

調製自家血清 (Cytokine Rich Autologous Serum, CRAS) システムを導入したヒト耳介形状軟骨の再生誘導

中川由美子

近畿大学医学部形成外科学教室

抄 録

組織再生に用いられる動物血清は、感染性因子の混入のリスクが高い。人に投与された場合、重篤な感染症(例えば、狂牛病)を引き起こす可能性があり、再生医療における安全性が損なわれるという問題点が指摘されている。そこで、本研究では、細胞増殖因子を含有する調製自家血清 (Cytokine Rich Autologous Serum, CRAS) システムを導入して軟骨細胞を培養し、新生軟骨組織の再生誘導における有用性を検討した。【方法】実験1: 血清中細胞増殖因子量 (PDGF-BB, TGF- β , b-FGF) を ELISA 法を用いて比較検討した。実験2 (in vitro study): イヌ耳介軟骨細胞を培養し、細胞増殖能、細胞形状および分子生物学的に検討した。実験3 (in vivo study): イヌ耳介軟骨細胞をヒト耳介形状を有する生分解性ポリマーに播種・培養した。その後、ヌードマウス皮下に移植し、移植後10週および20週目に再生軟骨を採取し、組織学的および免疫組織学的に検討した。【結果】実験1より、TGF- β 量は、CRAS群において有意に高値を示した。また、b-FGF量は、仔牛胎児血清群において有意に高値を示したが、いずれの群も、細胞増殖に有効な濃度に達してはいなかった。実験2より、仔牛胎児血清群に比較して、CRAS群およびb-FGF添加CRAS群の細胞増殖能が高いことが判明した。また、アグリカンおよびII型コラーゲン合成能は、b-FGF添加CRAS群において最も高い発現が認められた。実験3より、いずれの群においても、耳介の三次元形態は良好に維持されていた。また、軟骨組織の基本構造(軟骨、軟骨膜、新生血管)も再生されていた。特に、軟骨再生は、b-FGF添加CRAS群において最も促進していた。【結論】軟骨再生は、調製自家血清に含まれる細胞増殖因子とb-FGFの両方の作用を受けた場合、最も促進した軟骨細胞の増殖・分化が認められた。また、本法を用いた調製自家血清は、仔牛胎児血清の代用となり得ることが明らかになった。

Key words: 調製自家血清システム, 細胞増殖因子, 耳介軟骨

緒 言

1997年, Cao ら¹ は、ヒト耳介形状を有する生分解性ポリマー (poly glycolic/poly lactic acid, PGA/PLA) に培養仔牛関節軟骨細胞を播種して細胞・ポリマー複合体を作成し、これをヌードマウス皮下に移植して耳介特有の形態を有する軟骨組織を再生した。また、2003年, Kamil, Eavey ら² は in vitro の三次元培養条件下に、培養関節軟骨細胞と生分解性ポリマー (PGA/PLA) から耳介形状軟骨組織を再生した。さらに2004年, Isogai, Landis ら³ は細胞接着性、伸縮性、物理的強度を考慮した吸収性足場 (poly (L-lactide- ϵ -caprolactone), P (LA/CL 50:50)) を使用して、これまで困難とされてきた耳介軟骨の長期的形態維持を可能とする結果を得た。同年,

Shieh ら⁴ は、種々のポリマー (PGA, PCL, poly(4-hydroxybutyric acid), P-4HB) を用いて、再生耳介軟骨を比較検討した。これらの実験結果から、in vivo 環境下において、臨床的に必要な大きさと複雑な三次元形態を長期的に維持する耳介軟骨の再生が可能な状況となりつつある。

一方、耳介軟骨の再生技術をヒトに臨床応用する上で、培地内に添加する血清の感染性が近年大きな問題として指摘されている⁵。血清は、通常、仔牛胎児血清が使われる。しかし、仔牛胎児血清には、異種血清に起因する感染症やたんぱく質混入による免疫反応の危険性が不可避な問題となっている。このため、Bottenstein ら⁶ は、血清の主な役割は成長因子の供給にあると考え、基礎培地に細胞増殖因子を含有させた無血清培地を開発した。現在、軟骨細胞

の培養には、無血清培地に IGF-1, TGF- β , FGF-2 などの細胞増殖因子を添加したものが一般的に使用されつつある⁷。しかし、培養初期の24時間は、仔牛胎児血清による刺激が必須⁸であり、仔牛胎児血清を完全に除外し得た軟骨細胞培養法は未だ確立されていない。

そこで本研究では、まず細胞増殖因子を豊富に含む血小板に着目し、血小板中のさまざまな細胞増殖因子を血清内に遊離させた調製自家血清を作成した。次に、この調製自家血清が、軟骨細胞の増殖・分化を促進させ、仔牛胎児血清の代用として使用することが可能か否かについて検討した。

方 法

実験動物

実験動物は、BALB/c AJc1 ノードマウス(4~6週齢, 雄, 36匹, 日本クレア株式会社, 静岡)を用いた。飼育は、クリーンラック内で室温22°C, 湿度50%, 12時間明暗サイクルの条件下に行った。飼料は、放射線(3 mG)にて滅菌された固形飼料(CL-2, 日本クレア株式会社, 静岡)を与え、また、飲料用水道水は制限なく与えた。

実験方法

1. 調製自家血清システムと調整自家血清(Cytokine Rich Autologous Serum, CRAS)の分離(図1)

採血時には、ガラスビーズ(ϕ 4 mm \times 5個)入り血清分離用採血バッグ(株式会社ジェイ・エム・エス, 広島)を用いた。血液がガラスビーズに接触する際、ガラスビーズ表面の陰性荷電によって、まず血漿たんぱくが吸着する。次に、この吸着たんぱくに血小板が粘着・凝集し、さらに振動されることによってずり応力が働き、刺激された血小板が活性化される。活性化された血小板は α 顆粒より血清内にさまざまな細胞増殖因子を放出する⁹。本法を用い

