

論文の内容の要旨

獣医学専攻
平成 27 年度博士課程入学
氏名 遠藤健太郎
指導教員名 西村亮平

論文題目

Fabrication of hyaline cartilage using mesenchymal stem cells for canine articular cartilage regeneration

(犬の関節軟骨再生を目指した間葉系幹細胞からの硝子軟骨作製法の検討)

関節軟骨はグリコサミノグリカン (GAG)、プロテオグリカン、II 型コラーゲンなどの細胞外基質 (ECM) に富む硝子軟骨であり、関節に潤滑性や衝撃吸収能を付与する。犬では関節軟骨の損傷が多く、跛行や疼痛の原因となりやすい。現状では、消炎鎮痛剤による治療が第一選択であるが、関節軟骨は無血管組織であり自然回復能力に乏しいため、根治的治療は難しい。関節軟骨の修復を目的に、マイクロフラクチャー法などの外科的治療が適応されることもあるが、本来の硝子軟骨ではなく I 型コラーゲンを主成分とする線維軟骨による修復が起こるため、機能的再建が達成できず、また、二次的な変形性関節症の原因ともなる。

近年、関節軟骨損傷に対する根治的治療として、幹細胞を用いた再生医療が期待されており、特に獣医療では間葉系幹細胞 (MSCs) がセルソースとして有望視されている。MSCs は間葉系組織から採取可能な幹細胞であり、軟骨分化能を持つことも示されているが、犬 MSCs が ECM に富む硝子軟骨へ分化するかは明確には示されていない。一方、他の動物種の MSCs では、塩基性線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2) によるプレコンディショニングにより、MSCs の未分化性および軟骨分化能が亢進すること、分化培地中のウシ胎児血清 (FBS) の濃度、軟骨形成関連因子の添加、培養時の酸素濃度などが MSCs の軟骨分化における ECM 発現や肥大化による骨形成に影響することが報告されているが、犬 MSCs では不明な点が多い。従って軟骨細胞のセルソースとして犬 MSCs を利用するためには、これらの因子の影響の評価が不可欠である。

一方、再生組織を移植する場合には立体的な組織を構築する必要があるが、近年の組織工学技術の発達により、幹細胞と足場材料を用いて体外で三次元 (3D) 組織を構築することが可能となってきている。近年開発されたバイオ 3D プリンタは、細胞の浮遊培養によ

り得られるスフェロイドを剣山状の針に配置し、融合させることで任意の形状の組織構造体を構築可能である。人工材料を利用しないため臨床応用しやすく、犬の軟骨再生医療への応用も期待できる。

以上の背景から、本研究では犬の関節軟骨再生療法を開発することを目的として、犬 MSCs の硝子軟骨分化に最適な培養条件の検討（第 1, 2 章）を行った後、バイオ 3D プリントを用いて犬硝子軟骨組織を体外構築し、犬軟骨欠損モデルへ移植して治療効果を検討した（第 3 章）。

第 1 章では、まず、犬 MSCs からの硝子軟骨分化において、FGF-2 によるプレコンディショニングと分化培地中の FBS 濃度の影響を評価した。犬 MSCs として、骨髄中脂肪細胞周囲に付着して存在する骨髄脂肪細胞周囲細胞（BM-PACs）を用いた。BM-PACs を FGF-2 の存在下および非存在下で拡大培養したのち、スフェロイドを作製し、軟骨分化培地にそれぞれ 0%, 1%, 10% FBS を添加して 14 日間培養した。FGF-2 処理した BM-PACs では、増殖能および未分化遺伝子である SOX2 の発現亢進が認められ、FGF-2 による未分化性の獲得が示唆された。FGF-2 未処理の BM-PACs で作製した スフェロイドでは、軟骨分化培地中の FBS 濃度依存的な軟骨基質発現の抑制が認められた。FGF-2 処理した細胞のスフェロイドでは、FBS による軟骨基質発現抑制はみられず、プロテオグリカンや II 型コラーゲンの発現が亢進し、I 型コラーゲンの発現は抑制された。軟骨分化指標の GAG/DNA および軟骨関連遺伝子の発現は 0%FBS の分化培地で最も上昇した。以上から、FGF-2 によるプレコンディショニングを行い、FBS 不含軟骨分化培地で誘導することで、犬 MSCs の効率的な硝子軟骨分化が可能であると考えられた。

次に、ヒト MSCs において軟骨分化促進作用が報告されている骨形成蛋白質-2（BMP-2）、増殖分化因子-5（GDF-5）、インスリン様成長因子-1（IGF-1）が、犬 MSCs の硝子軟骨分化に与える影響について検討した。FBS 不含軟骨分化培地に BMP-2、GDF-5、IGF-1 をそれぞれ添加し、14 日間培養した。BMP-2 の添加により GAG/DNA が有意に高値を示したが、肥大軟骨遺伝子である COL10 の発現も有意に亢進した。GDF-5 の添加により GAG/DNA は有意に高値を示し、II 型コラーゲン発現が亢進する傾向が認められた。一方で、COL10 発現の有意な亢進は認められなかった。IGF-1 の添加による影響はみられなかった。以上より、GDF-5 は肥大化を誘導せずに犬 MSCs の硝子軟骨分化を促進させる理想的な成長因子であると考えられた。しかし、スフェロイド辺縁部では依然として I 型コラーゲンの発現が認められ、一部の細胞は線維軟骨へ分化していると考えられた。

