

滑膜間葉系幹細胞由来三次元人工組織・ナノファイバースキャフォールドを用いた半月板フープ機能の修復

1. 星ヶ丘医療センター スポーツ整形外科, 2. 大阪大学大学院 医学系研究科 器官制御外科学 (整形外科)
3. Center for Cellular and Molecular Engineering, Department of Orthopaedic Surgery, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA, USA, 4. McCaig Institute for Bone & Joint Health, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada, 5. 大阪保健医療大学 スポーツ医科学研究所, 6. 大阪大学 国際医工情報センター

○下村和範^{1,2}, Benjamin B. Rothrauff³, David A. Hart⁴, 濱本秀一², 小林雅人², 吉川秀樹², Rocky S. Tuan³, 中村憲正^{2,5,6}

半月板の円周状線維(フープ構造)の破綻は、膝関節の生体力学的機能を著しく損なうが、未だ有効な治療法は存在せず、治療に難渋することが多い。さらに損傷を放置すると、変形性関節症の要因となる。我々は、滑膜間葉系幹細胞およびエレクトロスピニング法にて作成したナノファイバースキャフォールドを用い、家兎半月板損傷モデルにおいて、半月板フープ機能修復に対する有用性を検討した。

ε カプロラクトンよりエレクトロスピニング法を用いて、一定方向にナノレベル線維構造を有するシート状スキャフォールドを作製した。次いで、滑膜間葉系幹細胞より作成した細胞・マトリックス複合体からなる膜状の三次元人工組織(TEC)をスキャフォールドの両面に貼り合わせた。家兎内側半月板前節に5mm幅の横断裂を作製し、断裂部をスキャフォールド単独あるいはTEC・スキャフォールド複合体で被覆・補強した。その際、スキャフォールド線維方向と半月板主線維(フープ)の方向を一致させた。コントロールとして未治療群を用意した。移植後、4, 8, 12週で、大腿骨内顆の関節軟骨保護効果および修復半月を組織学的に評価し、半月板フープ機能として、脛骨内側関節面の半月板被覆率を計算した。

コントロール群、スキャフォールド単独群では、関節軟骨の変性が進行し、半月板の脛骨関節面の被覆率が低下し、半月板の関節外への逸脱が見られた。一方で、TEC・スキャフォールド群は、12週まで関節軟骨の変性は見られず、修復半月板の関節外への逸脱も見られなかった。修復半月板は、TEC・スキャフォールド群で、線維軟骨による修復が見られた。

以上より、本法は、従来治療困難であった半月板フープ機能の修復に有用であることが示され、今後、難治性半月板損傷治療への応用が期待される。

Enhanced Repair of Meniscal Hoop Structure Injuries Using An Aligned Electrospun Nanofibrous Scaffold Combined with a Mesenchymal Stem Cell-derived Tissue Engineered Construct

1. Dept. of Sports Orthopaedics, Hoshigaoka Medical Center, Osaka, Japan, 2. Dept. of Orthopaedic Surgery, Osaka Univ. Graduate Sch. of Medicine, Osaka, Japan, 3. Center for Cellular and Molecular Engineering, Dept. of Orthopaedic Surgery, Univ. of Pittsburgh Sch. of Medicine, Pittsburgh, PA, USA, 4. McCaig Institute for Bone & Joint Health, Univ. of Calgary, Calgary, Alberta, Canada, 5. Inst. for Medical Science in Sports, Osaka Health Science University, Osaka, Japan, 6. Center for Advanced Medical Eng. & Informatics, Osaka Univ., Osaka, Japan

○Kazunori Shimomura^{1,2}, Benjamin B. Rothrauff³, David A. Hart⁴, Shuichi Hamamoto², Masato Kobayashi², Hideki Yoshikawa², Rocky S. Tuan³, Norimasa Nakamura^{2,5,6}