て、細胞増殖因子を含有する調製自家血清(Cytokine Rich Autologous Serum, CRAS)を採取した。

実験では、ネプタールによる静脈麻酔下に、イヌ(12~16週齢, 雌, ビーグル, 6頭)の大腿動脈から18G翼状針つき血清分離用採血バッグを用いて300 ml採血した。採血バッグをシェーカーに乗せ、室温にて1時間振動(30 rpm/min)させた後、遠心分離(4°C, 3,000 rpm, 10分)して上清を分離した。分離した上清は、血清分離板(テルモ, 東京)を用いて付属バッグに移し、細胞増殖因子を含有するCRASを分離した。

2. ELISA法を用いた血清内細胞増殖因子の定量的評価

再生誘導に関与する細胞増殖因子の中で、特に、PDGF-BB, TGF- β , b-FGFを選択してELISA法を用いた定量評価を行った¹⁰⁻¹⁴。実験群として、仔牛胎児血清(fetal bovine serum, FBS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), CRASおよび本システムを用いない自家血清(autologous serum, AS)の3群を作成し、各々の群における血清内細胞増殖因子量を比較検討した。PDGF-BB, TGF- β 1, b-FGFの定量には、市販ELISAキット(Quantikine R&D systems, Minneapolis, USA)を用いた。

統計学的処理では、まず平均値(mean)と標準偏差(SD)を算出した。分散検定はKruskal-Wallis testを行い、続いてScheffe's F testによる多重比較検定を用いて統計学的有意差を検討した。

3. 各種血清が軟骨細胞の増殖・分化に及ぼす影響(図2-A)

ネプタールによる静脈麻酔下に、イヌ耳介を基部で切断した。耳介から皮膚, 皮下組織, 筋肉, 軟骨膜を除去し、耳介軟骨を無菌的に採取した。Klagsbrunの方法¹⁵に準じて、採取軟骨は、5 \times 5 mmの大きさに細切し、0.3%コラゲナーゼ(collagenase

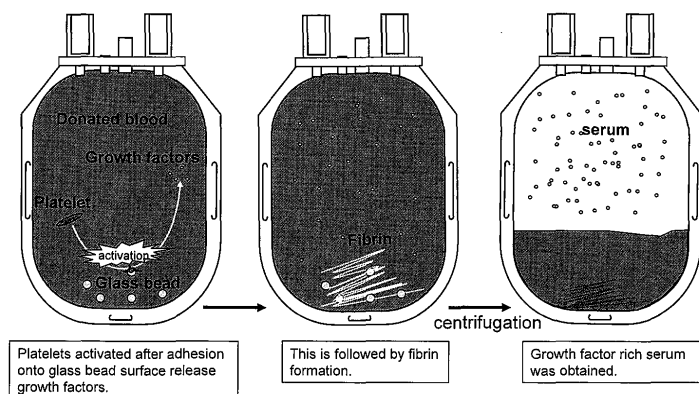


図1 調製自家血清システム
ガラスビーズ入り血清分離用採血バッグを用いた。まず、ガラスビーズ表面の陰性荷電によって血漿たんぱくが吸着し、次に血小板が粘着・凝集し、活性化される。活性化血小板は、血清中にさまざまな細胞増殖因子を放出する。

type II, Worthington, Lakewood, NJ) にて酵素処理 (37°C, 12時間) した. ナイロンメッシュ (pore size: 300 μm) にてろ過した後, 10% FBS を含む F-12 培養液 (Ham's F-12, Gibco, Grand Island, NY) を加えて酵素反応を停止させた. 細胞浮遊液は, Ca^{++} , Mg^{++} 不含リン酸緩衝液 (10X-PBS(-), Dulbecco's phosphate-buffered saline, Gibco, Grand Island, NY) を用いて 3 回洗浄・遠心 (4°C, 2,000 rpm, 10分) した. 細胞数は, 色素排除法に順じて, 0.4% トリパンプルー液 (Gibco, Grand Island, NY) を用いて染色した後, 倒立顕微鏡 (Model TMS, Nikon, 東京) を用いて血球計算盤上の細胞数を算定した.

次に, 軟骨細胞を 0.5×10^6 /皿の初期濃度にて培養した. 培地は, あらかじめ調製した培地 (F-12, アスコルビン酸 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ペニシリン (100 units/ml)) に (1) FBS, (2) CRAS, もしくは (3) b-FGF (10 ng/ml) を添加した CRAS の 3 群を, それぞれ 10% の濃度で添加した. 培地交換は週 2 回行った. 培養開始後, 1 週, 2 週, 4 週目における細胞数および PCR を用いた軟骨マーカー (アグリカン, II 型コラーゲン) の遺伝子発現を検討した.

細胞増殖能の検討では, 各実験群ごとに 0.1% EDTA 入り 0.25% トリプシン (Gibco, Grand Island, NY) 処理し, 得られた培養細胞を色素排除法にて算定し, 比較した. また, 培養軟骨細胞を 10% ホルマリンにて固定した後, トリパンプルー染色を行い, 倒立顕微鏡を用いて培養細胞の形態を評価した.

次に, RT-PCR を用いた培養軟骨細胞の遺伝子発現を検討した. 培養皿に ISOGEN® (和光純薬, 大阪) を 1 ml 加え, スクレイパーにて培養軟骨細胞を採取した. これに 0.2 ml の chloroform を加えて 15 秒攪拌・3 分静置 (室温) 後, 遠心 (4°C, 12,000 rpm, 15分) し, 上層を抽出した. さらに, 0.5 ml の isopropanol を加えて 10 分静置 (室温) 後, 遠心分離し

た (4°C, 12,000 rpm, 10分).

