

学 位 論 文 題 名

Establishment of a murine bipotent chondroprogenitor cell line
(CL-1) and elucidation of the chondrogenic mechanisms
of a novel cartilage-regenerative compound (AG-041R)

二系統への分化能を有するマウス軟骨前駆細胞株 CL-1 の樹立と
新規軟骨再生薬 AG-041R の作用機序解明

学位論文内容の要旨

損傷した軟骨の再生能力が低いことは紀元前 400 年ごろ古代ギリシアの医師
ヒポクラテスによって初めて記載されており、現在でもその理解は変わらない。
軟骨の再生能力が低い原因として、軟骨に血管が分布していないことと軟骨細胞
の増殖能が低いことが挙げられている。

関節軟骨の損傷は変形性関節症や外傷において生じるが、軟骨の自己再生能力
が低いため、放置すれば関節軟骨の変性は進行する。従って、進行した症例では
人工関節に置換しなければならない。しかし人工関節は関節機能を完全に代替す
るものでなく、多くの患者は置換 10 年後には周囲の骨との接合が悪くな
る”loosening”が生じ、関節機能低下に悩まされる。そのため、より生体適合性の
高い関節軟骨再生治療が求められている。

近年、自家軟骨細胞移植による軟骨再生が行われている。しかし2度の手術が
必要であり、かつ経済的負担も大きいために、より簡便な軟骨再生の治療法が求

められている。

軟骨細胞は骨芽細胞、筋細胞、脂肪細胞と同じく間葉系幹細胞に起源を有すると考えられている。軟骨損傷時の再生では、骨髓など病変部の周辺組織から浸潤・増殖する細胞に含まれる未分化な軟骨前駆細胞の増殖と、軟骨細胞への分化が中心的な役割を果たすと考えられている。しかし、臨床的に病変部には正常な関節軟骨と同じ硝子軟骨は再生されない。その要因に病変部における軟骨前駆細胞の不足と、軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化不全が考えられている。前者については、basic fibroblast growth factor によって軟骨前駆細胞が増殖することが明らかにされているが、軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化調節機構はほとんど解明されていない。その解明は、軟骨再生技術の向上に大きな役割を果たすと考えられる。

その簡便なツールを得るために、正常成熟マウスの脛骨から軟骨細胞とそれ以外の二つの系統への分化能を有する軟骨前駆細胞株の樹立を試みた。その結果、単層培養系で軟骨細胞および脂肪細胞に分化する細胞株 CL-1 を樹立した。CL-1 の軟骨細胞への分化の方向付けを調節する因子を探索した結果、transforming growth factor (TGF)- β_1 が軟骨細胞への分化を促進し、脂肪細胞への分化を抑制することが判明した。TGF- β_1 に対するこの性質は、CL-1 が複数の分化能を持つ未分化な軟骨前駆細胞における軟骨細胞への分化調節のモデルを提供できることを示唆している。

一方、ラット毒性試験においてガストリン受容体拮抗作用を有する低分子化合物 AG-041R が全身の永久軟骨を増生させることを偶然に見出した。すなわち、AG-041R による軟骨増生は耳介、気管、胸骨剣状突起、関節軟骨辺縁部、椎間板において認められ、組織学的には軟骨膜の軟骨前駆細胞からの軟骨細胞への分化促進と、軟骨基質の増加が認められた。AG-041R のラット膝関節内投与により、投与した関節のみにおいて硝子軟骨の増生と関節軟骨細胞周囲の軟骨基質増加が認められた。このことから AG-041R の全身性軟骨増生作用はこの化合物の直接作用であり、その標的細胞が軟骨前駆細胞および軟骨細胞であることが示唆された。

そこで、AG-041R が CL-1 の軟骨細胞への分化に及ぼす影響を検討した。加えて他のマウス軟骨前駆細胞株 ATDC5(胚性腫瘍細胞株由来)と C3H10T1/2(マウス胎子由来)の軟骨細胞への分化に対する AG-041R の影響も比較検討した。その結果、AG-041R は CL-1 の軟骨細胞への分化を促進し、脂肪細胞への分化を抑制した。一方、ATDC5 では AG-041R は軟骨細胞への分化をわずかに抑制した。C3H10T1/2 では軟骨細胞への分化を誘導せず、脂肪細胞への分化を軽度に抑制した。これらの結果から他のマウス胎子由来の軟骨前駆細胞株と異なり、CL-1 が AG-041R の作用を *in vitro* で再現できる細胞株であることが示された。

そこで、CL-1 を用いて AG-041R の軟骨形成促進作用の機序を解明する目的で、AG-041R と構造の異なる CCK₂/gastrin 受容体拮抗剤の CL-1 に対する軟

