

内 容 要 旨 目 次

主 論 文

Hyaluronan stimulates chondrogenic gene expression in human meniscus cells

(ヒアルロン酸添加による半月板細胞の増殖活性と遺伝子発現)

田中孝明, 古松毅之, 宮澤慎一, 藤井政孝, 井上博登, 児玉有弥, 尾崎敏文

Connective Tissue Research (掲載予定)

平成 28 年 10 月 第 31 回日本整形外科学会学術集会に発表

主 論 文

Hyaluronan stimulates chondrogenic gene expression in human meniscus cells

(ヒアルロン酸添加による半月板細胞の増殖活性と遺伝子発現)

【緒言】

ヒアルロン酸 (hyaluronan, hyaluronic acid, HA) は、N-アセチル-D-グルコサミンと D-グルクロン酸の 2 糖の繰り返し構造からなる線状大分子ポリマーの分子である。HA 分子の 2 糖繰り返しの数は 1 万以上あり、その分子量は 10^3 から 10^4 kDa に及ぶ。HA は様々な組織の細胞外マトリックスの構成分子で、血管新生、分岐形態形成、細胞の移動や分化を含む組織の制御や恒常性維持に重要な役割を担っている。HA は高い保水能力を持ち、細胞の分化や移動を促進する弾性のある網目構造を形成する。HA のいくつかの機能はその物理化学的な性質に由来していると考えられているが、同時に特異的細胞表面レセプターや結合タンパクと結合することにより細胞の挙動を制御する。正常人半月板は 72%の水、22%のコラーゲン、0-8%の glycosaminoglycan、0-12%の DNA で構成されている。ウシ半月板では、HA は半月板 inner 領域で total glycosaminoglycan の 4-5%を、outer 領域で 10%を占めている。HA の軟骨に対する報告や動物の半月板や細胞を用いた報告は散見されるが、ヒト半月板細胞に対する HA の報告は少なくその効果も不明である。本研究では、ヒト半月板細胞の増殖・遊走能における HA 処理の影響を検討した。

HA は変形性膝関節症に対する治療薬として使用されている。変形性膝関節症に対する HA の作用としては軟骨変性抑制、プロテオグリカンの軟骨基質外遊出抑制、軟骨表層被覆保護、関節液正常化、関節可動域の改善及び膝関節痛の軽減、などが知られている。当グループではそれらの細胞生物学的特徴を比較検討してきた。初代培養における inner 細胞の形態は小三角形であり、outer 細胞は細長い形状を呈していた。遺伝子発現においては inner 細胞における II 型コラーゲン (COL2A1)、chondromodulin-I、SRY-type HMG box(SOX)9 の発現が特徴的であった。また両細胞を脂肪細胞系譜へと分化誘導することで脂肪滴の蓄積を認めたが、軟骨細胞分化により軟骨様基質の産生が促進されたのは inner 細胞のみであった。以上より、半月板 inner 領域実質部の細胞は形態・遺伝子発現ともに軟骨細胞様の形質を維持しており、outer 領域に存在する細胞とは明らかに異なる性質を持つと考えられる。動物実験における変形性関節症に対する HA の関節内注入療法は、コラーゲンのリモデリングを促進し半月板の浮腫を抑制するとの報告がある。以上のことから半月板 inner 細胞に対する HA 治療も関節軟骨と同様の反応が見られると考えられる。

半月板の解剖は外 1/3 つまり outer 領域は血管にとんだ組織である。しかしうち 1/3 つまり inner 領域には血管が存在せず半月板治療の成績が悪い原因となっている。以上のことから inner 領域損傷と outer 領域損傷において、HA 添加の効果はそれぞれ異なるのではないかという仮説を立てた。

本研究では器官培養モデルを用いて inner・outer 細胞に対する HA の効果を検討した。また、軟骨様組織に特異的な遺伝子である COL2A1 の発現変化を検討するとともに、inner・outer 領域損傷に対する

HA 添加の影響をそれぞれ解析した。

【材料と方法】

細胞と培養

内側型変形性膝関節症の患者の全人工膝関節置換術施行時に、肉眼的に正常な外側半月板を採取した。患者年齢は、58,61,63,69,71,76 歳 (n = 6) であった。周囲の滑膜組織を注意深く除去した後に半割した。各々コラゲナーゼ処理し、DMEM を用いて分離培養を行った。実際に臨床で用いられている分子量 500-1200 kDa の HA (生化学工業) を用いた。inner・outer 細胞を各種 HA 濃度 (0, 10, 100, and 1000 µg/mL) を含む DMEM 中で 2~7 日間培養した。

Proliferation assay

Inner・outer 細胞を 96-well plates に播種し、12 時間インキュベーターで培養した後に WST-1 assay で細胞増殖活性を計測した。

Migration assay

Boyden chamber を用いて cell migration assay を行った。DMEM と HA(0, 10, 100, and 1000 µg/mL) を lower well に注入した。Upper well には DMEM を注入し、細胞を播種した (5.0×10^3 cells/well)。Upper well と lower well の間には I 型コラーゲンでコーティングされたフィルターを挿入した。Chamber を 4 時間インキュベーターに入れ、フィルターを Diff-Quik で染色した。遊走した細胞を計測し評価した。

RT-PCR, real-time PCR

RNA サンプルは Isogen を用いて培養した細胞から抽出した。ReverTra Ace を用いて逆転写を行い、cDNA は rTag DNA polymerase を用いて増幅させ、RT-PCR は 28-37 サイクル行った。real-time PCR は COL1A1、COL2A1 の遺伝子発現を G3PDH で除して表した。