得られた沈殿に, 70% ethanol を 1 ml 加えて洗浄した. 70% ethanol を除去し, 15 分間自然乾燥させ, RNA を抽出した. これを蒸留水 (deionized sterile 0.5 M EDTA (pH 8.0), 和光純薬, 大阪) に溶解した. 260 nm での吸光度をもとに吸光度計 (U-300 Spectrophotometer, 日立, 東京) を用いて, RNA 濃度を測定した. RT-PCR は, RT-PCR kit (タカラバイオ株式会社, 滋賀) を用いた. 抽出した RNA (500 ng/ μl) 1 μl に, MgCl_2 (2 μl), 10 \times RT buffer (1 μl), RNase Free dH₂O (3.75 μl), dNTP Mixture (1 μl), RNase Inhibitor (0.25 μl), Reverse Transcriptase (0.5 μl), Oligo dT-Adaptor Primer (0.5 μl) を加えて, 総量 10 μl に調製した. サーマルサイクラー (T3 thermocycler, Biometra, Göttingen, Germany) の条件は, 30°C で 10 分間, 50°C で 30 分間, 95°C で 2 分間, 5°C で 5 分間を 1 サイクルで逆転写反応を行った. 次に, 反応液に 5 \times PCR Buffer (10 μl), 滅菌水 (28.75 μl), TaKaRa Ex Taq HSTM (0.25 μl), および, sense primer と antisense primer (20 μM , 0.5 μl) を加えて, 総量 40 μl に調製した. サーマルサイクラーの条件は, PCR 初期活性化ステップが 94°C で 2 分, さらに, 3 ステップのサイクリング (変性は 94°C で 30 秒, アニールリングは primer ごとに II 型コラーゲンが 52°C, アグリカンと GAPDH が 62°C で 30 秒, 伸長反応は 72°C で 40 秒) を 32 サイクル, 最終伸長反応を 72°C で 5 分とした. primer は, アグリカンが sense primer: 5'-AGGCAACCTCCTAGGCGTGC-3', antisense primer: 5'-CTTCTCGGGCTCCGGGACAA-3', II 型コラーゲンが sense primer: 5'-GACATAATCTGTGAAGACATG-3', antisense primer: 5'-GCGCCTTTTTTCACCTTTGT-3', GAPDH が sense primer: 5'-CCTGGTCACCAGGGCTGCTT-3', antisense primer: 5'-GGAGCAGAGATGATGACCCTC-3' に, 設計して使用した (北海道

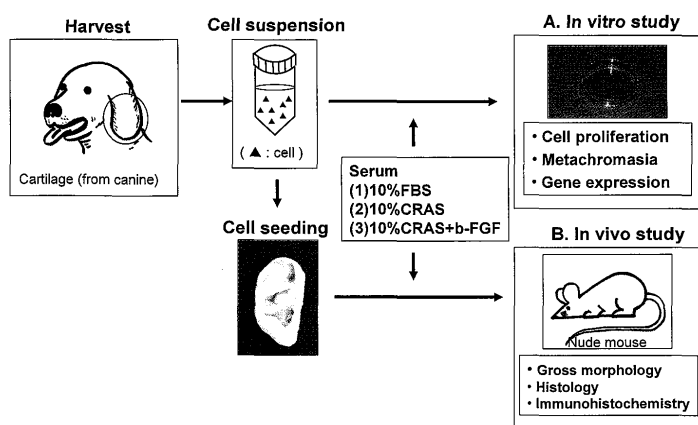


図 2 実験プロトコール

システム・サイエンス株式会社, 北海道). PCR 産物を, エチジウムブロマイド含有アガロースゲルのウェルにいれ, 電気泳動(100 V, 20分, Mupid ミニゲル泳動槽, アドバンス, 東京)を行い, バンドを検出した(Gel Doc 2,000, 日本バイオラッド, 東京).

4. ヒト耳介形状軟骨の再生 (図 2-B)

生分解性ポリマーの作成には, あらかじめ作成したヒト耳介の鋳型(1歳女児より採型, 32×20 mm)に, ポリマー溶液(5% (w/w) 1,4-dioxane および poly L-lactide (PLLA)/poly ε-caprolactone (PCL), P(LA/CL 50:50))を泡立てないように駒込ピペットにて注入した. 溶液を注入した鋳型を-40°Cの冷凍庫へ移し, 1時間静置した. ポリマーを鋳型より取り出し, 40 Pa, -40°C, 12時間の条件下に凍結乾燥(TF10-80ATA, 宝製作所, 東京)処理した. 最後に, 真空乾燥(60°C, 12時間)にてモノマーおよび溶媒除去を行い, ヒト耳介形状を有する三次元生分解性ポリマー(P(LA/CL 50:50))を作成した.

次に, ヒト耳介形状を有するポリマーにイヌ耳介軟骨細胞を播種し, 軟骨細胞・ポリマー複合体を作成した. 軟骨細胞の播種濃度は, 100×10⁶個/mlに調節し, ピペットにてポリマーに播種した. 細胞・ポリマー複合体は, インキュベーター内(37°C, 5% CO₂)に4時間静置して細胞をポリマー表面に接着させた. その後, 調製培地(F-12, アスコルビン酸50 μg/ml, ペニシリン100 units/ml)に(1)10% FBS, (2)10% CRAS, (3)b-FGF(10 ng/ml)を添加した10% CRASの3群に分けて, それぞれを rotating bioreactor (roller apparatus, Wheaton, NJ)を用いて回転培養(2 rpm, 37°C, 5% CO₂, 1週間)した. 培養液の交換は週2回行った. 回転培養後, 細胞・ポリマー複合体をヌードマウス皮下に移植した. エーテル吸入による深麻酔下に, ニードマウス背部に約2 cmの切開を入れた. 皮下を剝離して形成したポケット内に細胞・ポリマー複合体を挿入し, 5-0ナイロン縫合糸(シグマ, 東京)を用いて閉創し

た. 移植後10週および20週目に, 細胞・ポリマー複合体を摘出し, 組織学的検討を行った. 摘出組織は, 10%ホルマリンにて浸漬固定し, エタノール系列により脱水した後, パラフィン切片(厚さ4 μm)を作成した. 染色は, プロテオグリカンを調べるため safranin O 染色, 弾性線維の有無を確認するために Verhoeff 染色を施行した. また, 軟骨膜, 軟骨および血管の評価を行うために, I型コラーゲン, II型コラーゲン, 第8因子関連抗原(von Willebrand Factor, vWF)の免疫染色を行ない軟骨膜, 再生軟骨および栄養血管系について検討した.

結 果

ELISA法を用いた血清内細胞増殖因子の定量的評価

FBS群, CRAS群およびAS群における細胞増殖因子量を検討した. その結果, いずれの群においても, PDGF-BB量に有意差は認められなかった. 一方, TGF-β量は, CRAS群において有意に高値を示した. また, b-FGF量は, FBS群において有意に高値(24.9 pg/ml)を示したが, 細胞増殖に有効な濃度(5 ng/ml)¹⁶に達してはいなかった(表1).

