

学位論文の要旨

学位の種類	博 士	氏 名	能地 仁
学位論文題目			
<p>Adenovirus Mediated BMP-13 Gene Transfer Induces Chondrogenic Differentiation of Murine Mesenchymal Progenitor Cells (邦題：アデノウイルスによってBMP-13を遺伝子導入したマウス間葉系前駆細胞は軟骨細胞へ分化する。)</p>			
共 著 者 名			
Jin Hyung Sung			
Jueren Lou			
H. Davis Adkisson			
William J. Maloney			
Keith A. Hruska			
Journal of Bone and Mineral Research			
平成16年1月 掲載予定			
研究目的			
<p>関節軟骨は自己修復能の乏しい組織であり、ひとたび損傷を受けると高率に変形性関節症を発症する。そのため整形外科領域では、関節軟骨損傷に対する有効な治療法の確立が積年の課題となっている。近年、生体内に存在する間葉系幹細胞が骨・軟骨細胞に分化できることが明らかとされた。よって間葉系幹細胞を骨・軟骨細胞に分化誘導する環境を解明することにより、再生医学的観点から新しい治療法を確立できると考えられる。このような分化誘導を刺激する代表的成長因子として、TGF-β super familyに属するbone morphogenetic protein (BMP)があげられる。私は個体の発生過程において、特にBMP-13が骨組織内外および関節周囲に多く発現し、更に出生後には関節軟骨に特異的に発現している⁽²⁾。ことに着目した。本研究ではアデノウイルスベクターを利用したBMP over expression modelを用いてBMP-13の有する軟骨細胞分化誘導能を解析し、さらにBMP receptorの役割についても検討した。</p>			

材 料・方 法

アデノウイルスベクターの作成と遺伝子導入

E1部位を欠失し自己増殖能を持たないアデノウイルス5型株を用い、過去の報告に準じヒトBMP-2、-13もしくは β -ガラクトシダーゼ(LacZ)の遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを作成した⁽¹⁾。多分化能が確認されているマウス胚細胞由来未分化間葉系細胞株C3H10T1/2細胞へ各遺伝子を導入し、遺伝子導入細胞は週二回培養上清の半量を新鮮な培地と交換し3週間培養した。ネガティブコントロールとして遺伝子非導入群とLacZ導入群、軟骨細胞分化のポジティブコントロールとしてBMP-2導入群を用い、導入1、2、3週後にBMP-13の生物学的効果について比較検討した。

遺伝子導入効果の評価

アデノウイルスベクターによるC3H10T1/2細胞へのBMP遺伝子導入効果は、導入3日後に遺伝子導入細胞よりtRNAを抽出しreal time PCRにて導入遺伝子のmRNA発現量をもって定量した。Recombinant BMP-13の細胞内産生および培養上清中への分泌はwestern blotting法にて確認した。

組織学的評価

Giemsa染色にて遺伝子導入細胞の形態変化を観察した。

軟骨細胞分化の生化学的評価

軟骨細胞分化の指標として、軟骨基質の構成要素であるグリコサミノグリカンとプロテオグリカンの産生量について生化学的に評価した。グリコサミノグリカンの産生はAlcian Blue染色法にて、プロテオグリカンの産生能は[S35]取り込み試験にて定量した。また、石灰化肥大軟骨細胞および骨芽細胞分化の指標として、ALP活性の測定とAlizarin red-S染色法によるCaの沈着を生化学的に評価した。

遺伝子学的評価

軟骨細胞の分化段階を評価するために、遺伝子導入細胞よりtRNAを抽出し半定量的RT-PCR法にて成熟軟骨細胞特異的マーカーとしてtype II collagen、aggrecan、sox9、肥大軟骨細胞特異的マーカーとしてtype X collagen、骨芽細胞および石灰化肥大軟骨細胞のマーカー遺伝子としてosteocalcinのmRNA発現について評価した。加えて、BMP receptorの軟骨分化への関与を検討するため、BMP-2もしくはBMP-13に結合親和性があるActR-I、-IIB、BMPRI-A、-IB、-II、のmRNA発現についても評価した。