組織学的評価

手術時に採取した半月板を 1cm 幅に cut し、inner 領域・outer 領域に各々生検パンチで径 2mm の穿通孔を作成し半月板損傷モデルとした。DMEM と HA (0, 1000 µg/mL) で 3 週間培養した。抗 COL1 抗体、抗 COL2 抗体を用いて免疫染色を行った。inner 領域と outer 領域の穿通孔表面と半月板表面の細胞数を 200 µm 毎にカウントし評価した (n=6)。穿通孔表面と半月板表面の隣接した領域 (200 × 200 µm², n=5) の細胞数もカウントし評価した。

統計解析

すべての検討は 3 回以上繰り返し、同様の結果が得られた。グループ間の解析は one-way ANOVA, Holm-Sidak test を用いた。統計的有意差は $P < 0.05$ とした。

【結果】

Inner 細胞・outer 細胞ともに HA の濃度依存性に細胞増殖・細胞遊走が活性化された。また、同様に両細胞ともに細胞遊走が活性化された。

Inner 細胞と outer 細胞ともに HA 添加による COL1A1 の遺伝子発現には影響を与えなかった。一方、COL2A1 の遺伝子発現は inner 細胞において HA 濃度依存性に遺伝子発現の増加を認めたが、outer 細胞では遺伝子発現の増加を認めなかった。

半月板の期間培養モデルでは肉眼的には HA の添加の有無にかかわらず半月板の修復は認めなかった。組織学的には半月板穿孔孔表面では inner 領域・outer 領域ともに HA を添加した群で細胞数の増加を認めた。半月板表層では inner 領域・outer 領域ともに HA を添加しても細胞数の変化を認めなかった。Inner・outer 領域ともに半月板穿孔孔表面の細胞数は平均 5.0 個であった。HA を添加した群では各々 6.4 個と 7.0 個と増加していた。半月板表層では HA を添加による変化は認めなかった。

抗 COL1 染色した半月板は半月板穿孔孔表面と半月板表層ともに HA による影響を受けなかった。それに対して、抗 COL2 染色した半月板では半月板穿孔孔表面では HA を添加することで inner 領域・outer 領域とも染色濃度が増強を認めた。

【考察】

本研究では、半月板を inner 領域と outer 領域に分けて HA の効果を検討した。HA によって inner・outer 細胞ともに細胞増殖・細胞遊走が活性化された。また HA によって inner 細胞における COL2A1 の遺伝子発現は増加した。中田らは半月板細胞が HA の濃度依存性に細胞増殖が活性化すると報告している。伊藤らは HA によって近位尿細管細胞の遊走が活性化すると報告している。我々の研究では inner・outer 細胞ともに HA の濃度依存性に細胞増殖・細胞遊走が活性化された。HA は CD44・RHAMM・ICAM-1 などのレセプターを介し、細胞増殖を促進、細胞遊走と細胞活性を増強させる。本研究ではこれらのレセプターまでの研究は行えていないが、HA に半月板損傷の治癒を促進する可能性が示唆された。

半月板の期間培養モデルでは HA の添加の有無にかかわらず半月板表層の inner・outer 領域ともに細胞数の増加は認めなかった。それに対し、半月板穿孔孔表面では HA を添加することで inner 領域・outer 領域とも細胞数が増加した。Inner 領域の半月板穿孔孔表面の隣接した領域では細胞数の減少を認めた。これは半月板穿孔孔の細胞が増殖したのか、半月板細胞が遊走されたのかは不明である。In vitro において細胞外の HA は CD44 を介して細胞内分解を促進し、細胞遊走と細胞増殖を同時に活性化する。我々の研究では半月板表層と半月板穿孔孔表面はともに高い濃度の HA に暴露されているにもかかわらず、半月板穿孔孔表面の細胞数のみが増加した。以上のことから損傷のようなイベントにより ECM が暴露されることで HA の効果が増強されるのではないかと仮説を立てた。

抗 COL1 染色では半月板穿孔孔表面と半月板表層ともに HA による効果は認めなかった。HA は直接 cytokine-transforming growth factor- β 1-dependent response にリンクする。また、ヒト半月板細胞において Transforming growth factor- β 1 は II 型コラーゲンとアグリカンの合成を促進する。さらに半月板の ECM のコラーゲンの多くは I 型コラーゲンで構成されている。半月板における II 型コラーゲンと I

型コラーゲンの比率は 1 : 9 である。以上のことから、HA が I 型コラーゲン産生に効果がなく、II 型コラーゲン産生を促進することが示唆された。我々の過去の報告で、軟骨細胞において HA が軟骨様組織の遺伝子発現を増強し線維芽様組織の遺伝子を抑制すると報告した。Inner 細胞は軟骨細胞様の形質を維持しており、HA の半月板細胞に対する効果は軟骨に対する効果と同等であると推察する。

本研究の限界は、①分子量が平均 90 万の HA のみの研究であること。②細胞内シグナルの変化を研究していない。③サンプルが高齢であり半月板の変性を完全には除外できていないことである。より健全なサンプル、動物を用いた研究が今後必要である。

【結論】

HA を添加することで半月板 inner・outer 細胞ともに細胞増殖・細胞遊走能が活性化され、inner 細胞における COL2A1 遺伝子発現が増強された。HA が inner 細胞の増殖、遊走能を活性化させ II 型コラーゲン産生を増加させることで、半月板 inner 領域の治癒を促進する可能性が示唆された。