各種血清が軟骨細胞の増殖・分化に及ぼす影響

FBS群, CRAS群, およびb-FGFを添加したCRAS群における細胞増殖能を検討した. その結果, いずれの群においても, 軟骨細胞は経時的に増殖した. 培養4週目の細胞数は, FBS群において4×10⁶/皿に達した. 一方, CRAS群における細胞数は, FBS群の約2倍を示した. また, b-FGF添加CRAS群では, FBS群の約3倍の細胞数が認められた(図3). この結果より, CRAS群およびb-FGF添加CRAS群においては, FBS群と比較して著明に軟骨細胞が増殖することが判明した.

倒立顕微鏡にて細胞形態の検討を行った. 播種直後の培養軟骨細胞は, やや細長く線維芽細胞様を呈した. その後, コンフルエント(b-FGF添加CRAS群は培養2週目, FBS群およびCRAS群は培養3

表1 仔牛胎児血清(FBS)および調製自家血清(CRAS)における各種の細胞増殖因子の定量

		Fetal Bovine Serum (FBS)	Cytokine Rich Autologous Serum (CRAS)	Autologous Serum (AS)
PDGF-BB	(pg/ml)	750.8±164.1	944.5±336.4	1342.1±137.8
TGF-β	(ng/ml)	22.4±6.7	49.6±4.3*	25.6±3.9
b-FGF	(pg/ml)	24.9±5.1*	14.5±1.4	n.d.

Values are expressed as mean ±SE (n=6).

*Significant differences at p<0.05.

週目)に達すると、軟骨細胞特有の多角形を呈した。一方、軟骨細胞は分化すると、プロテオグリカン合成が盛んとなり、著明なメタクロマジーを示す。今回の結果では、CRAS 群、および b-FGF 添加 CRAS 群では培養 3 週目、FBS 群では培養 4 週目に、著明なメタクロマジーの増強を認めた。これらの結果より、TGF- β および b-FGF は軟骨の増殖・分化に促進的に作用し、特に、b-FGF は初期の軟骨細胞の増殖に強く作用することが判明した (図 4)。

RT-PCR を用いて、軟骨マーカーであるアグリカンおよび II 型コラーゲンの mRNA 発現を検討した。その結果、FBS 群および CRAS 群では、アグリカンおよび II 型コラーゲンの mRNA 発現は経時的に増強される傾向を示した。また、b-FGF 添加 CRAS 群では、アグリカンおよび II 型コラーゲンはさらに強い発現の増強を示した。これらの結果より、

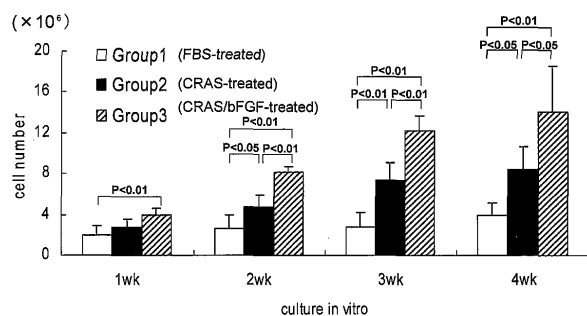
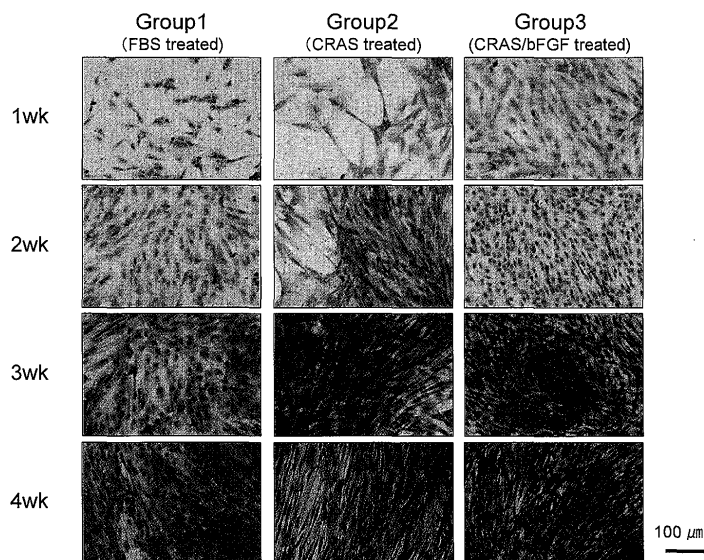


図 3 細胞数の変動
FBS 群、CRAS 群、および b-FGF 添加 CRAS 群における細胞増殖能を検討した。その結果、すべての群において軟骨細胞は経時的に増殖した。また、CRAS 群および b-FGF 添加 CRAS 群においては、FBS 群と比較して著明な細胞増殖能を示した。グラフの値は、平均値±標準誤差で示す (n=6)。



b-FGF 添加 CRAS 群が、最も軟骨細胞の増殖・分化を促進することが軟骨マーカーであるアグリカンおよび II 型コラーゲンの遺伝子発現を亢進することが判明した (図 5)。

各種血清がヒト耳介形状軟骨の再生誘導に及ぼす影響

FBS 群、CRAS 群、および b-FGF 添加 CRAS 群において、耳介形状の複雑な立体構造の再現性を肉眼的に評価した。その結果、いずれの群においても、細胞・ポリマー複合体は白く光沢のある外観を呈した。また、耳輪・対耳輪の突出部および舟状窩・三角窩・耳甲介の陥凹部などの耳介形状の特徴は、いずれにおいても、長期にわたり比較的良好に維持されていた (図 6)。