Damage to the meniscal hoop structure results in loss of biomechanical function, potentially due to the extrusion of the meniscus from the weight bearing area. However, there have been no established, effective treatments for such injuries. The purpose of this study was to investigate the applicability of mesenchymal stem cells (MSC)-seeded nanofibrous scaffolds to repair the damaged meniscal hoop structure along with the prevention of subsequent cartilage degeneration using a rabbit model. Meniscal radial defects (5 mm width) in the medial meniscus were treated by wrapping and suturing with either an aligned electrospun nanofibrous scaffold alone or a scaffold combined with a tissue engineered construct (TEC) derived from synovial MSCs, with the scaffold fiber direction matching that of the meniscal circumferential fibers. In the control group, no treatment was applied to the meniscal defect. The MSC-based TEC-combined nanofibrous scaffolds contributed significantly to the prevention of meniscal extrusion and exhibited a chondroprotective effect, compared with either scaffold alone or the untreated control groups. Also, meniscal defects treated with such TEC-combined nanofibrous scaffolds were consistently repaired with a fibrocartilaginous tissue. In this study, we have demonstrated the feasibility of a combined TEC-nanofibrous scaffold to repair the meniscal hoop structure, and prevent the progression to cartilage degeneration, as a potential tissue engineering method.

軟骨細胞は transmembrane protein 147 (TMEM147) 依存的 NF- κ B 経路の活性化を介して関節炎を引き起こす

北海道大学大学院 医学研究院 整形外科学教室¹

北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子神経免疫学教室²

○太田光俊¹, 田中勇希², 中川育磨², 蔣菁菁², 有馬康伸², 上村大輔², 小野寺智洋¹, 岩崎倫政¹, 村上正晃²

【背景】近年、重要な炎症誘導機構として IL-6 アンブが注目されている。これは非免疫細胞に存在し、NF- κ B と STAT3 の同時活性化により炎症性サイトカイン等を持続的に産生する機構である。一方関節リウマチ (RA) に関しては、これまで病態解明を目指した様々な試みがなされてきたが、依然その全貌は明らかではない。今回我々は本来炎症反応とは関係の乏しいとされる軟骨細胞に着目し、軟骨細胞が IL-6 アンブを内在し関節炎を惹起するとの仮説を立てた。

【目的】軟骨細胞における IL-6 アンブの存在を示し、その分子制御機構を解明する。

【方法】ヒト・マウス軟骨細胞、マウス前軟骨細胞株 (ATDC5)、モデルマウス (RA)・患者サンプル (RA) の関節軟骨を用い、qPCR, ELISA, WB, Reporter Assay, 免疫組織染色, CT 等を行った。

【結果】軟骨細胞・ATDC5 は、NF- κ B と STAT3 の同時活性化により炎症性サイトカインを大量発現し、IL-6 アンブの内在が示された。モデルマウス・患者サンプルの軟骨において IL-6 アンブ活性化が観察された。また軟骨細胞特異的な IL-6 アンブの抑制はモデルマウスの関節炎を抑制した。

IL-6 アンブ関連分子の TMEM147 は、モデルマウス・患者サンプルの軟骨に強発現していた。さらに TMEM147 過剰発現系では IL-6 アンブ活性化が増強され、TMEM147 抑制系では抑制された。TMEM147 抗体投与はモデルマウスの関節炎を有意に抑制した。最後に TMEM147 は、NF- κ B 活性化における足場タンパクとして機能していることが示された。

【結論】RA の病態に軟骨細胞を起点とした IL-6 アンブが関与すること、TMEM147 が IL-6 アンブを正に制御していることが示された。軟骨細胞における TMEM147 を介した NF- κ B 経路の活性化は、新規 RA 治療標的となる可能性がある。

Role of Chondrocytes in the Development of Rheumatoid Arthritis Via Transmembrane Protein 147-Mediated NF- κ B Activation

1. Division of Molecular Psychoimmunology, Institute for Genetic Medicine, Hokkaido University

2. Department of Orthopaedic Surgery, Graduate School of Medicine, Hokkaido University

○Ota M^{1,2}, Tanaka Y¹, Nakagawa I¹, Jiang JJ¹, Arima Y¹, Kamimura D¹, Onodera T², Iwasaki N², Murakami M¹.

