

関節軟骨再生における基礎的研究

A basic research of the in vitro cartilage regeneration

1K05A230

山田 藤吉

指導教員

主査 福林徹先生

副査 鳥居俊先生

【緒言】

スポーツ外傷において、膝関節を中心とした関節軟骨損傷は重症度の高い外傷であり、スポーツ復帰に大きな支障をきたす。また、高齢化社会においては慢性関節リウマチや変形関節症などの関節軟骨の疾患は深刻である。関節軟骨損傷に対する治療において、再生医療の進歩は必要不可欠である。現在、ヒトの胚性幹細胞 (Embryonic Stem cells、ES細胞) から様々な組織細胞への分化には成功しているが、移植先の組織における機能獲得や組織補完能力獲得に関しては課題が多い。再生医療への応用のためには、より良い関節軟骨細胞の培養条件の検討が必要である。そこで本研究では ES 細胞を関節軟骨細胞へ分化させる際の薬学的刺激などの誘導因子が再生に及ぼす影響を検討することを目的とした。

【方法】

基本培地 (FBS(15%) 90ml、Non-Essential AA solution 6ml、L-Glutamin 6ml、2-ME 4.2 μ l、Sodium Pyruvate solution 6ml、DMEM 500ml) をコントロールとして、FBS を 20% にしたものを培地 A、軟骨に分化させる誘導因子とされる TGF- β 3 をコントロールに 20mg/l 加えたものを培地 B とした。以上 3 種の培養液で、マウス由来 ES 細胞株 CCE の ES 細胞を用い、軟骨細胞への分化の違いを検討した。その後、それぞれの培地 15ml を非接着性のシャーレにいれ、トリプシン処理をして回収した ES 細胞を 1×10^6 cells となるように懸濁させた後に 3 日間静置培養して embryoid body

(EB) を作製した。EB を回収し、前日にゼラチンコーティングしていた 6well プレートに播種して 7 日間静置培養し、この間 2 日おきに培地交換を行った。細胞を ISOGEN で回収し、リアルタイム PCR を行った。

【結果】

培地 A・B いずれの分化培地においてもコントロールに比較して Collagen type II mRNA の発現がそれぞれ約 5 倍 ($P < 0.05$)、約 7 倍 ($P < 0.01$) と有意に上昇していた。また、Sox9 mRNA についても、有意差こそ示されなかったものの (いずれの培地においても $P \approx 0.07$)、発現の上昇傾向が示された。培地 B においては Collagen type I、Runx2 共に mRNA の発現がそれぞれ約 2 倍 ($P < 0.05$)、約 3 倍 ($P < 0.01$) 有意に上昇していた。また、Collagen type I mRNA の発現がコントロール系と差が無かった培地 A においても Runx2 mRNA の発現においては約 3 倍 ($P < 0.05$) 上昇していた。一方、未分化マーカー OCT4 についてはいずれの分化培地も約 0.6 倍と有意に減少した (培地 A: $P < 0.01$ 、培地 B: $P < 0.05$)。

【考察】

培地 A・B いずれにおいても Collagen type II mRNA の発現が有意に増加しており、また未分化マーカーである Oct4 の発現が減少していることから軟骨細胞への分化が誘導されていることが示された。一方で、TGF- β 3 を添加した培地 B においては Collagen type I mRNA の発現も増加しており、全体的な方向性として間葉系幹細胞を介し

た骨・軟骨系への分化を促進すると考えられる。TGF- β 3 は間葉系幹細胞においてはヒト、マウスいずれにおいても軟骨細胞への分化を誘導することが報告されているが、ES 細胞においてはヒト ES 細胞では軟骨分化を誘導することが報告されている。一方で、マウス ES 細胞では軟骨分化の際に添加するとむしろ脱分化を誘発してしまい、Collagen type I の発現を増加させることが報告されている。このことから TGF- β 3 は ES 細胞を骨・軟骨方向へと分化誘導することが出来るが、その選択性はあまり高くないと考えられる。今回の実験結果からも TGF- β 3 を添加した培地 B は軟骨細胞分化への選択性が低いと示され、軟骨細胞

への選択的な分化制御という点では培地 A が比較的優れていると示された。

【結論】

本研究では薬学的誘導因子の違いが ES 細胞に及ぼす影響を検討した。FBS、TGF- β 3 共に Collagen type II mRNA の発現を有意に増加させ、また未分化マーカーである Oct4 の発現を減少させたことから軟骨細胞への分化を誘導させることが示唆された。しかし、TGF- β 3 は Collagen type I mRNA の発現も増加させることから骨・軟骨の誘導因子として働き、分化に対する選択性はないことが示唆された。