骨形成促進作用について初めに検討した。その結果、AG-041R のみが作用を有しており、軟骨形成促進作用と CCK₂/gastrin 受容体拮抗作用は関連しないことが判明した。次に、CL-1 に対する AG-041R の軟骨形成促進作用における TGF- β の関与について検討した。その結果、AG-041R は TGF- β ₁, β ₂ 蛋白量、特に潜在型蛋白の発現量を顕著に増加させた。また、AG-041R の軟骨形成促進作用は TGF- β 中和抗体および潜在型 TGF- β の活性化阻害によって阻害された。これらの結果から、CL-1 における AG-041R の軟骨形成促進作用の少なくとも一部は、TGF- β の誘導を介することが示唆された。

さらに、AG-041R の軟骨形成促進作用への MAP kinases の関与についても検討した。その結果、AG-041R は extracellular signal-regulated kinase (Erk) および p38 MAP kinase を活性化することが判明した。ERK の活性化阻害剤 (PD98059) により AG-041R の軟骨形成促進作用は増強されたが、脂肪細胞への分化抑制作用は阻害された。このことから、ERK 活性化が AG-041R の脂肪細胞への分化抑制作用に重要であることが示唆された。一方、p38 阻害剤 (SB202190) は AG-041R による軟骨細胞への分化促進作用を抑制したため、p38 活性化は AG-041R の軟骨形成促進作用に重要な機序であることが示唆された。AG-041R の標的分子は不明であり、CL-1 はその解析のツールとしても有用な細胞株であると考えられた。

AG-041R の軟骨再生作用を *in vivo* で評価する目的で、ラット病態モデルにお

ける効果を検討した。ラット関節骨軟骨欠損モデルに対して AG-041R を 3 週間関節内投与したところ、欠損部は硝子軟骨様組織によって再生された。しかし、このとき AG-041R が病変部の周囲組織にも分布したため、関節軟骨周辺部に軟骨棘が形成された。このことから、臨床応用のためには AG-041R の作用範囲を限局する必要があることが明らかとなった。そこで、液体の状態で病変部に注入後、生理食塩水洗浄により固化させ、AG-041R の作用を限局させることのできる病変部埋め込み型製剤を調製し、その薬効の予備的評価を行った。その結果、AG-041R 製剤は軟骨棘を形成することなく欠損部の硝子軟骨を再生し、埋め込み型製剤が作用限局に有用な剤形であることが示唆された。しかし、臨床応用のためには、同製剤の硝子軟骨再生作用の再現性などさらなる検討が必要であると考えられた。

以上の実験結果から、CL-1 は生体における軟骨形成機序の解明や、軟骨形成促進物質の探索とその作用機序解明、および軟骨再生技術の向上において有用な細胞株であることが示唆された。また、AG-041R は軟骨損傷を始めとする軟骨疾患の治療薬になりうる可能性が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 梅 村 孝 司
副 査 教 授 伊 藤 茂 男
副 査 教 授 昆 泰 寛
副 査 助 教 授 奥 村 正 裕

学 位 論 文 題 名

Establishment of a murine bipotent chondroprogenitor cell line
(CL-1) and elucidation of the chondrogenic mechanisms
of a novel cartilage-regenerative compound (AG-041R)

二系統への分化能を有するマウス軟骨前駆細胞株 CL-1 の樹立と
新規軟骨再生薬 AG-041R の作用機序解明

再生能力が乏しい軟骨の再生には、軟骨前駆細胞の増殖とその軟骨細胞への分化が必須である。しかし、軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化調節機構は知られていない。

そのツールを得るため、本研究第 I 章では正常成熟マウスから軟骨前駆細胞株の樹立を試みた。その結果、軟骨細胞および脂肪細胞に分化する細胞株 CL-1 を樹立した。CL-1 は TGF- β_1 により軟骨細胞への分化が促進されることから、CL-1 が未分化な軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化調節機構解明に有用であることが示された。

本研究第 II 章では、ガストリン受容体阻害剤 AG-041R のラットにおける軟骨形成促進作用を見出した。AG-041R はラットにおいて全身性に軟骨を増生させ、軟骨前駆細胞および軟骨細胞を標的とすることが示された。

本研究第 III 章において、AG-041R の軟骨形成促進作用の機序解明を、CL-1 を用いて行った。AG-041R は TGF- β_1 同様、軟骨細胞への分化を促進した。この活性はガストリン受容体阻害活性とは無関係で、TGF- β 蛋白の産生増加および活性化と Erk および p38 MAP kinase の活性化が関与することが判明した。

本研究第 IV 章では、AG-041R の病態モデルにおける軟骨再生作用を検討した。ラット関節全層欠損モデルにおいて、AG-041R は関節軟骨を再生させた。しかし、軟骨棘が生じたため、作用を病変部に局限する目的で病変部埋め込み型製剤を調製し、効果を検討した。その結果、軟骨棘形成は回避され、病変部が硝子軟骨で再生されたため、本製剤の有用性が示唆された。

以上の結果は、軟骨再生治療薬を創製する上で重要な知見である。よって審査員一同は、北村秀智氏が博士（獣医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。