Safranin O 染色を用いて、ヒト耳介形状軟骨におけるプロテオグリカン産生の局在を検討した (図 7)。その結果、FBS 群および CRAS 群では、移植

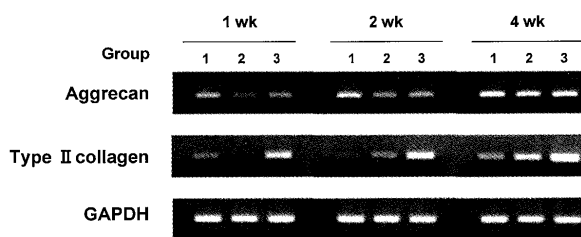


図 5 RT-PCR
RT-PCR を用いて、アグリカンおよび II 型コラーゲンの遺伝子発現を検討した。その結果、FBS 群および CRAS 群では、アグリカンおよび II 型コラーゲンの遺伝子発現は経時的に増強される傾向を認めた。また、b-FGF 添加 CRAS 群では、アグリカンおよび II 型コラーゲンともにさらに強い発現の増強を示した。

図 4 位相差顕微鏡を用いた培養軟骨細胞の経時的形状変化

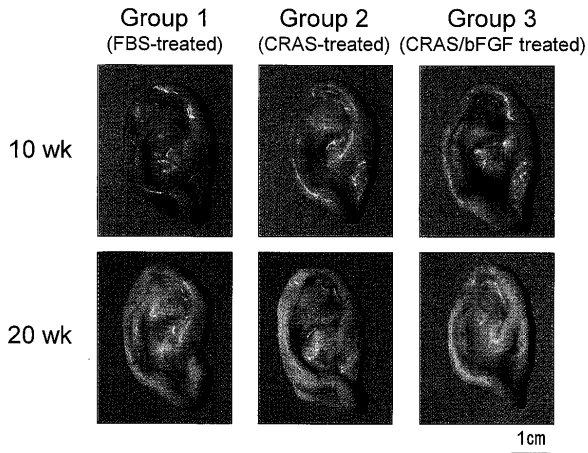


図6 再生ヒト耳介形状軟骨の肉眼所見

10週目において、特に複合体の皮膚側に不均一な弱い染色性を示し、部分的に軟骨再生が認められた。移植20週目では、複合体の辺縁部全体に染色陽性領域を示し、軟骨再生は複合体周囲に限局して生じていた。一方、b-FGF添加CRAS群では、移植10週目より複合体辺縁部全体に強い染色性を示し、移植20週目には、複合体の染色陽性領域が、複合体の内部に拡大した。この結果より、軟骨再生は、b-FGF添加CRAS群において最も促進していることが判明した(図8)。

さらに、Verhoeff染色を用いて、再生軟骨組織内の弾性線維の形成を検討した(図9)。その結果、FBS群およびCRAS群では、移植10週目において、

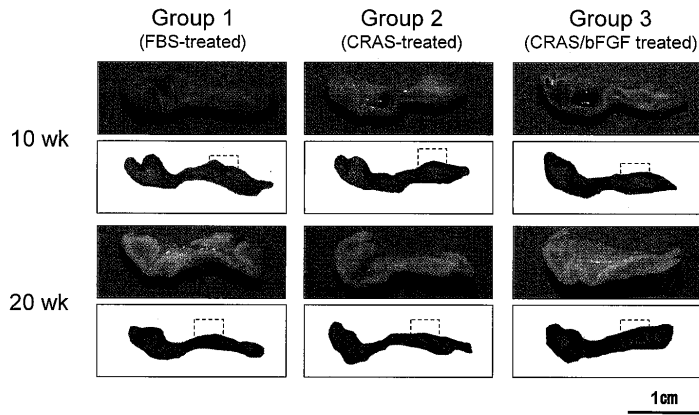


図7 移植後10週および20週における再生軟骨の断面像(上段)および組織像(Safranin O染色, 下段)

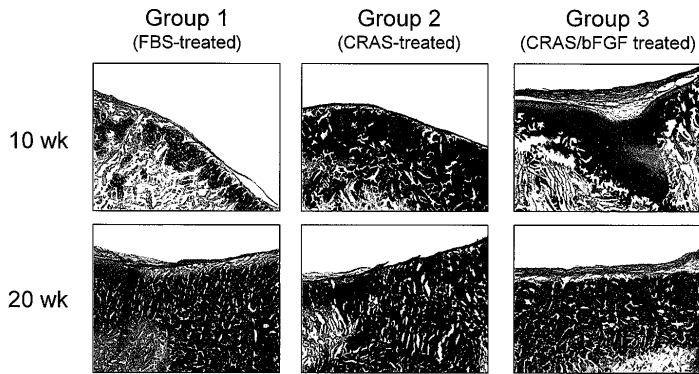


図8 再生軟骨組織の拡大像。図7の拡大組織所見

FBS群およびCRAS群では、移植10週目において、複合体の皮膚側に不均一な弱い染色性を示し、移植20週目では、複合体の辺縁部全体に染色陽性領域を示した。一方、b-FGF添加CRAS群では、移植10週目より複合体辺縁部全体に強い染色性を示し、移植20週目には、複合体の内部に染色陽性領域が拡大した(Safranin O染色, 40×)。

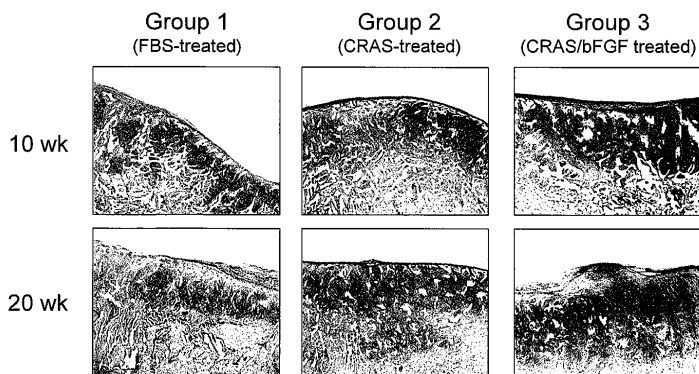


図9 再生軟骨組織における弾性線維

FBS群およびCRAS群では、移植10週目において、弾性線維の形成は認められなかった。一方、b-FGF添加CRAS群では、移植10週目より複合体辺縁部に弾性線維の形成を認めた。移植20週目では、いずれの群においても、網状構造を呈した弾性線維の形成を認めた(Verhoeff弾性線維染色, 40×)。