Rheumatoid arthritis (RA) is a highly prevalent disorder, but its pathogenesis remains unclear. We have reported that hyper-NF- κ B activation system, named the IL-6 amplifier (IL-6 Amp), which is activated by co-activation of NF- κ B and STAT3 in non-immune cells, plays a role in the development of chronic inflammatory diseases. We have identified over 1,000 genes required for its activation. Here, we focused on transmembrane protein 147 (TMEM147) from these genes and investigated its role in chondrocyte-mediated RA development, because the roles of chondrocytes in RA remain controversial. We found high expression of TMEM147 as well as NF- κ B and STAT3 activations in chondrocytes isolated from RA patients. NF- κ B activation was significantly suppressed by silencing of TMEM147 in vitro. TMEM147 deficiency suppressed NF- κ B-target gene expressions including IL-6 and chemokines, whereas it did not affect expressions of STAT3 targets, suggesting a role of TMEM147 in NF- κ B pathway. Importantly, chondrocyte-specific ablation of the IL-6 Amp significantly suppressed the development of a RA model. Mechanistically, TMEM147 acts as a scaffold protein for binding p65 with breakpoint cluster region (BCR) to induce phosphorylation of p65 at S529. Finally, administration of anti-TMEM147 antibody significantly improves a RA model development. Thus, TMEM147 is a positive regulator of NF- κ B activation in the joint particularly in chondrocytes, representing a new therapeutic target for RA.

ヒト骨格形成細胞分化における urothelial cancer-associated 1(UCA1) 長鎖ノンコーディング RNA の生理的役割

1. 鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 歯科矯正学分野
2. 岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 口腔生化学分野、3. 同 歯科矯正学分野、4. 同 分子医化学分野
5. 同 組織機能修復学分野、6. 同 整形外科学分野、7. 岡山大学 歯学部 先端領域研究センター

○石川崇典^{1,2,3}、西田 崇²、大野充昭⁴、宝田剛志⁵、Ha Thi Thu Nguyen⁴、栗原慎之介⁴、古松毅之⁶、村瀬友里香⁷、滝川正春⁷、大橋俊孝⁴、上岡 寛³、久保田聡^{2,7}

【目的】 ヒト細胞では膨大な数の長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) が発現しているが、その生理的機能の多くは不明である。本研究では、軟骨代謝に関連する lncRNA を特定し、軟骨組織における役割を解明することを目的とした。

【方法】 トランスクリプトーム解析の結果から軟骨形質への関与が予測された lncRNA、UCA1 に関し、各種ヒト由来細胞株、ヒト正常関節軟骨細胞における発現を比較解析した。次に、ヒト骨髄間質細胞(hBMSC)を軟骨細胞に分化させる過程での、UCA1 や軟骨細胞マーカーの発現量の変化を追った。また、ヒト軟骨細胞様 HCS-2/8 細胞株に対し siRNA での UCA1 サイレンシングを行い、軟骨細胞形質関連遺伝子発現に対する影響を評価した。ヒト骨芽細胞様 SaOS-2 細胞でも同様に UCA1 サイレンシングならびに過剰発現を行い、骨芽細胞形質関連遺伝子発現への影響を評価した。さらに、マウス軟骨前駆細胞 ATDC5 に対して UCA1 を付加発現し、軟骨細胞形質関連遺伝子の発現変化を解析した。

【結果】 UCA1 遺伝子発現量の比較解析では、HCS-2/8 細胞で強い発現がみられ、ヒト正常軟骨細胞でも発現は確認された。UCA1 は hBMSC ではほとんど発現しておらず、軟骨細胞に分化させていく過程で発現が上昇し、その後軟骨細胞マーカー発現が上昇した。HCS-2/8 細胞における UCA1 サイレンシングでは、軟骨細胞マーカーの発現が低下した。SaOS-2 における UCA1 サイレンシングおよび過剰発現では、いずれも骨芽細胞マーカーの発現低下を認めた。ATDC5 細胞に UCA1 を付加発現すると、軟骨細胞への分化が促進された。

【結論】 以上の実験事実から、類人猿特異的な lncRNA である UCA1 は、小型の脊椎動物に比べ持続的な軟骨内骨形成を必要とするヒトの骨格発達において重要な役割を果たしていることが示唆された。

Physiological role of urothelial cancer-associated 1 (UCA1) long noncoding RNA in human skeletogenic cell differentiation

¹Dept. of Orthodontics & Dentofacial Orthopedics, Kagoshima Univ. Graduate Sch. of Medical & Dental Sciences,

