

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 村田 大紀

題 目：ウマの組織由来間葉系幹細胞を用いた骨軟骨再生に関する研究

論文要旨：動物における関節疾患の中でも、サラブレッド競走馬の関節内骨折、離断性骨軟骨症、および軟骨下骨嚢胞は、若齢期に変形性関節症（Osteoarthritis; 以下 OA）が急速に進行する、ウマにとって重篤な疾患である。一度 OA が進行すると、関節軟骨の変性だけに止まらず、軟骨下骨の硬化も伴うことから、骨と軟骨を同時に治療しなければならない。またウマの OA は、競走中に繰り返される関節への荷重によって進行することから、その病変は関節荷重部に限定される。したがって、関節非荷重部の正常な機能特性を有する骨と軟骨をセットで採取して、病変部である関節荷重部に自家移植する方法（モザイクプラスチック法）が確立されている。モザイクプラスチック法を施した後は、良好な症状の改善効果を示すことが知られているが、非荷重部の正常な骨軟骨を損傷させることや、移植できる骨軟骨の量に制限があることが問題とされてきた。近年では、ハイドロキシアパタイト等の骨充填材に加えて、アテロコラーゲン等の人工基材に播種した軟骨細胞を移植する方法が検討されているが、関節軟骨本来の硝子軟骨を再生するまでには至っていない。生体に埋植される人工基材には、コラーゲンのような免疫原性が低いものが適用されるが、少なからず移植後に吸収されて自己基質へと置換される過程が必要となる。基質の分解と産生を複数の細胞がうまく連携して、絶えず更新を繰り返している骨とは異なり、軟骨の基質代謝は軟骨細胞のみが担い、更新サイクルは極めて緩徐である。したがって、人工基材を排除するためのシステムが、新生軟骨中に長期にわたって残存することは、関節軟骨本来の硝子軟骨化の妨げになると考えられる。また、軟骨細胞から回収される細胞成分は少量に限られることや、培養過程における軟骨細胞が脱分化してしまう問題も指摘されている。以上のことから、充分量の細胞を使って硝子軟骨を再生させるという最終目標に到達するためには、人工基材をできるだけ使用せずに、間葉系幹細胞を単独で移植する方法が適していると考えられた。そこで本研究では、人工足場（スキヤフォールド）となる基材を一切用いることなく、幹細胞凝集塊を鋳型の中で三次元的に配置し、相互に癒合させると形成される立体細胞構造体を骨軟骨欠損部に移植して、骨と軟骨を同時に再生させる方法を、動物実験の実施を通して検討してきた。またこれまで、ウマの再生医療への応用が期待される細胞源として、骨髄由来、脂肪組織由来、臍帯組織由来、臍帯血由来、そして末梢血由来の間葉系幹細胞を用いた研究が行われてきた。一方ヒトでは、軟骨治療のための優れた細胞源として、滑膜組織や滑液が報告されている。競走馬の関節液中にも多くの幹細胞が存在し、それを分離・培養することが出来れば、そのウマに対して軟骨再生治療を施すための有効な細胞源となり得るかもしれない。ウマでもヒトと同様に、滑膜組織や滑液から分離した細胞が軟骨分化能に優れ、ウマの軟骨治療に応用可能か、検討を始めることにした。また最近になって、実験動物やヒトで報告され始めている脱分化脂肪細胞についても、ウマの整形外科領域の再生医療分野において応用が可能かどうか、検討することとした。

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	村田 大紀
審査委員	主査：鹿児島大学 教授 三角 一浩
	副査：鹿児島大学 教授 帆保 誠二
	副査：鳥取大学 教授 保坂 善真
	副査：鹿児島大学 教授 小原 恭子
	副査：鹿児島大学 准教授 藤木 誠
題目	ウマの組織由来間葉系幹細胞を用いた骨軟骨再生に関する研究