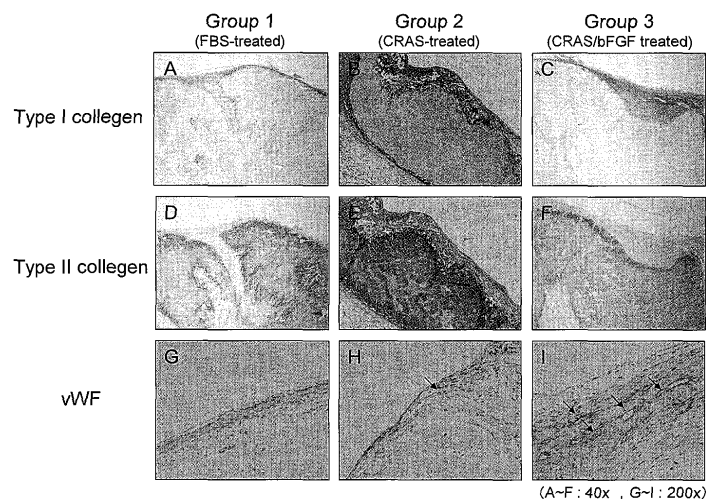


図10 I・II型コラーゲンおよび第8因子関連抗原を用いた免疫染色所見
 いずれの群においても、再生軟骨周囲には、I型コラーゲンに対して陽性に染色される軟骨膜様組織の形成が認められた。また、新生血管の形成は、FBS群では軟骨の外側にわずかに認められた。一方、CRAS群およびb-FGF添加CRAS群では、軟骨膜の外側に数多く認められた。矢印(H, I)は再生ヒト形状軟骨周囲の血管網を示す。(A~F: 40×, G~I: 200×)。

弾性線維に対する陽性反応は認められなかった。一方、b-FGF添加CRAS群では、移植10週目より複合体辺縁部全体に強い陽性反応を示した。移植20週目では、いずれの群においても、軟骨膜に連続する弾性線維が網状構造を形成し、軟骨組織全体に広がっている像が観察された。

I型コラーゲン、II型コラーゲン、第8因子関連抗原(von Willebrand Factor, vWF)の免疫染色を行い、移植20週目における軟骨膜、再生軟骨、新生血管について検討した。その結果、いずれの群においても再生軟骨組織の周囲には、I型コラーゲンに対して陽性に染色される軟骨膜様組織の形成が認められた。また、軟骨再生を支える新生血管の形成は、FBS群では軟骨の外側にわずかに認められた。一方、CRAS群およびb-FGF添加CRAS群では、軟骨膜の外側に新生血管が数多く認められた。特に、b-FGF添加CRAS群では、比較的径の大きい血管が密に分布していた(図10)。

これらの結果より、いずれの群においても、軟骨膜様組織は再生され、軟骨組織の基本構造(軟骨、軟骨膜、新生血管)が再生されていることが示唆された。また、CRAS群では、軟骨細胞増殖が促進していることが判明した。さらに、b-FGFがCRAS群に添加された場合、軟骨組織、軟骨膜様組織、新生血管の再生誘導が著しく加速されることが判明した。

考 察

細胞培養では、一般的に細胞の成長に必須とされるたんぱく質や、種々の生理的活性物質を含むウシやウマなどの動物由来の血清を加える。このため、培養組織をヒトに移植する場合、動物由来たんぱく質、あるいは未知の病原体混入の可能性が生じる。

各種細胞に対して無血清培地が開発されている一方で、細胞の初期培養に仔牛胎児血清が用いられ、狂牛病の発生を招くことが問題となっている。しかし、動物由来血清を用いずに細胞増殖・分化を確実に誘導する方法はこれまで確立されていない。

軟骨細胞の増殖・分化機構には、多様な細胞増殖因子が関わっていることが報告されている。未分化細胞にはa-FGFやb-FGFを含む複数のFGFサブタイプが発現していて、未分化細胞の旺盛な増殖に関与している¹⁷。未分化細胞は増殖したあと、細胞凝集領域を作る。この凝集領域内には、軟骨前駆細胞が出現し、新生軟骨組織の基盤が形成される。この軟骨分化の過程にはIGF-1やTGF- β が深く関わっている¹⁸。さらに、BMPが、凝集領域内の軟骨前駆細胞に作用して、軟骨細胞へ分化誘導する結果、軟骨再生が生じる¹⁹。このことは、関節軟骨の欠損モデルを用いたin vivoの実験においても明らかにされており、軟骨欠損部には、in vitro同様に、b-FGF, IGF, BMPの順に細胞増殖因子が発現されることが知られている²⁰。本実験に用いた調製自家血清システムを用いる場合、細胞増殖因子(主に、TGF- β)を大量に含む自家血清を容易に調製できることが判明した。遺伝子工学的的手法により調製された細胞増殖因子をこの調製自家血清に補って投与すれば、仔牛胎児血清を使用する必要はなくなり、異種動物由来たんぱく質や感染症の危険性を回避することが可能となることが予測される。

軟骨形成を誘導する上で重要な細胞増殖因子としては、これまでFGF, IGF, TGF- β , およびBMPが知られている。この中で、特に、b-FGFとTGF- β は軟骨細胞の増殖・分化に必要な細胞増殖因子であることがすでに報告されている²¹⁻²⁴。FGFは、1974年、脳下垂体に線維芽細胞の増殖を促進する

