Culture temperature affects redifferentiation and cartilaginous extracellular matrix formation in dedifferentiated human chondrocytes

（培養温度は脱分化したヒト軟骨細胞において再分化と関節軟骨細胞外基質形成に影響を与える）

伊藤明良[1,2], 青山朋樹[3], 飯島弘貴[1], 太治野純一[1], 長井桃子[1], 山口将希[1,2], 張項凱[1], 黒木裕士[1]

[1] 京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻運動機能解析学

[2] 日本学術振興会

[3] 京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻運動機能開発学

（論文内容の要約）

【背景】

関節軟骨は軟骨細胞と細胞外基質（extracellular matrix: ECM）によって構成され、ECM は主にコラーゲンとプロテオグリカンで構成される。関節軟骨は血管や神経を欠き、一度変性が進行してしまうと自己再生は困難であることが広く知られているため、組織工学や培養細胞を用いた再生医療による関節軟骨再生が模索されている[1]。自家培養軟骨細胞移植術（autologous chondrocyte implantation: ACI）は関節軟骨の再生治療の一つとして期待されている[2]。ACI では、採取した軟骨細胞は移植のために生体外で培養する必要があるが、その過程で軟骨細胞特有の形質を失う脱分化が伴うことなどの問題が未だ残されており[3,4]、線維軟骨様の修復を引き起こす要因の一つとして考えられている。そのため、これまで培養軟骨細胞の再分化や ECM の産生を促進するための研究が数多く成されてきたが

[5-8]、温度環境がそれらに与える影響については未だ不明であった。温度は全ての生物にとって重要な因子であるが、四肢など体幹部から離れた部位では外部温度の影響を受け、ヒト膝関節内温度も 32℃付近であることが報告されている [9,10]。このことは、関節軟骨は生体内において深部体温と比較すると低温環境に暴露されていることを示唆し、再生治療によって移植された細胞も同様の環境におかれることが想定される。また、軟骨細胞に関する多くの in vitro 研究においては、37℃の培養温度を採用しており、生体内の温度環境を反映した結果ではないことが危惧される。さらに、間欠的な温熱刺激で用いられるような高温環境（41℃）がもたらす影響も未だ不明である。したがって、本研究の目的は脱分化したヒト軟骨細胞を用いて、異なる培養温度が再分化と ECM 形成に与える影響を明らかにすることとした。

【方法】

ヒト軟骨細胞は、62 歳女性および 89 歳女性の股関節形成術時に摘出された大腿骨頭の関節軟骨より摘出した。なお、本研究は京都大学医の倫理委員会の承認を得て実施し、対象者には本研究の主旨を書面および口頭で説明し、書面にて同意を得た。摘出した軟骨細胞は、脱分化させるために培養皿上で 2～3 継代培養した。脱分化した軟骨細胞は、ペレット培養法にて以下の 3 つの温度条件下で三次元培養された。温度条件は、関節内温度付近である 32℃、深部体温付近である 37℃、哺乳動物細胞の生存閾値温度付近である 41℃の 3 条件とした。再分化および ECM 形成能は、生成されたペレットの湿重量測定、遺伝子発現解析、組織学的観察、走査型電子顕微鏡を用いた超微細構造観察、そして glycosaminoglycan (GAG)および DNA 定量による生化学的解析を用いて評価した。湿重量測定は、ペレット培養 3 日、7 日、14 日および 21 日後に計測した。遺伝子発現解析は、ペレット培養 3 日および 7 日後にサンプルを回収し、リアルタイム PCR にて定量した。標的遺

伝子は、軟骨形成マーカーであるII型コラーゲン（Col2a1）、アグリカン（ACAN）および軟骨オリゴマー基質蛋白質（COMP）と、線維軟骨マーカーであるⅠ型コラーゲン（Col1a1）を対象とした。内部標準化遺伝子として、異なる温度環境でも頑強なribosomal protein L13a（RPL13a）とtyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein（YWHAZ）を用いた[11]。組織学的観察では、ペレット培養7日、14日および21日後にサンプルを回収し、組織切片を作成した。プロテオグリカンの堆積を検出するためにサフラニン O/ファストグリーン染色を、コラーゲン線維の配向性検出のためにはピクロシリウスレッド染色を用いた。II型コラーゲンおよびI型コラーゲンの検出は、免疫組織化学的手法を用いた。走査型電子顕微鏡による超微細構造観察は、ペレット培養21日後にサンプルを回収し、ペレットの表面とその割断面を観察した。生化学的解析は、ペレット培養14日および21日後にサンプルを回収し、GAG定量には1,9-dimethylmethylen blue colorimetric methodを、DNA定量にはQuant-iT™ PicoGreen® assayを用いた。