第 2 章では、低酸素環境に注目し、酸素濃度が犬 MSCs の硝子軟骨および線維軟骨への分化制御にどのような影響を与えるか検討した。まず、拡大培養および軟骨誘導時の低酸素環境の影響を評価した。BM-PACs を通常酸素（20%）および低酸素（2%）で拡大培養後にスフェロイドを作製し、それぞれのスフェロイドを通常酸素および低酸素環境下で、FBS 不含軟骨分化培地を用いて軟骨へ誘導した。1, 7, 14 日後に第 1 章と同様の評価に加え、低酸素により誘導される hypoxia inducible factor-1 α （HIF-1 α ）の核内移行を評価し

た。拡大培養中の酸素濃度による影響は認められなかったが、軟骨誘導時の低酸素環境により、軟骨分化に必須の転写因子である SOX9 の発現が亢進し、プロテオグリカンやⅡ型コラーゲンの発現上昇とⅠ型コラーゲンの発現抑制がみられた。また、HIF-1 α の核内移行は、低酸素環境下で誘導 1 日後から認められたが、7 日目には通常酸素環境下でも認められた。これらの結果から、軟骨誘導時の低酸素環境は、誘導初期の HIF-1 α の核内移行を介して犬 MSCs の硝子・線維軟骨への分化運命決定に関与する可能性が示唆された。

そこで、軟骨誘導初期の低酸素環境が犬 MSCs を硝子軟骨へ運命決定付けるという仮説を立て、その検証を目的に、BM-PACs から作製したスフェロイドを以下の 4 群に分けて軟骨誘導試験を行い、同様の評価を行った：①20% O₂ で 21 日間培養（通常酸素群）、②20% O₂ で 7 日間培養後、2% O₂ で 14 日間培養（後期低酸素群）、③2% O₂ で 21 日間培養（低酸素群）、④2% O₂ で 7 日間培養後、20% O₂ で 14 日間培養（初期低酸素群）。低酸素群および初期低酸素群では、通常酸素群および後期低酸素群と比較して、GAG/DNA およびプロテオグリカン、Ⅱ型コラーゲン発現が亢進し、Ⅰ型コラーゲンの発現が抑制され、SOX9 発現の亢進もみられた。以上から、軟骨誘導初期の低酸素環境により、犬 MSCs を硝子軟骨へ運命決定付けることが可能であると考えられた。

第 3 章では、まず、BM-PACs からスフェロイドを作製し、バイオ 3D プリンタを用いて、3D 組織構造体を作製した。構造体は通常酸素および低酸素環境下で 7 日間軟骨分化誘導を行った。一部のスフェロイドは構造体作製に用いず、単体で分化誘導を行い、実験 2 と同様の評価を行った。構造体およびスフェロイド単体のいずれも、低酸素環境下で硝子軟骨様の分化を示したが、スフェロイド単体と比較すると、SOX9 等の軟骨関連遺伝子の発現は構造体で有意に亢進した。また、通常酸素環境下では構造体のプロテオグリカンやⅡ型コラーゲン発現が低下した。以上から、3D 軟骨組織構築においても低酸素環境は重要であり、バイオ 3D プリンタと低酸素培養を組み合わせることで、犬 MSCs から硝子軟骨組織を体外構築することが可能であった。

最後に、作製した構造体の犬軟骨欠損モデルにおける軟骨再生治療効果を検討した。健康ビーグル犬 2 頭 (Dog 1, 2) から BM-PACs を培養し、低酸素下で直径 6 mm の硝子軟骨構造体を作製した。両後肢の大腿骨内側顆荷重部に直径 6 mm の軟骨欠損を作製し、片側は構造体を移植する移植肢、対側は移植を行わない対照肢とした。3 か月後に膝関節を採取し、移植部の組織学的評価を行った。Dog 1 では移植肢、対照肢ともに欠損部が軟骨様組織で置換されていた。組織学的評価では、移植肢の欠損部は大部分が硝子軟骨様組織で置換されていたが、対照肢では線維軟骨様組織が混在している様子が確認された。一方で Dog 2 では移植肢、対照肢ともに欠損部に再生軟骨組織はほとんど認められなかった。以上から、バイオ 3D プリンタにより作製した硝子軟骨構造体の移植により、欠損部の線維軟骨による再生を抑制出来る可能性が示唆されたが、今後、移植方法や移植後の管理等をさらに検討する必要があると考えられた。

以上、本研究では、これまで十分な硝子軟骨分化能が示されていない犬 MSCs を効

率的に軟骨誘導するための培地条件を確立し、低酸素培養によりさらに純度の高い硝子軟骨へ誘導および運命決定付けする方法を確立した。また、バイオ 3D プリンタと低酸素環境を組み合わせることで、犬 MSCs から硝子軟骨組織を体外構築することに成功した。犬軟骨欠損モデルへの移植では十分な効果を得られなかったものの、線維軟骨化を抑制し、硝子軟骨による修復が得られる可能性が示され、本研究で確立された犬の硝子軟骨組織作製を利用した軟骨再生医療は、犬の関節軟骨損傷の根治的治療として有用な治療法となることが期待された。