

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム (2009.03) 9巻1号:68～69.

平成19年度「独創性のある生命科学研究」プロジェクト課題
関節軟骨表層部分損傷に対する細胞治療(cell based tissue engineering)
における基礎研究

阿部里見、能地 仁

させる細胞数に限りがあること、二次的な手術が必要なこと、軟骨分化の制御が困難であること、完全な硝子軟骨での再生が期待できないことなどの問題がある。

本研究の最終的な目的は、関節軟骨表層の部分損傷に対する細胞治療 (cell based tissue engineering) を確立することである。

これまでの研究で我々は、関節軟骨細胞が in vitro において免疫学的に寛容であり、活性化したリンパ球の増殖をも抑制する特性を有することを発見してきた。このような免疫学的特性は、軟骨細胞の前駆細胞である MSC において、世界中の多施設によって確認、報告がなされており、我々は間葉系の細胞に共通して保持された特性ではないかと考えている。

この特性は、同種軟骨細胞移植への可能性を秘め、前述した細胞数や二次的手術の問題を解決することにつながる。また、細胞移植における炎症性細胞の遊走や炎症性サイトカインの産生の抑制に関与し、移植細胞の生着や移植細胞分化にプラスに働くと推測される。

[目 的]

今回の研究の目的は、関節軟骨細胞と MCS の免疫特性を直接比較することである。MSC は骨髄のみならず半月、関節滑膜、関節内脂肪組織などにも存在することが知られている為、様々な組織から採取した MSC 様細胞を比較した。

更に、関節軟骨細胞が、炎症性サイトカインである IL-2 の産生にどのような影響を与えているかを調べた。

[方 法]

文書にて同意を得て、人工関節置換手術時に切除し破棄される関節内組織から①軟骨細胞、②髄内から MSC、③半月や④滑膜組織より MSC 様細胞を単離、培養した。(1)採取した細胞の表面抗原を Flow cytometry にて測定した。(2)それぞれの細胞 (1×10^5 、 2×10^4 、 4×10^3) と同種他家末梢血単核球細胞(PBMC、 5×10^5)を共培養し、リンパ球増殖試験を行った。(3)それぞれの細胞と CD3/CD28 で活性化した CD4+ T 細胞を(2)と同様の比で共培養し、活性化 CD4+T 細胞の増殖抑制試験を行った。(4)PBMC を用いたリンパ球増殖アッセイ (MLR) を、軟骨細胞の有無条件下で行い、培養上清中の IL-2 を ELISA にて測定した。

14) 関節軟骨表層部分損傷に対する細胞治療 (cell based tissue engineering) における基礎研究

研究代表者 阿部 里見
能地 仁

[背 景]

関節軟骨は自己修復能力に乏しい組織であり、ひとたび損傷すると変性が進行し変形性関節症をひき起こす。特に表層の部分損傷に対しては有効な治療手段が確立していない為、若年者の外傷後の変形性関節症は世界の関節外科医にとって最大の課題となっている。

近年、再生医療、tissue engineering の進歩により、関節軟骨細胞を培養し増殖させ骨軟骨欠損部に移植する技術が臨床応用され始めている。また、関節軟骨細胞を、間葉系幹細胞 (MSC) より分化させることも可能となり、これらの技術を用いて、関節軟骨損傷に対する治療への研究が試みられている。しかし、増殖

(5)同時に PBMC 上の CD25 (IL-2 レセプター) の発現を Flow cytometry で測定した。

[結果]

(1)関節軟骨細胞および異なる組織から採取した全ての細胞群は、CD34(-)、CD45(-)、CD80(-)、CD86(-)、CD73(+)、CD90(+)、CD105(+)、CD166(+)、CD44(+) であり、報告されている MSC の表面抗原と同等の発現パターンを示した。

(2)Stimulation Index (S.I.)>10を同種免疫反応陽性と定義すると、同一個体の異なる組織から採取した全ての細胞において、統計学的な有意差なく、S.I.<10以下であり、同種他家免疫反応を惹起しないことを示した。(Figure 1)

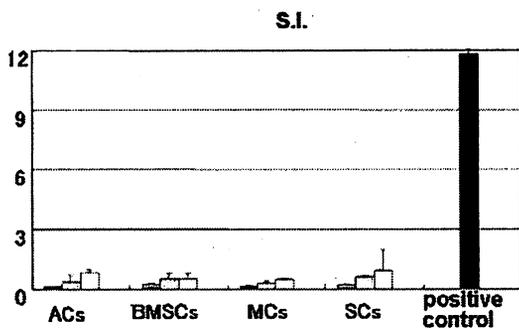


Figure 1 他家 5×10^5 PBMCs を各 stimulator cells 1×10^5 (gray bar)、 2×10^4 (dots bar)、 4×10^3 (white bar) と共培養した結果を S.I. で示したもの。ACs: 関節軟骨細胞、BMSCs: bone marrow stromal cells、MCs: 半月細胞、SCs: 滑膜細胞。

(3)同一個体の異なる組織から採取した全ての細胞 (1×10^5) において、共培養した活性化 CD4+T細胞 (5×10^5) はその増殖が抑制された。個体間において各々の細胞の抑制効果にばらつきがみられた為、骨髄由来間葉系幹細胞が最も抑制効果があるとはいきれなかった。

(4)いずれの比でも、軟骨細胞有無で、IL-2 産生に差はなかった。

(5)軟骨細胞有で MLR 試験を施行した場合、軟骨細胞の比率が多いほど PBMC 上の CD25 (IL-2 レセプター) の発現は抑制されていた。(Figure 2)

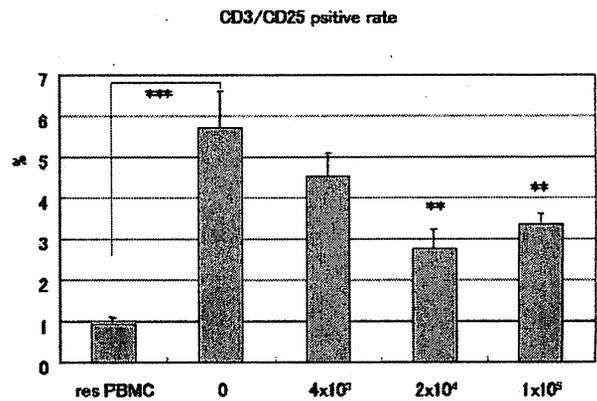


Figure 2 PBMC を用いた MLR を 4×10^3 、 2×10^4 、 1×10^5 軟骨細胞有の条件下で行ったときの PBMC 上の CD3 と C25 の発現を Flow cytometry で測定し、比率で示したもの。

[考察]

関節軟骨、滑膜、関節内脂肪、半月の組織内には、MSC と同様の表面抗原を維持し、MSC と同様の免疫学的特性を持つ細胞が存在することを示した。今後の再生医療への応用が期待される。また、関節軟骨細胞が単核球上の IL-2 レセプターの発現を抑制することが認められ、免疫寛容のメカニズムや細胞移植時の炎症反応の解明の糸口になると考えられる。