## 審査結果の要旨：

サラブレッドの関節内骨折，離断性骨軟骨症，軟骨下骨嚢胞は，変形性関節症（Osteoarthritis; 以下 OA）となる重要な疾患である。進行性の OA では，関節軟骨の変性に止まらず，軟骨下骨の硬化も伴うことから，骨と軟骨を同時に治療しなければならない。本研究では，足場となる人工的な基材を一切用いることなく，間葉系幹細胞の凝集塊を三次元的に配置して立体構造体を作製し，骨軟骨欠損部に自家移植して組織を再生させる方法について，実験動物を用いて検討した。ウマの臨床応用に向けて滑液・滑膜由来幹細胞（SF,SM-MSC）について分離培養を試み，その性状と機能を解析した。

実験用ブタの脂肪組織から分離・培養した脂肪由来幹細胞（AT-MSC）について，フローサイトメトリーによる細胞表面抗原，RT-PCR による未分化マーカー遺伝子発現，及び骨・軟骨・脂肪の 3 分化系統への多分化能を確認した。この細胞を U 底プレートに播種して形成した球状の集塊（スフェロイド）を一つずつ鋳型の中で積層・融合させて，円柱状の細胞構造体とした。大腿膝蓋関節の滑車溝（関節非荷重面）に，骨円鋸を用いて，円筒状の骨軟骨欠損を作成し，そこに細胞構造体を自家移植した。移植後 1 ヶ月ごとに実施した CT 検査では，移植側において骨欠損の縮小が早まることが確認され，移植後 6, 12 ヶ月の病理組織学的検査では，周囲軟骨との境界表面が非常に滑らかな軟骨の再生と，豊富な軟骨下骨の再建が移植側で認められた。このような結果は，大腿骨遠位荷重部（内側顆）に作成した骨軟骨欠損への自家移植試験においても再現された。非荷重面移植の成果は，「A preliminary study of osteochondral regeneration using a scaffold-free three-dimensional construct of porcine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells.」として整形外科学分野の国際的な学術雑誌に公表され，

荷重面移植の成果は「Osteochondral regeneration using a scaffold free three-dimensional construct of swine adipose tissue derived mesenchymal stem cells.」として同分野の国際学会で招待口演として受理された。

関節疾患を発症したウマの滑液から、細胞を分離・培養することに成功し、得られた細胞の性質を解析した上で、その細胞を滑液由来間葉系幹細胞 (SF-MSC) と同定した。ウマの正常関節と関節疾患関節から滑液を採取して細胞を分離・培養し、形成されるコロニー数を比較したところ、関節内骨折等の疾患がある関節由来の滑液の方が有意に多かった。これらの細胞は、約7日間で倍加することを明らかにし、細胞表面抗原及び未分化マーカー遺伝子の発現パターンと、骨・軟骨・脂肪・腱細胞への多分化能に基づき、間葉系幹細胞であることを証明した。SF-MSC は、滑膜由来の間葉系幹細胞 (SM-MSC) と考えられ、6穴ディッシュに撒いて平板培養して、軟骨細胞への分化誘導を行ったところ、アルシアンブルーによって強染されるシート状となった。この軟骨細胞シートは、SM-MSC の軟骨分化誘導によっても得られる一方で、AT-MSC や骨髄由来幹細胞 (BM-MSC) の軟骨分化誘導では生じないことを明らかにした。関節疾患のある関節から得た SF-MSC は、SM-MSC と共に、特に軟骨分化能に優れた幹細胞であることを明らかにした。これらの研究成果は、「Multipotency of equine mesenchymal stem cells derived from synovial fluid.」として獣医学分野の国際的な学術雑誌に公表した。

以上のように、本研究では、関節構造の主体となる骨軟骨治療に将来有望とされる治療戦略を提案すべく、各種動物を用いた細胞治療の前臨床実験を行い、将来につながる興味深い研究成果を示した。

以上により、本論文は博士 (獣医学) の学位に値するものと判定された。