

### A3 骨肉腫細胞株 MG63 に対するヒアルロン酸オリゴ糖の抗腫瘍効果

○細野幸三<sup>1</sup>, 内堀充敏<sup>2</sup>, 石黒直樹<sup>1</sup>, 西田佳弘<sup>1</sup>  
(名古屋大学医学部整形外科<sup>1</sup>, 額田町北部診療所<sup>2</sup>)

【目的】ヒアルロン酸分子量の違いによる骨肉腫細胞の増殖能、浸潤能に対する抑制効果を解析すること。

【対象ならびに方法】単層培養した骨肉腫細胞株 MG63 に各種分子量のヒアルロン酸を投与し、対照との比較をする。腫瘍細胞増殖度を MTT assay で、細胞、細胞周囲のヒアルロン酸、マトリックス形成をヒアルロン酸結合蛋白使用の染色と coat assay で、ヒアルロン酸の細胞膜上リセプターである CD44 とヒアルロン酸合成酵素 HAS2 の mRNA 発現量を定量的・競合的 RT-PCR で、MMP 活性を zymogram で、細胞浸潤能を matrigel invasion assay でそれぞれ解析した。

【結果】MTT assay では HA6~HA12 及び高分子量ヒアルロン酸 (60~120KDa) で増殖抑制効果を認めた ( $P<0.05$ ) が、HA4 では有意差を認めなかった。ヒアルロン酸染色では HA8 で特に細胞周囲マトリックスのヒアルロン酸蓄積が少なく、Coat assay でも HA8 で特に細胞周囲マトリックスの形成が抑制された。mRNA 発現についてはヒアルロン酸オリゴ糖間では HAS2 mRNA 発現量に差を認めず、CD44 は HA4 で発現の上昇を認めた。Zymogram では MMP2 活性を認めたが、ヒアルロン酸投与による影響は明らかでなかった。Matrigel invasion assay では HA8 以上で細胞浸潤能の抑制を認め ( $P<0.05$ )、特に HA8 では著明な抑制効果を認めた。

【結論】MG63 に対する細胞増殖、細胞浸潤能抑制効果は投与するヒアルロン酸分子量に依存している。特に HA8 では細胞周囲のヒアルロン酸リッチなマトリックス形成を阻害し、細胞の浸潤能も抑制することが明らかとなった。細胞周囲のヒアルロン酸リッチなマトリックスを制御することで増殖能、浸潤能を抑制する可能性が示唆された。

Inhibition of Proliferation and Invasion in Osteosarcoma Cell Line, MG63 by Hyaluronan Oligosaccharides

Kozo Hosono<sup>1</sup>, Mitsutoshi Uchibori<sup>2</sup>, Naoki Ishiguro<sup>1</sup>, Yohihiro Nishida<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Dept. Orthop. Surg. Nagoya Univ. School of Med, <sup>2</sup>Northern Clinic of Nukata Town)

### A4 コラーゲンゲル三次元培養における軟骨由来プロテオグリカンが軟骨細胞に与える影響

○大鹿周佐<sup>1</sup>, 今 淳<sup>1</sup>, 石橋恭之<sup>2</sup>, 楠美智巳<sup>3</sup>, 田中正則<sup>3</sup>, 藤 哲<sup>2</sup>, 高垣啓一<sup>1</sup>

(弘前大学医学部生化学第一講座<sup>1</sup>, 弘前大学医学部整形外科学講座<sup>2</sup>, 弘前大学医学部病理学第二講座<sup>3</sup>)

【目的】軟骨細胞は、単層培養を行うと容易に軟骨としての形質を失い線維芽細胞様細胞へと脱分化する。従って、軟骨細胞の分化維持のため、様々な合成高分子や天然高分子が足場として開発され、再生医療に応用されてきた。しかしながら、現時点では十分に満足できるものではなく、さらなる有用な足場の開発が必要である。最近、細胞外マトリックス主要構成成分の一つであるプロテオグリカンが、細胞分化や形態形成を制御する可能性が報告されている。本研究では、軟骨由来のプロテオグリカンが軟骨細胞の分化を維持できるか検討した。

【対象ならびに方法】アテロコラーゲンゲル (高研) とサケ鼻軟骨から精製されたプロテオグリカン溶液を混合してコラーゲンゲルを調整し、これに日本白色家兎膝関節軟骨から分離した培養軟骨細胞を  $1.5 \times 10^5$  個包埋して三次元培養を行った。プロテオグリカン溶液を混合しないアテロコラーゲンゲル単独群を対照群とした。各条件下におけるゲル内の生細胞数測定、細胞外マトリックスの組織学的評価及び軟骨分化マーカー (II 型コラーゲン, アグリカン) 遺伝子の発現を比較検討した。

【結果】アテロコラーゲンゲルにプロテオグリカンを添加した足場のもとで軟骨細胞を培養した場合、対照群に比較して、細胞の増殖は増大していた。組織学的にも軟骨の形態は維持され、しかも分化マーカーである II 型コラーゲンやアグリカンなどの遺伝子は高く発現していた。

【結論】軟骨由来プロテオグリカンは、軟骨細胞の増殖を促進し、その分化を維持する機能を有することが示された。軟骨由来プロテオグリカンは、軟骨形成における足場として、今後の再生医療に有用な可能性が示唆された。

Effect of cartilage-derived proteoglycan on proliferation and phenotype expression of cultured chondrocytes embedded in collagen gel

Shusa Ohshika<sup>1</sup>, Atsushi Kon<sup>1</sup>, Yasuyuki Ishibashi<sup>2</sup>, Tomomi Kusumi<sup>3</sup>, Masanori Tanaka<sup>3</sup>, Satoshi Toh<sup>2</sup>, Keiichi Takagaki<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Hirosaki University School of Medicine, <sup>2</sup>Department of Orthopaedic Surgery, Hirosaki University School of Medicine, <sup>3</sup>Department of Pathology, Hirosaki University School of Medicine)