【結果】

湿重量は41℃で顕著に少なく、実験期間を通して増加しなかった。32℃と37℃を比較すると、37℃の方が培養14日後から有意に重くなった。遺伝子発現解析では、関節軟骨の主要コラーゲンであるII型コラーゲンの遺伝子発現は37℃で最も促進されたが、脱分化を示唆するI型コラーゲンの遺伝子発現は32℃と37℃間の比較では有意な差は認められなかった。一方で、41℃では解析した全ての遺伝子発現が他の温度よりも有意に抑制されていた。組織学的および生化学的解析では、37℃においてⅡ型コラーゲンおよびプロテオグリカンの産生が最も認められたが、41℃ではそれらの産生が著しく抑制されていた。DNA量は培養14日後から41℃で有意に少なく、培養21日後では温度が高い程DNA量が少なかった。走査型電子顕微鏡による観察では、32℃および37℃では平らで滑らかな表面構造と、密で

層状のコラーゲン線維構造が表層に観察されたが、41℃ではほとんど認められなかった。

【考察】

本研究により、培養温度は脱分化した軟骨細胞の再分化および ECM 形成に影響を与えることが初めて明らかとなった。41℃という高温環境では、細胞数の減少および ECM 関連遺伝子の発現抑制が生じ、その結果、著しく ECM 形成が阻害されたと考えられた。さらに、40℃程度の温度環境ではコラーゲンの三重鎖高次構造の形成が阻害されることが報告されていることから[12]、本研究においても 41℃環境ではコラーゲンの高次構造形成が阻害されたことの関与が想定された。32℃と 37℃を比較すると、37℃の方が II 型コラーゲンおよびプロテオグリカンの産生がより認められた。したがって、37℃でより再分化が促進され、硝子軟骨様の ECM 形成に作用したと考えられた。これらのことは、臨床において移植された軟骨細胞が関節内の温度環境に影響を受け得ることを示唆し、さらに関節内を 37℃程度に制御することで、関節軟骨再生を促進し得る可能性を示唆するものである。

【結論】

本研究条件において、深部体温付近である 37℃環境は、関節内温度付近である 32℃環境よりも脱分化した軟骨細胞の再分化および ECM 形成を促進させ得ることを示唆し、さらに 41℃環境では著しく阻害されることが明らかとなった。温度環境を調整することは、軟骨細胞の形質や生合成を制御する有用な手段と考えられた。

References

1. Mollon B, Kandel R, Chahal J, et al. 2013. The clinical status of cartilage tissue regeneration in humans. Osteoarthritis Cartilage 21: 1824–1833.
2. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, et al. 1994. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N Engl J Med 331: 889–895.
3. von der Mark K, Gauss V, von der Mark H, et al. 1977. Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. Nature 267: 531–532.
4. Tekari A, Luginbuehl R, Hofstetter W, et al. 2014. Chondrocytes expressing intracellular collagen type II enter the cell cycle and co-express collagen type I in monolayer culture. J Orthop Res 32: 1503–1511.
5. Freyria AM, Mallein-Gerin F. 2012. Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: the indisputable role of growth factors. Injury 43: 259–265.
6. Mouw JK, Case ND, Guldberg RE, et al. 2005. Variations in matrix composition and GAG fine structure among scaffolds for cartilage tissue engineering. Osteoarthritis Cartilage 13: 828–836.
7. Domm C, Schunke M, Christesen K, et al. 2002. Redifferentiation of dedifferentiated bovine articular chondrocytes in alginate culture under low oxygen tension. Osteoarthritis Cartilage 10: 13–22.
8. Elder SH, Sanders SW, McCulley WR, et al. 2006. Chondrocyte response to cyclic hydrostatic pressure in alginate versus pellet culture. J Orthop Res 24: 740–747.
9. Oosterveld FG, Rasker JJ. 1994. Treating arthritis with locally applied heat or cold. Semin Arthritis Rheum 24: 82–90.

10. Sánchez-Inchausti G, Vaquero-Martin J, Vidal-Fernández C. 2005. Effect of arthroscopy and continuous cryotherapy on the intra-articular temperature of the knee. Arthroscopy 21: 552–556.

11. Ito A, Aoyama T, Tajino J, et al. 2014. Evaluation of reference genes for human chondrocytes cultured in several different thermal environments. Int J Hyperthermia 30: 210–216.

12. Peltonen L, Palotie A, Hayashi T, et al. 1980. Thermal stability of type I and type III procollagens from normal human fibroblasts and from a patient with osteogenesis imperfecta. Proc Natl Acad Sci USA 77: 162–166.