²Dept. of Biochemistry & Molecular Dentistry, Okayama Univ. Graduate Sch. of Medicine, Dentistry & Pharmaceutical Sciences, ³Dept. of Orthodontics, Okayama University Graduate Sch. of Medicine, Dentistry & Pharmaceutical Sciences, ⁴Dept of Molecular Biology & Biochemistry, Okayama Univ. Graduate Sch. of Medicine, Dentistry & Pharmaceutical Sciences, ⁵Dept of Regenerative Science, Okayama Univ. Graduate Sch. of Medicine, Dentistry & Pharmaceutical Sciences, ⁶Dept of Orthopedic Surgery, Okayama Univ. Graduate Sch. of Medicine, Dentistry & Pharmaceutical Sciences, ⁷Advanced Research center for Oral & Craniofacial Science, Okayama Univ. Dental Sch.

○Takanori Ishikawa^{1,2,3}, Takashi Nishida², Mituaki Ono⁴, Takarada Takeshi⁵, Ha Thi Thu Nguyen⁴, Shinnosuke Kurihara⁴, Takayuki Furumatsu⁶, Yurika Murase⁷, Masaharu Takigawa⁷, Toshitaka Oohashi⁴, Hiroshi Kamioka³, Satoshi Kubota^{2,7}

【Objective】 A number of long-noncoding RNAs (lncRNA) are transcribed from human genome, however, the physiological functions remain mostly unknown. In this study, we specified a lncRNA involved in cartilage metabolism, and aimed to elucidate its role in skeletogenic cells.

【Methods】 Based on transcriptomic data, we suspected that UCA1 was associated with chondrocytic phenotype. We comparatively analyzed the expression of UCA1 among various cell lines and human normal articular chondrocytes. Next, we analyzed the expression of UCA1 in human bone marrow stromal cells (hBMSC) along the course of differentiation into chondrocytes. The effect of UCA1 gene silencing on cartilaginous gene expression was evaluated in human chondrocytic HCS-2/8 cells. Also, we performed UCA1 gene silencing and hyper-expression in human osteoblastic SaOS-2 cells, and osteoblastic gene expression was monitored. Finally, we evaluated the effect of the forced expression of UCA1 in murine chondrocyte precursor ATDC5 cells.

【Results】 Comparative analysis among a variety of human cells revealed strong expression of UCA1 in HCS-2/8 cells and human normal chondrocytes. We found UCA1 was almost absent in hBMSC, but it was induced during the course of differentiation into chondrocytes, which was followed by the expression of chondrocytic markers. As a result of the UCA1 gene silencing in HCS-2/8, chondrocytic marker expression was reduced. UCA1 gene silencing and hyper-expression also had a significant impact on the osteoblastic phenotype in SaOS-2. Forced expression of UCA1 in ATDC5 overdrove its differentiation into chondrocytes.

【Conclusion】 These results collectively indicate a physiological and important role of this hominoid specific lncRNA in the skeletal development of humans, who require more sustained endochondral ossification than do smaller vertebrates.

骨髄由来間葉系幹細胞と高純度硬化性アルギン酸ゲルを用いた椎間板細胞治療法

北海道大学大学院医学研究院 専門医学系部門 機能再生医学分野 整形外科教室

○釜場大介, 須藤英毅, 辻本武尊, 浦勝郎, 山田勝久, 岩崎倫政

【背景】 椎間板の再生能は低く, 椎間板摘出術後は組織修復が十分に行われず変性を進行させる要因となる. 我々はこれまで, アルギン酸を基盤とした高純度硬化性ゲルを椎間板ヘルニア術後の組織修復材として開発し, 無細胞投与によるその効果を示し FIH 試験に移行している. しかし中高年期の自己修復能の乏しい患者においては, ゲル単独ではその効果に限界があると予想される. 本研究ではゲルと骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSCs) の併用による再生効果とそのメカニズムを検証した.

