

プロテオグリカンイニシエーターを用いた軟骨組織疾患治療の試み

星 淡子 [慶應義塾大学医学部整形外科運動器科学研究室／特別研究助教]
(前 北海道大学先端生命科学院先端生体制御科学分野西村紳一郎研究室(博士研究員))

背景・目的

軟骨の主成分であるアグリカンは主にコンドロイチン硫酸を豊富に含むグリコサミノグリカン(GAG)より構成される。変形性関節症などの根本的な治療には、GAG分解の阻止と共にGAGの産生亢進が治療において重要な鍵となる。申請者らは今までにGAGの共通糖ペプチド構造を模倣した新しい軟骨糖ペプチドアナログ(PGI)の効率的合成に成功しており、PGIを軟骨細胞へ添加すると、化合物自身がコンドロイチン硫酸を含むGAGを伸長することを既に報告している。本研究ではウサギ等の動物への同種移植に因る軟骨組織疾患治療の試みを目指し、PGIを取り込ませた軟骨細胞の細胞内観察と機能変化について検討する。

内容・方法

20から24週令の正常ウサギ軟骨より膝、肩、股の関節より軟骨細胞を採取、単離して初代培養を行った。この初代培養細胞にGly-Ser-Gly-SerのペプチドにXyl-Galの2糖が結合した化合物(以後、PGI)を添加して8、24、72時間後の培養上清を回収し、上清中のGAGについてHPLC分析を行なった。同時に細胞を回収してRNAを抽出し、細胞中の軟骨関連タンパク質の遺伝子発現変化をリアルタイムRT-PCRを用いて分析し、PGIの添加による軟骨細胞への効果を検討した。軟骨細胞内へ取り込まれたPGIの観察は共焦点レーザー顕微鏡を用いて行なった。これらの検討後、実際に動物への投与実験を行なうにあたって、細胞塊の作成とその評価を行なった。初代細胞にPGIを添加して24時間経過後の細胞を回収しペレットカルチャー(細胞塊培養)した。続けて、ペレットカルチャー10日後の細胞塊をバイオリクターを用いて無重力状態にて2週間培養した。細胞塊の解析は細胞断片をtypeII collagenの免疫染色およびサフラニンO染色を行なって、PGI添加に伴う組織変化について評価した。

結果・成果

ウサギ関節軟骨より単離した初代軟骨細胞に、方法で記述したような構造の糖ペプチドのN末端にFITCをラベルした化合物(FITC-PGI)を添加し、24時間後の細胞内の取り込みを共焦点顕微鏡にて観察した。その結果、FITC-PGIは細胞質内に取り込まれることを確認した。そこで、FITC-PGIを取り込んだ初代培養細胞の72時間後の培養上清を分取してHPLCで分析したところ、

高分子画分にFITC-PGIを検出した。この高分子画分を分取してGAG分解酵素処理し産物の分析を行なった結果、コンドロイチナーゼによって分解され、低分子側にコンドロイチン硫酸モノマーを示すピークを検出した。従ってこの結果より、化合物であるFITC-PGIはコンドロイチン硫酸を糖鎖伸長することを示した。次に、PGI添加培養した際の細胞内軟骨関連タンパク質の発現量変化について検討を行なった。FITC-PGIを8時間もしくは24時間添加した培養細胞よりRNAを抽出し、軟骨関連タンパク質(TypeII collagen, TypeX collagen, SOX9, Aggrecan)の遺伝子発現量の変化をリアルタイムRT-PCRを用いて検討した。その結果、PGI添加8時間後の細胞では、軟骨の分化因子として知られるSOX9の発現を有意に亢進することを示した。一方PGI添加24時間後の細胞では、添加しない細胞と比較して軟骨マーカータンパク質であるTypeII collagenやAggrecanのm-RNAの発現が亢進することを示した。この結果から、PGIを取り込んだ軟骨細胞はより軟骨の分化や形成能力が高い細胞になることを示唆した。また、FITC-PGI添加時の細胞増殖能を測定したところ、PGIの添加による毒性の影響はなく、むしろイニシエーターの添加によって若干の増殖傾向を示した。更に細胞組織におけるPGIの効果について検討するため、細胞塊の作成を試みた。実験では始めに、初代軟骨細胞にPGIを添加して24時間後の細胞を回収し、遠心後の細胞を10日間そのままペレットカルチャーした。その後、培養細胞塊はバイオリクターを用いて2週間培養した。作成された細胞塊は細胞断片を顕微鏡観察し、PGIの細胞塊への取り込みを観察すると共に、TypeII collagenの免疫染色やサフラニンO染色を行なってGAG産生の影響を観察、評価した。実験の結果、平面培養での細胞と同様に、細胞塊にもFITC-PGIが取り込まれていることを蛍光顕微鏡観察により確認した。組織染色に関しては、サフラニンO、TypeII Collagen染色では軟骨細胞特異的な細胞外タンパク質産生の顕著な差は見られなかったが、PGIを添加したものは細胞の縁までよく染色される傾向が見られた。引き続き、組織の軟骨関連タンパク質の発現についてm-RNAレベルの変化を検討していく。

今後の展望

本研究ではPGIの添加によって、平面培養条件下での初代軟骨細胞内にPGIが取り込まれ、PGI自身がコンドロイチン硫酸を伸長したGAGを細胞外に産生することを明らかにした。また、PGI取り込み細胞はコントロールの軟骨細胞と比較して軟骨分化、形成に関するマーカータンパク質の発現を有意に亢進することを示した。更に、三次元培養条件下で作成した細胞塊はPGIを均一に取り込むことを示した。

今後は実際の治療を視野に入れ、PGIを取り込んだ細胞塊と生体適合性のある担体との組み合わせを検討すると共に、効果的なPGI含有細胞塊の埋め込み条件の検

討をウサギ膝軟骨の欠損部位への同種移植実験によって行なっていく予定である。