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

Title	Hyaline cartilage formation and enchondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts
Sub Title	骨髄間質細胞KUM5およびOP9を用いた軟骨再生と内軟骨性骨化モデル
Author	杉木, 正
Publisher	慶應医学会
Publication year	2007
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.84, No.4 (2007. 12) ,p.4-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20071202-0004

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.

Hyaline Cartilage Formation and Enchondral Ossification Modeled With KUM5 and OP9 Chondroblasts

（骨髄間質細胞KUM5およびOP9を用いた軟骨再生と内軟骨性骨化モデル）

杉　木　　正

内容の要旨

再生医療の概念は、細胞を用いることで損傷あるいは疾患に陥った組織を修復することである。特に骨・軟骨に関しては最もヒトへの臨床応用が容易な分野でもあり、その方法論の早期確立が望まれている。近年、骨髄間質細胞は胚性幹細胞や胎児細胞と同様に再生医療における優れた細胞ソースに成りうると期待されている。本研究では骨髄間質細胞から樹立した２つの異なる細胞株KUM5およびOP9を用いて生体内での軟骨再生を試みた。

実験では、まず両細胞を用いて軟骨の３次元培養法であるペレット培養を行った。作製した軟骨ペレット組織をトルイジンブルー染色、抗II型コラーゲン染色によって経時的に観察し、電子顕微鏡では微細構造を観察した。また、軟骨培養に至適な増殖因子の組み合わせを検討した。次に両細胞の表面抗原をフローサイトメトリーで検索した。さらに両細胞と軟骨を形成しない他の骨髄間質細胞のGene Chip解析を行った。発現している細胞表面抗原遺伝子・軟骨関連遺伝子から細胞間の遺伝子発現の関連性をみるため階層的クラスタ分析と主成分分析を行った。また、ヌードマウスの皮下に細胞あるいは軟骨ペレット移植を行い、生体内での軟骨再生を試みた。最後に骨髄間質細胞から軟骨芽細胞を単離する目的で、硝子軟骨特異的遺伝子XI型コラーゲンα2を遺伝子導入したKUM5細胞を用いて生体内での軟骨再生を試みた。

両細胞とも10週間のペレット培養が可能であり、３週の組織像ではペレットの周囲から中心部までトルイジンブルー染色で異染性を呈し、豊富な軟骨細胞外基質の産生を示した。この領域はII型コラーゲン染色でも陽性であった。電顕像による微細構造にも軟骨特有の構造が認められた。また、ペレット培養における増殖因子の組み合わせではTGF-β3+BMP2の組み合わせが至適であった。Gene Chip解析ではKUM5およびOP9細胞は他の骨髄間質細胞と比べてII型コラーゲンα1、Sox9、cartilage oligomeric matrix proteinなどの軟骨関連遺伝子の発現が極めて高値で他の間質細胞より高い軟骨分化能を持つことが示唆された。また、両細胞の表面抗原における遺伝子発現様式は細胞表面抗原のタンパク発現レベルと一致した。さらに階層的クラスタ分析と主成分分析では両細胞は他の７つの間質細胞とは明確に区別され、同一カテゴリーに分類された。細胞の生体への移植では両細胞はペレットを移植した場合、移植後３週で硝子軟骨組織を形成したが、その後骨化した。KUM5細胞は生体内に接種するだけで軟骨を形成した後、骨化した。また、遺伝子導入したKUM5細胞でも同様に軟骨組織を形成した後、骨化した。

本研究の結果から、KUM5およびOP9骨髄間質細胞は生体で内軟骨性骨化を生じることが証明された。両細胞の遺伝子発現プロファイルと生体への細胞移植は今後の軟骨再生・内軟骨性骨化を解析する有用なモデルとなることが示唆された。

論文審査の要旨

骨・軟骨は骨格系を構成する主たる組織であり、その病的状態は日常の活動を著しく障害するため、この分野での再生医療が強く望まれている。近年、骨髄間質細胞はその多分化能や安全性、倫理面から再生医療における優れた細胞ソースに成りうると期待されている。本研究ではマウス骨髄間質細胞から樹立した２つの異なる細胞株KUM5およびOP9を用いて生体内での軟骨再生を試みた。In vitro、in vivoにおいて両細胞は豊富な細胞外基質を伴う硝子軟骨組織を再生することが明らかとなった。また、gene chip解析では両細胞は軟骨関連遺伝子の発現が極めて高値であり、細胞の定常状態で高い軟骨分化能を持つことが示唆された。In vivoでの両細胞の再生軟骨組織は移植後４週で骨髄腔を形成し、内軟骨性骨化を生じた。硝子軟骨特異的遺伝子XI型コラーゲンα2を遺伝子導入したKUM5細胞を用いて生体内での軟骨再生を試みたが同様に内軟骨性骨化を生じた。本研究の結果から、軟骨再生の臨床応用には分化誘導とその制御そして周囲環境に対する反応などをさらに詳しく検討していく必要はあるが、この２つの骨髄間質細胞株は軟骨再生と内軟骨性骨化を解析する上で有用なモデルとなることが示唆された。

審査では、まずgene chipデータの解析方法についての質問がなされた。すべての遺伝子発現値は細胞の増殖期のものであり、各細胞において軟骨分化誘導による遺伝子、タンパク質の発現の変化も検索すべきであったと回答された。次に再生組織の軟骨細胞の肥大化の有無について質問がなされた。KUM5細胞では軟骨細胞の肥大化が認められたが、OP9細胞では顕著ではなかったと回答された。また、導入遺伝子としてXI型コラーゲンα2を用いた理由について質問がなされた。この遺伝子は非常に微量ながら極めて硝子軟骨に特異的に存在するため、より硝子軟骨の性質を有した細胞を単離できる可能性があると回答された。次に生体への細胞移植では最終的に再生軟骨は骨化しているが、細胞自体の性質によるものか、あるいは移植部周囲の環境によるものかとの質問がなされた。これに対して骨化は移植部の周囲組織からの血管侵入が原因であり、細胞自体の問題より周囲環境に原因がある可能性を否定できない。皮下組織への移植では周囲に血行が多いため、技術的に可能なら関節内や眼球の硝子体内などの血管の乏しい組織に移植を行うことが必要であると回答された。最後に臨床応用の展望について質問がなされた。実際の治療では大量の細胞が必要となり、一旦生体外で細胞を増殖させる必要があり、同時に最適な足場（scaffold）の開発が必要となる。しかし、その方法論に関しては今後も議論する余地があると回答された。

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ものの、２つの異なる骨髄間質細胞の遺伝子プロファイルを獲得し、今後の臨床応用に向けて生体での軟骨再生・内軟骨性骨化を解析するモデルを確立した点が有意義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
リハビリテーション医学　里宇　明元
学力確認担当者：池田　康夫
審査委員長：岡田　保典

試問日：平成19年6月27日