【方法】 *in vitro* 試験: 日本白色家兎椎間板から髄核細胞 (NPCs) を単離し, BMSCs は同種他家骨髄由来を利用した. 各単群と混合群の 3 群に分け, ゲルに包埋し 3 次元培養を低酸素下で行った後に髄核細胞マーカー, 成長因子, 細胞外基質の遺伝子発現を評価した. *in vivo* 試験: 家兎椎間板線維輪穿刺により変性モデルを作成し, 穿刺 4 週後に髄核摘出に続いてゲルと同種他家 BMSCs またはヒト BMSCs を混合し埋植した. 術後 1, 7, 28 日に髄核細胞マーカーの発現評価を行い, 術後 4, 12 週に MRI, 組織学, 免疫組織学的評価による変性定量評価を行った.

【結果】 *in vitro* 試験: 共培養後の BMSCs, NPCs における髄核細胞マーカー, 成長因子, 細胞外基質の遺伝子発現は単独培養と比較して有意に高かった. *in vivo* 試験: BMSCs における髄核細胞マーカーの発現率は経時的に上昇した. ゲル単独でも髄核摘出と比較して変性が有意に抑制されていた一方で, BMSCs の併用でその効果はより増強され組織再生が導かれた. ウサギ BMSCs とヒト BMSCs の効果は同等であった.

【考察】 ゲル単独でも髄核摘出単独と比較して変性進行が有意に抑制されていたが, BMSCs の併用によりその効果が上乘せられ組織再生が確認され, また埋植した BMSCs と椎間板内組織・細胞の相互作用による組織再生メカニズムを明らかにした. これらの知見から混合性腰部脊柱管狭窄症を適応とした椎間板ヘルニア摘出術後の椎間板再生治療法としての臨床応用の可能性が示された.

Bone marrow mesenchymal stem cells combined with ultra-purified alginate gel as a regenerative therapeutic strategy after discectomy for degenerated intervertebral discs

Department of Orthopaedic Surgery, Faculty of Medicine and Graduate School of Medicine, Hokkaido University

○Daisuke Ukeba, Hideki Sudo, Takeru Tsujimoto, Katsuro Ura, Katsuhisa Yamada, Norimasa Iwasaki

Background: Because the regenerative ability of intervertebral discs (IVDs) is restricted, defects caused by discectomy may induce insufficient tissue repair leading to further IVD degeneration. An acellular bioresorbable biomaterial based on ultra-purified alginate (UPAL) gel was developed to fill the IVD cavity and prevent IVD degeneration. However, an acellular matrix-based strategy may have limitations, particularly in the elderly population, who exhibit low self-repair capability. Therefore, further translational studies involving product combinations, such as UPAL gel plus bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs), are required to evaluate the regenerative effects of BMSCs embedded in UPAL gel on degenerated IVDs.

Methods: Rabbit BMSCs and nucleus pulposus cells (NPCs) were co-cultured in a three-dimensional (3D) system in UPAL gel. In addition, rabbit or human BMSCs combined with UPAL gel were implanted into IVDs following partial discectomy in rabbits with degenerated IVDs.

Results: Gene expression of NPC markers, growth factors, and extra cellular matrix was significantly increased in the NPCs and BMSCs 3D co-culture compared to that in each 3D mono-culture. *In vivo*, whereas UPAL gel alone suppressed IVD degeneration as compared to discectomy, the combination of BMSCs and UPAL gel exerted a more potent effect to induce IVD regeneration. In addition, similar IVD regeneration was observed between human and rabbit BMSCs.

Discussions: The findings reveal that implantation of BMSCs and UPAL gel is effective in preventing IVD degeneration. In addition, our results highlight the interplay between BMSCs and existing nucleus pulposus cells in achieving IVD regeneration. This study thus demonstrates the therapeutic potential of BMSCs combined with UPAL gel as a regenerative strategy following discectomy for degenerated IVDs.

細胞内代謝変動を介した4-methylumbelliferoneとhyaluronan synthase-2過剰発現による軟骨保護作用の検討

¹名古屋大学医学部 整形外科

²米国 East Carolina University, Brody School of Medicine

○寺部 健哉^{1,2} 高橋 伸典¹ 石塚 真哉^{1,2} 大橋 禎史^{1,2} Cheryl B. Knudson² Warren Knudson² 今釜 史郎¹
小嶋 俊久¹

