフローサイトメトリーにて測定し、OACs、MSCs の増殖能を MTT assay にて評価した。そして、OACs と MSCs の軟骨分化能（再分化能）については pellet culture の手法を用い 3 次元培養し、軟骨分化関連遺伝子である SOX9、COL2、Aggrecan の発現量を real-time RT-PCR 法により解析した。また、OACs と MSCs で作成した pellet の切片を作成し COL2 の免疫染色、Safranin O 染色を行った。骨分化能は Runx2、ALP の mRNA の発現量と Alizarin red 染色にて評価した。また、脂肪分化能は FABP4、LPL の mRNA の発現量と Oil red O 染色にて検討した。OA 関連遺伝子については ACs と OACs にて MMP13、ADAMTS5 の mRNA の発現量を比較、更にはその上流でそれらの遺伝子発現を調節する miR -27b と miR -140 の発現量の変化を測定した。

【結果】

フローサイトメトリーにて間葉系幹細胞マーカーである CD29、CD44、CD73、CD90、CD105 の発現率は OACs、MSCs、ACs で同等であった。OACs の間葉系幹細胞マーカーの発現率は P1 の時点で全て 95%以上であった (Figure. 1A)。OACs の増殖能は MSCs より高かったが優位差は認めなかった (Figure. 1B)。

OACs、MSCs の軟骨分化（再分化）誘導においては、pellet culture にて 3 次元培養した OACs は単層培養細胞より SOX9、COL2、Aggrecan の発現が有意に高く (Figure. 2A)、MSCs と比較しても COL2 の免疫染色、Safranin O 染色にてより強く染まってい

た (Figure. 2B)。そして、OACs は MSCs と同様に骨、脂肪への分化能を有し、Alizarin red 染色と Oil red O 染色においても MSCs と同等な染色性を示した (Figure. 2C~F)。

軟骨分化関連遺伝子である SOX9、COL2、Aggrecan の mRNA の発現量は採取時の ACs と OACs で優位差を認めなかった。それらの OACs での発現量は、単層培養により脱分化して低下するものの、再分化にて ACs の採取時のレベルにまで回復した (Figure. 3A, B)。

OA 関連遺伝子である MMP13、ADAMTS5 の mRNA の発現量は採取時の ACs に比べ OACs が優位に高かったが、OACs を単層培養すると、それらの mRNA の発現量は ACs のレベルまで低下した (Figure. 4A)。また、再分化の過程において OACs の miR -27b と miR -140 の発現量の有意な増加を認めた (Figure. 4B)。

【考察】

単層培養し脱分化したと考えられている OACs は、MSCs と同様に間葉系幹細胞マーカーを発現していた。そして、今回の研究からは OACs、MSCs、ACs を細胞表現マーカーで区別することはできなかった。

OACs は軟骨、骨、脂肪へと分化し、多分化能を有している可能性が示唆された。とりわけ軟骨への再分化能、軟骨基質の産生能は保たれていた。また、OA 発症に関与し軟骨基質を分解する MMP13、ADAMTS5 の mRNA の発現量は、細胞の採取時には ACs に比べ OACs で優位に高値であった。しかし、*in vitro* にて OACs を培養するとそれらの発現量は正常軟骨レベルにまで低下した。更には、MMP13、ADAMTS5 の発現を制御する miR-27b、miR-140 の発現量は、OACs に再分化をかけると上昇した。このことも OACs の細胞内でエピジェネティックな変化が起きていることを示し、OACs が *in vitro* にて正常な軟骨の形質を再獲得できる可能性が示された。従って、今回の研究から OACs、ACs、MSCs の性質を比較しても、OACs は ACs、MSCs と同等、もしくはそれ以上の軟骨分化能（再分化能）を有しており、再生医療のセルソースになりえると考えた。

【結論】

単層培養により脱分化した OACs でも再分化能は保たれており、MSCs と比較しても軟骨分化能は優れていた。また、OACs は骨、脂肪へも分化し多分化能を有している可能性が示された。更には、OACs は ACs と比較しても軟骨基質の産生能は同等であり、MMP13、ADAMTS5 の発現も *in vitro* にて正常軟骨レベルにまで低下した。OACs も再生医療のセルソースになりえることが示唆された。