因子として発見され²⁵,その後,血管内皮細胞の増殖作用を有することが報告された。FGFは,分子量約1.7万の単鎖ポリペプチドで,軟骨および骨に高濃度含まれる。等電点の異なる2種類(basic FGFとacidic FGF)があり,一般にはb-FGFの方が生物学的活性が高いことが知られている。また,b-FGFは,in vitroにおいて間葉系幹細胞に対して分化能を維持しながら,強力な細胞増殖効果を発揮することが知られている^{26,27}。培養軟骨細胞を用いた報告によると,b-FGFは,II型コラーゲンを発現する軟骨細胞の増殖を²⁸一方で,X型コラーゲンを発現する肥大化軟骨細胞への分化²⁸や肥大化軟骨細胞の石灰化を抑制することが判明している²⁹。また,in vivoでも同様の現象が報告されている³⁰。さらに,b-FGFによる軟骨細胞の増殖促進効果は細胞増殖期に最も高く,分化段階の異なる軟骨細胞では,b-FGF受容体の数が時期・領域特異的に増減して発現することが報告されている³¹。次に,TGF- β は,腫瘍細胞の培養上清中から発見されて,命名されている。その後,軟骨誘導因子が見出され,それがTGF- β と同じであることが報告された³²。SeyedinとOgawaがin vitroで間葉系細胞から軟骨細胞を誘導し,軟骨誘導因子TGF- β 1,TGF- β 2を同定したことに端を発する^{33,34}。分子量は2.5万のホモダイマー分子で,通常,結合たんぱくと結合し,不活性型複合体として生体内のさまざまな組織に存在する。特に,血小板と骨組織に最も大量に貯蔵されている。TGF- β は,間葉系細胞だけでなく,上皮細胞,神経系細胞あるいは血液系細胞など多くの細胞の増殖,分化および機能発現の調節に関与している³⁵。軟骨細胞においては,in vitroにおいて(1)軟骨細胞の増殖作用,(2)肥大化・石灰化を抑制する作用,(3)細胞外マトリックス(コラーゲンやフィブロネクチンなど)の産生を促進する作用,および(4)高濃度下で未分化細胞を軟骨細胞に誘導する作用を持つことが報告されている³⁶。

本システムを用いた調製自家血清では,血小板内に含まれる細胞増殖因子(特に,TGF- β)の含有率が高い点が特徴的である。調製自家血清にb-FGFを添加することにより,軟骨細胞の増殖・分化に必要な細胞増殖因子が供給される。Tissue engineeringの臨床応用では,複雑な三次元形状を持った耳介形状軟骨が安全,確実に再生誘導されなくてはならない。軟骨組織再生誘導において,細胞増殖因子は必須と考えられるが,現在,b-FGFを除く細胞増殖因子の臨床使用は認められていない。本法は,軟骨組織の再生に最も重要な役割を果たす2大細胞増殖因子の1つであるTGF- β を血小板から血清へ遊

離させる上で有効な方法であり,軟骨再生に必須とされる細胞増殖因子(b-FGFおよびTGF- β)が最も安全に供給される利点を有している。調製自家血清内の細胞増殖因子量の検討では,b-FGFは 14.5 ± 1.4 pg/mlであった。軟骨細胞増殖を促進する至適b-FGF濃度は,5 ng/mlと報告され,25 ng/ml以上の高濃度においても増殖能に著明な変化はみられないと報告されている¹⁶。そこで,本実験では,調製自家血清にb-FGFを10 ng/ml添加した実験群を作成した。一方,TGF- β の至適濃度は,10 ng/mlと報告されており,本システムを用いればTGF- β 濃度は,至適濃度の約5倍に達するため,TGF- β を追加投与する必要はないと考えられた。

自家血清システムを軟骨細胞の培養に用いる方法については,すでに報告されている³⁷。この報告によると,採血バッグに血液を一晩保存することにより,細胞増殖因子を豊富に含む血清の作成が可能となっている。本方法では,血小板をガラスビーズに30分間作用させて,血小板より細胞増殖因子を血清中に遊離する。このため,極めて短い処理時間で,細胞増殖因子を大量に含む血清の作成が可能となった。

本研究では,調製自家血清を用いて軟骨細胞を培養した。その結果,FBS群およびCRAS群と比べてb-FGF添加群において最も軟骨細胞の増殖・分化は促進された。さらに,b-FGFおよびTGF- β の添加により最も良好な軟骨組織の再生が誘導されることが示された。以上の成績から調製自家血清を用いた軟骨細胞培養法の導入により,動物血清を用いずに軟骨組織の再生は可能であることが示唆された。一方,軟骨組織の再生・誘導にヌードマウスを用いているため,広い意味では異種動物の血清を用いずに再生できるか不明である。今後この点について,検討を要すると考えている。感染の問題なく細胞培養ができることは,有効かつ安全な再生医療の大前提である。本システムは自家血清の調製が閉鎖系となっているため,体外での細胞培養プロセスにおける感染のリスクが極めて低い特徴を有している。軟骨のtissue engineeringの臨床応用において,調製自家血清システムは極めて安全で有用な方法と考えられた。

謝 辞

本稿を終えるにあたり,御指導,御校閲を賜りました磯貝典孝教授に深謝いたします。

文 献

1. Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA (1997) Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered car-