【目的】 我々はヒアルロン酸(HA)合成阻害剤である4-methylumbelliferone (4-MU)が軟骨細胞において抗炎症効果を有することを明らかにした。一方で相反する作用を持つHAS2 overexpression (HAS2-OE)も同様に抗炎症効果、軟骨保護作用を有した。これらの共通点は細胞内のUDP-sugar poolを減少させる点に注目し、細胞内の糖代謝変動が炎症に関与する仮説を立てた。特に metabolic reprogramming と呼ばれる好気性代謝から嫌気性代謝(glycolysis)への変動を阻害した際の軟骨保護作用の有無を検討した。

【方法】 ウシ軟骨細胞をIL-1 β で刺激し、4MUとHAS2-OEの有無により細胞内の糖代謝の変動を細胞外フラックスアナライザーにて評価した。またglycolysis阻害剤である2-deoxyglucose (2DG)が炎症下における糖代謝変化の評価に加え、MMP13の発現と細胞内の代謝恒常性に関与するAMPKの活性化をウェスタンブロットで確認した。また軟骨片に同様の刺激を7日間施行しサフラニンO染色を施行した。

【結果】 細胞外フラックスアナライザーによるATP産生の検討において軟骨細胞では80%はglycolysis由来、20%は好気性代謝由来であった。IL-1 β 刺激によりglycolysisの割合が亢進した一方で4MUとHAS2-OEはglycolysis亢進を抑制した。2DGはIL-1 β 刺激によるMMP13上昇を抑制した。さらにサフラニンO染色で2DGはIL-1 β 刺激による染色性の低下を抑制した。またIL-1 β 刺激によりAMPKリン酸化は低下したが2DGはこの低下を抑制した。

【結論】 glycolysis阻害剤である2DGが炎症下における軟骨保護作用を認めた。糖代謝の制御が新たな軟骨変性阻害薬につながる可能性を強く示唆した。

Chondroprotective effects of 4-methylumbelliferone and hyaluronan synthase-2 overexpression involve changes in chondrocyte energy metabolism

¹ Department of Orthopedic Surgery, Nagoya University Graduate School of Medicine

² Department of Anatomy and Cell Biology, Brody School of Medicine, East Carolina University

○Kenya Terabe^{1,2} Nobunori Takahashi¹ Shinya Ishizuka^{1,2} Yoshifumi Ohashi^{1,2} Cheryl B. Knudson² Warren Knudson²
Shiro Imagama¹ Toshihisa Kojima¹

【Purpose】 We reported that the inhibitor of hyaluronan (HA) biosynthesis, 4-methylumbelliferone (4-MU) inhibited cartilage degradation. This was a somewhat counterintuitive observation because the overexpression of HAS2 (HAS2-OE) exerted the same chondroprotective effects. Both 4-MU and HAS2-OE generates a flux in intracellular UDP-sugar pools that resulted in changes in cell metabolism; switching from a dependence on glycolysis to aerobic respiration. We hypothesized the effects of HAS2-OE and 4-MU were related to changing metabolism and the inhibition of glycolysis induce chondroprotective effect. To determine that, we used the glycolysis inhibitor, 2-Deoxyglucose (2DG) as an agent to change metabolism.

【Methods】 Chondrocytes were stimulated with IL-1 β with 4MU, HAS2-OE and 2DG. Chondrocytes were tested using Seahorse Flux Analyzer to determine the contributions of glycolysis and mitochondrial respiration. Accumulation of MMP13 and phospho-AMPK (pAMPK) protein was quantified with Western blotting. Cartilage explants were cultured with IL-1 β and 2DG and stained with Safranin O.

【Result】 In control chondrocytes, the use of glycolysis contributes to the majority of ATP produced approximately 20% from the TCA cycle. IL-1 β -activated chondrocytes display increase in glycolysis and decrease in mitochondrial contributions. These changes are reversed by co-treatment with 4MU and HAS2-OE. 2DG reversed the IL-1 β -induced increases accumulation of MMP13 protein. Although IL-1 β lost safranin O staining, co-incubation with 2DG blocked in the loss of proteoglycan. IL-1 β treatment decreased accumulation of pAMPK. Co-treatment with 2DG resulted in a rescue of the pAMPK status.

【Conclusion】 Metabolic shift plays an essential role in chondrocytes under inflammatory conditions. 2DG has chondroprotective effect by changing metabolism.