

氏 名	荒木 勸
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士乙第410号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与年月日	平成26年 9月10日
学位論文題目	Improved quality of repair cartilage by bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of an osteochondral defect in a cynomolgus macaque model (カニクイザルの骨軟骨欠損に対する骨髄間葉系幹細胞を用いた組織学的修復の有用性の検討)
審査委員	主査 教授 依馬 正次 副査 教授 小島 秀人 副査 教授 江口 豊

論文内容要旨

*整理番号	414	氏名 (ふりがな)	荒木 勸
学位論文題目	<p>Improved quality of repair cartilage by bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of an osteochondral defect in a cynomolgus macaque model (カニクイザルの骨軟骨欠損に対する骨髄間葉系幹細胞を用いた組織学的修復の有用性の検討)</p>		
<p>【目的】関節軟骨は細胞成分や血流に乏しく一度損傷すると自然治癒は難しいとされている。また軟骨修復には骨髄から供給される間葉系幹細胞（以下 MSCs）が重要な役割を果たしていることも知られており、より多くの MSCs を欠損部に導入することが修復に良好に働くといわれている。以前より基礎研究の分野において関節軟骨損傷に対して様々な手法を用いた軟骨修復が試みられているが依然として損傷部周囲の正常軟骨や軟骨下骨との良好な integration の獲得は困難である。また臨床においても軟骨欠損に対して組織工学的修復がすでに試みられているが、ヒトでは期待されるほどの十分な修復が得られておらず、以前から行われてきたウサギ等の小型動物とヒトとの外挿が問題視されており、またヒトでは詳細な欠損治療部の組織学的評価が不可能であることも大きな問題となっている。今回、よりヒトに近い実験動物であるサルを用いて、コラーゲンと MSCs を用いた軟骨欠損に対する修復を試み、その有用性や限界を検討する事を目的とした。</p> <p>【方法】雄のカニクイザル 18 頭を実験動物として用いた。各個体とも上腕骨より骨髄を採取培養し骨髄由来の MSCs を単離した。得られた MSCs を <i>in vitro</i> において分化誘導培地内で培養し骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞に分化させ MSCs の性質の確認を行った。また得られた MSCs を Type I コラーゲンゲルに包埋し cell-gel composite を作製した。<i>In vivo</i> では 18 頭(36 膝)の膝蓋骨溝に直径 3mm 深さ 5mm の軟骨全層欠損を作製し、軟骨全層欠損のみの群 (Null 群)、欠損部にコラーゲンゲルのみを移植した群 (Gel 群) および cell-gel composite を移植した群 (MSC 群) の 3 群に分けた (各群 6 頭)。さらに各群を処置後 6、12、24 週間時に 2 頭ずつ屠殺し、肉眼的、組織学的評価を行った。組織学的評価にはトルイジンブルー染色を用い、組織学的評価基準には Caplan's histological grading scale を用いた。さらに欠損部に再生した組織のうちトルイジンブルー染色にて濃染する部分の面積を new cartilage area とし、欠損作製前の正常軟骨の面積を area of estimated cartilage layer とし前者を後者で割り %new cartilage area を求め適切な量の再生がされているかを評価した。欠損部に再生した組織の質の評価にはコラーゲン I、II 免疫染色を行った。</p>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

【結果】 *In vitro*において、培養中に dish に付着した細胞に対してギムザ染色を行うとコロニーを形成していた。また分化誘導培地にて追加培養を行うと骨芽細胞（アルカリフォスファターゼ染色）、脂肪細胞（オイルレッドO染色）、軟骨細胞（コラーゲンII免疫染色）様の形態を示すことが確認できた。*In vivo*では、肉眼的所見としては全ての個体において著明な滑膜炎や骨棘の形成や感染は認めなかった。組織学的評価においては、欠損のみで処置をしなかった Null 群は処理後 24 週においても線維性骨様組織で一部覆われるにとどまり、コラーゲンゲルのみを移植した Gel 群では軟骨下骨まで過形成したトルイジンブルー染色で濃染する軟骨様組織の形成を認めた。MSC 群では、軟骨下骨の形成を認め軟骨様組織の再生は正常軟骨と良好な integration をなしていた。処置後 24 週間経過時には、Caplan's histological grading scale が MSC 群では他の 2 群よりも有意に良好であった。処置後 12 週および 24 週経過時において軟骨欠損部に対する再生組織の面積(%new cartilage area) は Null 群よりも他の 2 群の方が有意に多かった。

【考察】 今回の方法で、上腕骨の骨髄を採取し単離した細胞は従来からいわれている MSCs の特徴と一致した。ウサギなどの小型動物や他の実験動物では軟骨全層欠損に対する MSCs の移植は行われていたが今回ははじめて霊長類をもちいた研究と考えた。*In vivo*にてカニクイザルにおいても MSC 群では特に軟骨下骨の形成が良好であり、正常軟骨との integration も良好な再生組織が得られた。また MSCs の移植に伴い危惧される著明な滑膜炎や骨化などの有害事象も認められなかった。霊長類での本実験結果により、今後臨床応用に向け重要な研究結果になったと考えた。

【結論】 カニクイザルの骨髄由来の MSCs を移植した関節軟骨全層欠損修復の *in vivo* 実験では軟骨下骨の形成や正常軟骨との integration が良好な修復を認めた。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	414	氏名	荒木 勲
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11 ポイント、600 字以内で作成のこと。)</p> <p>ヒトに近い実験動物であるサルを用いて、コラーゲンと間葉系幹細胞を用いた軟骨欠損に対する修復を検討し、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) カニクイザルの上腕骨から骨髄を採取し、培養、間葉系幹細胞 (MSC) を樹立したところ、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞に分化することが分かった。 2) カニクイザルの軟骨全層欠損を作製し、軟骨全層欠損のみの群、コラーゲンゲルを移植した群、コラーゲンゲル+MSC を移植した群を作製した。 3) 各群を処置後、6, 12, 24 週間後に処理し、肉眼的、組織学的評価を行った。 4) 軟骨全層欠損のみの群では、処理後 24 週においても、線維性骨様組織で一部覆われていたが、コラーゲンゲルのみの処置群では、軟骨下骨まで軟骨様組織の形成が認められた。 5) 一方、MSC 群では軟骨下骨の形成を認め、組織学的には軟骨と一体化していた。 <p>本論文は、霊長類を用いて間葉系幹細胞の軟骨再生に対する効果を検証したものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 409 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 26 年 9 月 2 日)</p>			