

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所／特別研究助教]

(前 北海道大学先端生命科学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ベレットカルチャー(細胞塊培養)した。続けて、ベレットカルチャー10日後の細胞塊をバイオリア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, SOX 9, 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日間そのままベレットカルチャーした。その後、培養細胞塊はバイオリアクターを用いて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。