- tilage in the shape of a human ear. *Plast Reconstr Surg* 100 : 297-302
2. Kamil SH, Kojima K, Vacanti MP, Bonassar LJ, Vacanti CA, Eavey RD (2003) In vitro tissue engineering to generate a human-sized auricle and nasal tip. *Larygoscope* 113 : 90-94
 3. Isogai N, Asamura S, Higashi T, Ikada Y, Morita S, Hillyer J, Janquet R, Landis WJ (2004) Tissue engineering of an auricular cartilage model utilizing cultured chondrocyte-poly (L-lactide- ϵ -caprolactone) scaffolds. *Tissue Eng* 10 : 673-687
 4. Shieh S-J, Terada S, Vacanti JP (2004) Tissue engineering auricular reconstruction : in vitro and in vivo studies. *Biomaterials* 25 : 1545-1557
 5. Gruber R, Sittlinger M, Bujia J (1996) In vitro cultivation of human chondrocytes using autologous human serum supplemented culture medium : minimizing possible risk of infection with pathogens of prion diseases. *Laryngorhinootologie* 75 : 105-108
 6. Bottenstein J, Hayashi I, Hutchings S, Masui H, Mather J, McClure DB, Ohasa S, Rizzino A, Sato G, Serrero G, Wolfe R, Wu R (1979) The growth of cells in serum-free hormone-supplemented media. *Methods Enzymol* 58 : 94-109
 7. Pei M, Seidel J, Vunjak-Novakovic G, Freed LE (2002) Growth factors for sequential cellular de- and re-differentiation in tissue engineering. *Biochem Biophys Res Commun* 294 : 149-154
 8. Mandl EW, van der Veen SW, Verhaar JA, van Osch GJ (2002) Serum-free medium supplemented with high-concentration FGF2 for cell expansion culture of human ear chondrocytes promotes redifferentiation capacity. *Tissue Eng* 8 : 573-580
 9. Margolis J (1956) Glass surface and blood coagulation. *Nature* 178 : 805-806
 10. Hughes AD, Clunn GF, Refson J, Demoliou-Mason C (1996) Platelet-derived growth factor (PDGF) : actions and mechanisms in vascular smooth muscle. *Gen Pharmacol* 27 : 1079-1089
 11. Heldin CH, Ostman A, Ronnstrand L (1998) Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta* 1378 : F79-113
 12. Lawrence DA (1996) Transforming growth factor-beta : a general review. *Eur Cytokine Netw* 7 : 363-374
 13. Cox DA, Maurer T (1997) Transforming growth factor-beta. *Clin Immunol Immunopathol* 83 : 25-30
 14. Alevizopoulos A, Mermoud N (1997) Transforming growth factor-beta : the breaking open of a black box. *Bioessays* 19 : 581-591
 15. Klagsbrun M (1979) Large-scale preparation of chondrocytes. *Meth Enzymol* 58 : 560-564
 16. Veilleux N, Spector M (2005) Effects of FGF-2 and IGF-1 on adult canine articular chondrocytes in type II collagen-glycosaminoglycan scaffolds in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 13 : 278-286
 17. Shimizu A, Tada K, Shukunami C, Hiraki Y, Kurokawa T, Magane N, Kurokawa-Seo M (2001) A novel alternatively spliced fibroblast growth factor receptor 3 isoform lacking the acid box domain is expressed during chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. *J Biol Chem* 276 : 11031-11040
 18. Nixon AJ, Lillich JT, Burton-Wurster N, Lust G, Mohammed HO (1998) Differentiated cellular function in fetal chondrocytes cultured with insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta. *J Orthop Res* 16 : 531-541
 19. Shukunami C, Ohta Y, Sakuda M, Hiraki Y (1998) Sequential progression of the differentiation program by bone morphogenetic protein-2 in chondrogenic cell line ATDC5. *Exp Cell Res* 241 : 1-11
 20. Shukunami C, Hiraki Y (2002) Differentiation of cartilage stem cells and their clinical applications. *Clinical Calcium* 12 : 194-199 (Japanese)
 21. Arevalo-Silva CA, Cao Y, Weng Y, Vacanti M, Rodriguez A, Vacanti CA, Eavey RD (2001) The effect of fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta on porcine chondrocytes and tissue-engineered autologous elastic cartilage. *Tissue Eng* 7 : 81-88
 22. Rousche KT, Ford BC, Praul CA, Leach RM (2001) The use of growth factors in the proliferation of avian articular chondrocytes in a serum-free culture system. *Connect Tissue Res* 42 : 165-174
 23. Jakob M, Demarteau O, Schafer D, Hintermann B, Dick W, Heberer M, Martin I (2001) Specific growth factors during the expansion and redifferentiation of adult human articular chondrocytes enhance chondrogenesis and cartilaginous tissue formation in vitro. *J Cell Biochem* 81 : 368-377
 24. Chaipinyo K, Oakes BW, van Damme MP (2002) Effects of growth factors on cell proliferation and matrix synthesis of low-density, primary bovine chondrocytes cultured in collagen I gels. *J Orthop Res* 20 : 1070-1078
 25. Gospodarowicz D (1974) Localization of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortizol on 3T3 cell growth. *Nature* 249 : 123-127
 26. Gospodarowicz D, Ferrare N, Schweigerer L, Neufeld G (1987) Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr Rev* 8 : 95-114
 27. Huang SS, Huang JS (1986) Association of bovine brain-derived growth factor receptor with protein tyrosine kinase activity. *J Biol Chem* 261 : 9568-9571
 28. Cuevas P, Burgos J, Baird A (1988) Basic fibroblast growth factor (FGF) promotes cartilage repair in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 156 : 611-618
 29. Kato Y, Iwamoto M (1990) Fibroblast growth factor is an inhibitor of chondrocyte terminal differentiation. *J Biol. Chem* 265 : 5903-5909
 30. Coffin JD, Florkiewicz RZ, Neumann J, Mort-Hopkins T, Dorn GW 2nd, Lightfoot P, German R, Howles PN,

- Kier A, O'Toole BA, et al (1995) Abnormal bone growth and selective translational regulation in basic fibroblast growth factor (FGF-2) transgenic mice. *Mol Biol Cell* 6: 1861-1873
31. Iwamoto M, Jikko A, Murakami H, Shimazu A, Nakashima K, Iwamoto M, Takigawa M, Baba H, Suzuki F, Kato Y (1994) Changes in parathyroid hormone receptors during chondrocyte cytodifferentiation. *J Biol. Chem* 269: 17245-17251
32. Ranchalis JE, Gentry L, Ogawa Y, Seyedine SM, McPherson J, Purchio A, Twardzik DR (1987) Bone-derived and recombinant transforming growth factor beta's are potent inhibitors of tumor cell growth. *Biochem Biophys Res Commun* 148: 783-789
33. Seyedin SM, Thomas TC, Thompson AY, Rosen DM, Piez KA (1985) Purification and characterization of two cartilage-inducing factors from bovine demineralized bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 2267-2271
34. Ogawa Y, Seyedin SM (1991) Purification of transforming growth factors beta 1 and beta 2 from bovine bone and cell culture assays. *Methods Enzymol* 198: 317-327
35. Massague J (1990) The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol.* 6: 597-641
36. Fuller K, Owens JM, Jagger CJ, Wilson A, Moss R, Chambers TJ (1993) Macrophage colony-stimulating factor stimulates survival and chemotactic behavior in isolated osteoclasts. *J Exp Med* 178: 1733-1744
37. Tallheden T, van der Lee J, Brantsing C, Mansson JE, Sjogren-Jansson E, Lindahl A (2005) Human serum for culture of articular chondrocytes. *Cell Transplant* 14: 469-479