統計学的評価

各測定値は平均値±標準偏差にて示し、one-way ANOVA・Scheffe's post hoc testにて評価した。P値0.05以下をもって有意差と判断した。

成 績

*recombinant BMP-13*の発現

導入したヒトBMP-2とBMP-13遺伝子のmRNA発現コピー数に有意な差を認めなかった。また、遺伝子を導入していない細胞ではヒトBMP-2、-13 mRNAの発現を認めなかった。BMP-13遺伝子導入細胞中にヒトBMP-13蛋白の発現を認めた。

組織学的評価

培養2週後より、BMP-13導入群ではGiemsa染色にて濃染する小円形細胞の集簇が、BMP-2導入群では小円形細胞の他に赤紫色に染まる大型の円形細胞が観察された。一方、ネガティブコントロール群では胞体に油滴を含む脂肪細胞が多数確認された。

軟骨細胞への分化誘導能の検討

軟骨基質産生の評価では、プロテオグリカン産生は培養1週目よりBMP-2、-13導入群共にネガティブコントロール群に比して有意な増加を認め、グリコサミノグリカン産生は培養3週目においてBMP-13導入群で200%、BMP-2導入群で400%の増加を認めた。骨基質産生の指標であるALP活性及びCa沈着は、BMP-2導入群で培養2週目以降に、BMP-13導入群では培養3週目にネガティブコントロール群に比して有意な増加を認めた。遺伝子学的には、BMP-2、-13導入群共に培養1週目よりtype IIB、aggrecanのmRNA発現が見られた。sox9 mRNAは培養1週目より全ての群で発現を認めたが、培養3週目ではBMP-2、-13導入群において発現の消失、減弱を認めた。type X collagen、osteocalcin mRNAは培養1週目よりBMP-2導入群においてのみ発現を認めた。

軟骨細胞分化過程におけるBMPR発現の遺伝子学的評価

経過中全ての群において、BMPR-1B以外の全てのBMPRのmRNA発現を認め、各群間で著明な発現量の差は認められなかった。

考 案

本研究では、BMP-2、BMP-13共に未分化間葉系細胞から成熟軟骨細胞への分化誘導能を有することを明らかとした。BMP-13導入群では経過中にtype X collagen mRNAの発現を認めず、肥大軟骨細胞への分化を誘導しないことを初めて実証した。一方、BMP-13導入群の培養3週目において石灰化肥大軟骨細胞および骨芽細胞のマーカであるALP活性とCa沈着の亢進を認めた。近年、軟骨細胞の液性因子がC3H10T1/2細胞から骨芽細胞への分化を誘導するとの報告があり⁽³⁾、BMP-13によって分化した成熟軟骨細胞が、分化誘導を受けずに残っていたC3H10T1/2細胞を骨芽細胞に分化誘導したものと推察された。BMP-13が直接骨芽細胞への分化を誘導した可能性も残っているが、現在までのところ骨芽細胞分化のみを明確に区別して検出する手法が確立しておらず、更なる検討が必要である。

これまでに十数種類のBMPと6種のBMP-I型receptor、3種のII型receptorが確認されており、各BMP Receptor(BMPR)は数種類の異なるBMPと親和性を持つことが明らかになっている。これらの知見より、細胞の分化誘導は標的細胞自身が発現しているBMPRに依存するものと推察される。本研究では、過去に成熟軟骨細胞分化に必要な不可欠であるとされてきたBMPR-IBが必ずしも必須のreceptorではないことを遺伝子学的に初めて示した。また、BMP-2導入群が、BMP-13導入群に比べて軟骨基質産生が著明であったこと、BMP-2導入群のみが肥大軟骨細胞へ分化したことより、検討項目中BMP-2にのみ親和性のあったActR-Iが軟骨基質産生および軟骨細胞から肥大軟骨細胞への分化に重要な役割を担っている可能性を示唆した。再生軟骨を用いた関節軟骨損傷の治療法を開発するためには、成熟軟骨細胞から肥大軟骨細胞への分化機序の解明が極めて重要である。本研究は、自己修復能の乏しい関節軟骨損傷に対して、再生軟骨を用いた新しい概念の臨床的治療法確立に大きく貢献するものと考えられる。今後、BMP-13の持つ生物学的作用の全貌解明と、ActR-Iの細胞内電子伝達系についての検討が必要と考えられる。




