

審査の結果の要旨

氏名 遠藤 健太郎

犬では関節軟骨損傷が多いが、関節軟骨は自然回復能力に乏しく従来の治療法による根治的治療は難しかった。近年、関節軟骨損傷に対する根治的治療として、間葉系幹細胞（MSCs）を用いた再生医療が期待されているが、犬 MSCs では十分な硝子軟骨分化能は示されていない。他動物種の MSCs では、拡大培養および分化誘導時の細胞増殖因子やウシ胎児血清（FBS）、低酸素環境が軟骨分化に影響することが報告されており、犬 MSCs を利用した軟骨再生医療のためには、これらの因子の影響の評価が不可欠である。一方、近年開発されたバイオ 3D プリンタは、細胞集合体であるスフェロイドを剣山上に配置・融合させることで任意の形状の構造体を構築可能であり、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の開発を目的として、犬 MSCs からの硝子軟骨作製法を確立した後に、バイオ 3D プリンタを用いて犬硝子軟骨組織を体外構築し、移植による治療効果を検討した。

第 1 章では、まず犬 MSCs の硝子軟骨分化において、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、骨髄脂肪細胞周囲細胞を用いた。FGF-2 未処理群のスフェロイドでは、FBS 濃度依存的な硝子軟骨基質発現の抑制が認められた。FGF-2 処理群のスフェロイドでは、線維軟骨基質の発現が抑制され、グリコサミノグリカン（GAG）産生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と、FBS 不含軟骨分化培地により、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、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）の軟骨分化に対する影響について検討した。BMP-2 添加により GAG および肥大軟骨遺伝子である COL10 の発現が亢進する一方、IGF-1 添加による影響はみられなかった。GDF-5 添加では GAG 発現は亢進したが、COL10 発現の亢進はみられず、GDF-5 は肥大化を誘導せずに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、依然として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、拡大培養および軟骨誘導時の低酸素環境が犬 MSCs の硝子軟骨分化に与える影響を評価した。その結果、軟骨誘導時の低酸素環境により、硝子軟骨基質の発現亢進と線維軟骨基質の発現抑制がみられた。低酸素誘導因子-1 α （HIF-1 α ）の核内移行は、低酸素下で誘導初期

に認められた。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、スフェロイドを通常酸素群、後期低酸素群（通常酸素→低酸素）、低酸素群、初期低酸素群（低酸素→通常酸素）の4群に分けて軟骨誘導試験を行った。その結果、初期低酸素群では低酸素群と同等の硝子軟骨が、後期低酸素群では通常酸素群と同等の線維軟骨が得られた。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、バイオ3Dプリンタを用いて通常酸素および低酸素下で構造体を作製した。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った。その結果、構造体およびスフェロイド単体は低酸素下で硝子軟骨様の分化を示したが、軟骨関連遺伝子の発現は構造体で有意に亢進した。以上から、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、健常犬2頭（Dog 1, 2）の細胞から硝子軟骨構造体を作製し、大腿骨に作製した軟骨欠損部へ移植して治療効果を検討した。Dog 1 では移植肢の欠損部は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認められなかった。以上から、硝子軟骨構造体の移植により、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、移植方法や術後管理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。これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。