慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes and chondrogenesis of human bone marrow stromal cells via chondrosphere formation with expression profiling by large-scale cDNA analysis.
Sub Title	軟骨球体培養法におけるヒト脱分化軟骨細胞の軟骨再分化およびヒト骨髄間質細胞のlarge-scale cDNA解析
Author	今林, 英明
Publisher	慶應医学会
Publication year	2004
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.81, No.1 (2004. 3) ,p.19-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20040302-0019

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes and chondrogenesis of human bone marrow stromal cells via chondrosphere formation with expression profiling by large-scale cDNA analysis.

（軟骨球体培養法におけるヒト脱分化軟骨細胞の軟骨再分化およびヒト骨髄間質細胞のlarge-scale cDNA解析）

今林　英明

内容の要旨

軟骨細胞は、単層培養下で継代培養を行うことにより軟骨としての形態を急速に消失し脱分化という状態となる。このことは現在行なわれている軟骨細胞移植治療において、軟骨細胞を継代培養することができず移植細胞数の限界となっている。その対策として、脱分化軟骨細胞の軟骨再分化を促し移植細胞として利用できるようにすること、軟骨以外の細胞として軟骨への分化能を示す骨髄間葉系幹細胞を用いること、等が考えられる。本研究は脱分化軟骨細胞の軟骨再分化法を確立することおよび軟骨へ分化する骨髄間質細胞を単離しその性状を分子学的、遺伝子学的に検索することを目的として以下の研究を行った。

軟骨分化に特異的といわれるType Ⅱ collagen、aggrecanを発現し細胞外マトリックスを産生するヒト骨髄間質細胞（H4-1細胞）を限界希釈法により単離した。その細胞は細胞表面マーカーの発現において骨髄間葉系幹細胞と異なるCD34-、c-kit-、CD140a$^{\alpha\ low}$を示し、軟骨への分化能を有する骨髄間質細胞の新しい細胞分画を提唱するものである。また、ヒト脱分化軟骨細胞と骨髄間質細胞の両方に使用できる軟骨分化誘導法として軟骨球体培養法を確立した。本培養法は今まで骨髄間質細胞の分化誘導法であるpellet法と比較しaggrecan遺伝子の早期発現を認め、軟骨分化をより早く促進する有用な分化誘導法である。さらに、脱分化軟骨細胞の再分化７日目におけるcDNA profiling、骨髄間質細胞（H4-1）の単層培養増殖期のcDNA profilingについてoligocapping法を用いることにより作製した。Large-scale cDNA解析により軟骨細胞再分化においてはstructural protein遺伝子の発現が多くその大半を軟骨関連の細胞外マトリックスの遺伝子発現が占めていた。特にロイシンリッチ小型プロテオグリカン、cartilage oligomeric matrix protein、chitinase3-like 1（cartilage glycoprotein-39）の発現を高頻度に認め、軟骨再分化初期における細胞外マトリックスの産生情報を解析することができた。骨髄間質細胞増殖期においては線維芽細胞増殖因子７、CCN family特にconnective tissue growth factorといった増殖因子関連遺伝子の発現を高頻度に認め、今後の骨髄間質細胞の解明に役立つものと思われる。これらのcDNA profilingは、骨髄間質細胞および変形性関節症の軟骨再生の解明に非常に有用な情報を与えてくれるものであると考えている。

論文審査の要旨

軟骨細胞は単層培養を繰り返し行うことにより軟骨としての性状を急速に失い脱分化といわれる状態に陥り、軟骨へ再分化しないと考えられていた。本研究は軟骨再分化を目的に、新たな軟骨再分化法を提示するとともに、再分化７日目におけるcDNA profilingをoligocapping法により作製し発現遺伝子解析を行った。また、骨髄間質細胞のなかに間葉系組織に分化する多分化能を持つ間葉系幹細胞、骨・軟骨・脂肪の前駆細胞が存在することが知られている。本研究において骨髄間質細胞の性状解析を目的に、ヒト成人骨髄より採取された軟骨分化能を有する間質細胞について単層培養増殖期におけるcDNA profilingを作製し発現遺伝子解析を行った。

Micromass培養法をもとに細胞凝集を行った後に培養皿より細胞塊を剥離し、培地にて浮遊させ培養する方法として軟骨球体培養法（chondrosphere法）を考案した。７継代目のヒト脱分化軟骨細胞をこの方法を用いて再分化誘導を行うと旺盛な細胞外マトリックスを産生し、Ⅱ型コラーゲン、アグリカンといった軟骨特異的といわれる遺伝子発現も認め軟骨再分化が示された。Large-scale cDNAの解析において、細胞外マトリックスとしてのsmall proteoglycanの発現を高値に認め、軟骨再分化は発生における軟骨形成に類似していることが示された。骨髄間質細胞の単層培養増殖期におけるlarge-scale cDNAの解析では新たにFGF7、CTGF、BMP antagonist 1の発現を高値に認め新しい増殖因子および関連遺伝子の発現が認められた。

審査では、cDNA解析において、二つの異なる細胞を異なる条件にて比較していることについて質問された。これに対し、large-scale cDNAの解析において一細胞－条件において3072クローンという大量のcDNAクローンを作製し解析しなければならず多条件での比較がcDNAの作製数の制限から困難であったと回答された。また、遺伝子発現頻度を何らかの方法で再確認するべきではないかと質問された。これに対し定量PCR法やノーザンブロット法による確認が必要であるが今回は一部の遺伝子のみ半定量PCR法で確認をおこなったと回答された。最後にchondrosphere法の命名について未分化幹細胞を用いておらず、本来のsphereの意味と異なるのではないかと質問された。これに対し、sphereという表現は適せずspheroidとすることを考慮していると回答された。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき点を残しているが、脱分化軟骨細胞の再分化法を開発し、さらに骨髄間質細胞の軟骨分化に関連する数種類の遺伝子を同定した点が今後の関節軟骨の再生に向けて有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　整形外科学　戸山　芳昭
病理学　岡田　保典　　発生・分化生物学　須田　年生
生理学　岡野　栄之
学力確認担当者：北島　政樹、岡田　保典
審査委員長：岡田　保典

試問日：平成16年１月19日