結 論

1. BMP-13はマウス間葉系未分化細胞に対して軟骨細胞分化を誘導したが、肥大軟骨細胞への分化には関与しなかった。
2. BMPR-IBは軟骨細胞分化に必須ではなく、ALK-2が軟骨細胞の最終分化に強く関与している可能性が示唆された。

引用文献

- (1) Lou J, Merkel K, Manske P 1999 Gene therapy: adenovirus-mediated human bone morphogenetic protein-2 gene transfer induces mesenchymal progenitor cell proliferation and differentiation in vitro and bone formation in vivo. J Orthop Res 17:43-50
- (2) Chang SC, Hoang B, Thomas JT, Vukicevic S, Luyten FP, Rybal NJ 1994 Kozak CA, Reddi AH, Malcom M. Jr Cartilage derived morphogenetic proteins. J Biol Chem 269:28227-34
- (3) Gerstenfeld LC, Toma CD, Schaffer JL, Landis WJ 1998 Chondrogenic potential of skeletal cell populations: Selection growth of chondrocytes and their morphogenesis and development in vitro. Microsc Res Tech 43:156-73

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	能 地 仁
<p>審査委員長 <u>杉野 正敏</u> </p> <p>審査委員 <u>柏柳 誠</u> </p> <p>審査委員 <u>立野 正敏</u> </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Adenovirus Mediated BMP-13 Gene Transfer Induces Chondrogenic Differentiation of Murine Mesenchymal Progenitor Cells</p> <p>(邦題：アデノウイルスによって BMP-13 を遺伝子導入したマウス間葉系前駆細胞は軟骨細胞へ分化する。)</p>			
<p>近年、再生医学的観点から関節軟骨損傷に対する新たな治療法の開発が研究されているが、未だ軟骨細胞の分化メカニズムの全貌は解明されておらず、再生軟骨を作製するのに有用な成長因子も同定されていない。</p> <p>本論文は新たに同定された骨形成因子 (bone morphogenetic protein (BMP)) である BMP-13 の軟骨細胞分化誘導能を検証した研究である。アデノウイルス発現ベクターを用いて、ヒト BMP-13 遺伝子をマウス胚細胞由来間葉系前駆細胞株 C3H10T1/2 細胞に遺伝子導入し、recombinant BMP-13 を発現・分泌させることによって BMP-13 の持つ間葉系前駆細胞から軟骨細胞への分化誘導能を組織学的、生化学的、遺伝子学的に解析している。また、軟骨細胞の最終分化まで誘導するヒト BMP-2 をポジティブコントロールとして比較することによって、軟骨細胞最終分化に関与する BMP レセプター(BMPR)についての遺伝子学的検討もなされている。</p> <p>得られた所見は明確なもので、BMP-2 が軟骨細胞の最終分化まで誘導するのに対して、BMP-13 は成熟軟骨細胞分化を誘導したが最終分化は誘導しなかった。同時に、間葉系前駆細胞から軟骨細胞への分化過程において BMPR-IB の発現は</p>			

認められず、発現が確認された BMPR のうち BMP-2 と親和性を持つものは ActR-I/ALK-2 と ActR-IIB のみであった。

以上の結果、BMP-13 が間葉系前駆細胞から最終分化を伴わない軟骨細胞への分化誘導能を有すること、BMPR-IB が軟骨細胞分化に必須ではないことを初めて明らかにした。また、ActR-I/ALK-2 からの細胞内シグナル伝達が軟骨細胞最終分化に強く関与している可能性を示唆した。

本論文は、軟骨細胞の分化メカニズムの解明、ひいては関節軟骨損傷に対する再生軟骨を用いた新たな治療法開発に向けて大きく貢献するものである。

論文提出者は、本論文の関連領域における位置づけおよび今後の研究の展開を明確に認識しており、また関連領域の質問にも的確に回答した。

以上の理由から、本審査委員会は本論文が学位論文に価するものと判定した。