



Title	幼若個体の軟骨自然修復過程に発現するCCL21/CCR7の軟骨再生における機能解析 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	上徳, 善太
Description	配架番号 : 2386
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13007号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70417
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Zenta_Joutoku_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 上徳 善太

学 位 論 文 題 名

幼若個体の軟骨自然修復過程に発現する CCL21/CCR7 の軟骨再生における機能解析
(Functional analysis of CCL21/CCR7 axis expressed in cartilage repair process in juveniles)

【背景と目的】

関節軟骨は細胞成分が乏しく、豊富な細胞外マトリクスを有するため自然修復能が低く、一度損傷した軟骨は再生が困難だといわれている。現在いくつかの治療法が開発されているが、その有効性に関しては、一定の見解が得られていない。一方、幼若個体では組織自然修復能が高い事が知られているが、先行研究において、自然修復能の乏しい関節軟骨においても、幼若マウスでは良好な軟骨自然修復が得られることを明らかにした。しかしながら、その分子メカニズムの解明はされていない。近年自然治癒力を応用した再生医療研究が行われており、このメカニズムの解明が軟骨再生医療に重要な役割を果たすと考えられる。

このメカニズムの解明の為、ケモカインに着目した。ケモカインとは幹細胞や各種前駆細胞に対し遊走能を持つ分子量の小さなサイトカインファミリーである。現在のところ 50 種類以上のリガンド、19 種類のレセプターの報告があり、構造上 4 つのサブタイプに分類される。その機能は組織の恒常性維持や、創傷治癒、免疫反応に重要な役割を果たす事が知られている。ケモカインを用いた軟骨再生治療の報告は散見されるが、軟骨再生とケモカインに関する詳細なメカニズムは解明されていない。そこで、幼若個体の軟骨自然修復過程において、特異的ケモカインにより制御されると仮説を立てた。本研究の目的は軟骨自然修復に関わるケモカインの網羅的解析を行い、そのケモカインの生体内での機能を解析する事である。

【方法と結果】

幼若個体の軟骨自然修復過程に関わるケモカインの網羅的解析をするために以下の実験を行った。骨髄間葉系幹細胞(MSCs)の軟骨細胞分化過程で、遺伝子発現の上昇するケモカインレセプターを抽出し、MSCs 平面培養による脱分化過程で、遺伝子発現の上昇するケモカインレセプターを除外した。5 種類のケモカインレセプター(CCR7, 9, CXCR3, 5, 7)は軟骨修復と関連が高いと考えられた。次いで、抽出されたレセプターに対応するケモカインの MSCs に対する遊走能評価を行ったところ、CCL21, CXCL9, CXCL11 は MSCs に対し有意に高い遊走能を認めた。最後に、幼若マウス骨髄におけるケモカインレセプターの蛋白発現の評価を免疫染色にて行った。幼若マウス骨髄において CCL21 のレセプターである CCR7 のタンパク発現が確認された。以上の結果から、幼若個体の軟骨修復機構に関わるケモカインとして CCL21/CCR7 が抽出された。

次に CCR7 ノックアウトマウス(CCR7^{-/-})を用い、軟骨修復能を評価した。幼若齢(3週齢)、

成熟齢(8週齢)のマウス大腿骨滑車部に軟骨全層欠損を作成し、CCR7^{-/-}、C57BL/6 (WT)間での軟骨修復能を評価した。損傷後4週、8週で屠殺し組織学的評価を行った(n=10)。また、損傷後早期(術後3日目、1週、2週)におけるCCL21、CCR7の発現を免疫組織染色にて行った。術後8週時、幼若齢WTでは軟骨自然修復が得られたが、幼若齢CCR7^{-/-}では軟骨修復スコアが著しく低下した(p<0.01)。一方、成熟齢では両系統間で同様に繊維性組織での修復を認め、両群間に有意差は認めなかった。CCL21及びCCR7は、幼若齢WTの骨軟骨損傷部周囲において損傷後早期に一過性の発現を認めた。成熟齢WTではCCL21、CCR7は損傷部に発現を認めなかったが、骨髄全体に発現を認めた。更に、WTとCCR7^{-/-}よりMSCsを採取しCCL21を用いた、細胞遊走試験、細胞増殖試験を行った。また、MSCsを用い軟骨分化誘導を行い、CCL21の添加有無による軟骨分化能の評価を行った。遊走試験では、WTより採取したMSCにCCL21を添加した群で、他群と比較し有意に高い遊走能を認めた(p>0.05)。増殖試験、また軟骨分化誘導試験では各群間に有意差を認めなかった。

最後に、日本白色家兎(16週齢)の膝蓋骨滑車部に骨軟骨欠損を作成しCCL21添加による軟骨修復能を評価した。未治療群、高純度アルギン酸ゲル (UPAL®ゲル) 単独群、UPAL®ゲルにCCL21を加えた、CCL21添加群に分け軟骨修復能を評価した。術後4週、16週で肉眼的、組織学的評価、またMicro-CTを用いた軟骨下骨の修復に関する評価を行った(n=10)。術後16週時、CCL21添加群の欠損部は十分な硝子様軟骨で修復されており、肉眼的スコア(p<0.05)、組織学的スコア(p<0.05)ともに、他の群よりも有意に優れていた。軟骨下骨の修復量は、3群間でほぼ同等であった。

【考察】

自然修復が可能な幼若齢において、CCR7^{-/-}では軟骨修復能が著しく低下し、WTでは自然修復過程の軟骨損傷部にCCL21、CCR7の一過性発現を認めたことから、CCL21/CCR7が幼若個体における軟骨自然修復機構に重要な役割を担う事を示した。創傷治癒においてはCCL21投与がMSCsを誘導し治癒を促進したと報告があるが、軟骨修復とCCL21/CCR7の関わりを示した報告はなく、本研究は両者の関わりを示した最初の研究である。成熟齢において、損傷部でのCCL21/CCR7の発現は認めなかったが、骨髄にCCR7の発現を認めた。この結果より、成熟個体においても外因性CCL21投与により軟骨修復が再現できると想起した。実際にCCL21を投与する事で軟骨修復が得られたが、これはCCL21が内在性の幹細胞を損傷部に誘導し、carrierとして用いたUPAL®ゲルが足場となり軟骨修復を促進した可能性がある。

【結論】

CCL21/CCR7が幼若個体における軟骨自然修復に関わることを示した。また、成熟個体においても外因性CCL21投与により軟骨修復を再現した。本来生体に備わっている自然治癒力を高める事により軟骨再生を目指すこの治療アプローチは、より低侵襲な幹細胞ベース治療となる事が期待される。