

学 位 論 文 題 名

An experimental study on regeneration therapy
for damaged articular cartilage
by chondrocyte transplantation using a bovine model

（牛モデルを用いた軟骨細胞移植による
損傷関節軟骨の再生療法に関する実験的研究）

学位論文内容の要旨

関節軟骨は血管、神経およびリンパを欠いた組織のため、損傷に対する再生能力に乏しい。これまでに損傷関節軟骨を再生させるための様々な外科的治療法が試みられてきたが、損傷した軟骨は正常な硝子軟骨組織ではなく、強度や弾性に劣る線維軟骨組織で修復され、軟骨のさらなる退行性変化を誘導する。最近、その欠点を改善した自己軟骨細胞移植術（ACT）はヒトの軟骨欠損において硝子軟骨を再生させる理想的な方法と考えられている。しかしながら、今のところ、動物においてACTは臨床応用された報告はない。以上のことから、本研究ではACTの獣医療への応用に向けた基礎的研究を行った。

軟骨細胞は軟骨を形成する細胞外マトリックス（ECM）蛋白質に対して接着および移動する能力を持つ。このような性質は軟骨の再生に重要な役割を果たす。まず始めに、炎症性サイトカインのIL1- α によって抑制される細胞接着および移動能に対するヒアルロン酸（HA）の影響を牛軟骨細胞を用いて検討した。その結果、*in vitro*培養牛軟骨細胞の接着および移動能はIL1- α 添加により有意に低下したが、HAはIL1- α によるそれらの低下を有意に阻止することが判明した。

ACT では軟骨細胞の機能を維持する多数の細胞が必要となる。そこで、牛軟骨細胞の増殖および代謝に対するアスコルビン酸 (Asc) の効果をアルギン酸を用いた 3 次元培養下で検討した。Asc の添加または非添加培養後 16 日目の細胞増殖、アグリカン、コラーゲンタイプ I およびタイプ II の遺伝子発現をそれぞれヘキスト 33258 染色および RT-PCR によって解析し、細胞形態および ECM を組織学および免疫組織学的に解析した。また、Asc 添加のアルギネート培養を 2 か月間連続培養し、細胞の増殖、形態および ECM の産生を解析した。その結果、Asc 添加培養では非添加培養に比べて増殖細胞数は有意に増加し、細胞内のコラーゲンタイプ I mRNA の発現は増加したが、コラーゲンタイプ II mRNA の発現は減少した。2 か月間連続培養した軟骨細胞の増殖は主にアルギネートビーズの辺縁部にみられた。さらに、これらの細胞周囲には合成されたグリコサミノグリカン (GAG) およびコラーゲンタイプ II が検出された。

次に、正常または実験的に作出した損傷軟骨表面における軟骨細胞の接着と増殖および ECM の構築について検討するため、牛軟骨組織片を同種軟骨細胞と 4 週間共培養した。組織片への標識軟骨細胞の接着を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察し、移植軟骨細胞の形態的变化および ECM の産生を組織学的および免疫組織学的に解析した。その結果、正常および損傷軟骨表面には同時培養した細胞の接着と増殖により新しい層が形成され、損傷軟骨の欠損部は移植細胞の産生した ECM で占められていた。ECM は GAG およびコラーゲンタイプ II 陽性であり、この ECM 内には多数の円形軟骨細胞の増殖が観察された。

最後に、硝子軟骨再生における ACT の *in vivo* 効果を、軟骨細胞の関節内および実験的軟骨欠損部に生じた血塊内移植の 2 つの方法を牛モデルで検討した。全身麻酔下で 2 頭の牛大腿骨滑車領域の関節表面にそれぞれ 16 か所の軟骨全層損傷を外

科的に作成した。損傷作出時に採取した軟骨片から軟骨細胞を分離し、単層培養により増殖させた。これらの細胞を左側大腿膝蓋骨関節内（グループ 2、n=11）および、さらに軟骨損傷部の血塊内（グループ 3、n=5）へ術後それぞれ 2 週および 3 週目に移植した。関節内細胞を移植しない関節の軟骨損傷部を対照群（グループ 1、n=16）とした。術後 14 週目に牛を安楽殺後、軟骨損傷部を肉眼的および組織学に評価した。その結果、グループ 3 の軟骨損傷部には他のグループに比較して新しく形成された組織がより多く認められ、損傷部を充填しているのが観察された。グループ 1 および 2 の欠損部では線維組織あるいは線維軟骨をわずかに含む線維組織が認められたものの、グループ 3 の欠損部では多くの線維軟骨に加えて硝子軟骨が観察された。

本研究の結論として、硝子軟骨細胞をアルギン酸を用いた 3 次元培養下で Asc 添加により増殖させることが可能であった。また、軟骨細胞増殖促進作用がある Asc および炎症性サイトカインに対して軟骨保護効果を持つ HA は ACT の適用に際して修復促進に有用であることが示唆された。培養された軟骨細胞は軟骨欠損部に接着および増殖し、新しく ECM を形成する能力を維持していることを確認した。軟骨欠損部血塊内への細胞移植による ACT は獣医療において損傷軟骨の修復に適用可能であることが示唆され、骨髄から軟骨細胞を誘導する他の再生療法と併用した治療が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 永 徹
副 査 教 授 梅 村 孝 司
副 査 教 授 岩 永 敏 彦 (医学研究科)
副 査 講 師 奥 村 正 裕

学 位 論 文 題 名

An experimental study on regeneration therapy for damaged articular cartilage by chondrocyte transplantation using a bovine model

(牛モデルを用いた軟骨細胞移植による
損傷関節軟骨の再生療法に関する実験的研究)

関節軟骨は損傷に対する再生能力に乏しい組織であり、損傷軟骨に対する再生療法の開発が望まれている。しかしながら、これまで動物における軟骨再生療法の臨床応用に関する有用な報告は少ない。そこで、申請者は軟骨再生療法の獣医療への応用に向けた以下の基礎的研究を行った。

はじめに、炎症性病態を想定したインターロイキン(IL)1- α 刺激による軟骨細胞の接着および移動能に対するヒアルロン酸(HA)の影響を検討した。その結果、IL1- α 添加による細胞の接着能および移動能の低下は HA 添加によって有意に阻止されることが判明した。また、アルギン酸三次元培養では本来の機能を保持した軟骨細胞の増殖が可能であった。次に、同種軟骨細胞を正常または損傷軟骨と共培養したところ、軟骨細胞は正常および損傷軟骨表面へ広く接着して増殖し、かつ新しい軟骨基質を構築した。最後に、移植軟骨細胞の *in vivo* 効果を、培養軟骨細胞の関節内および実験的軟骨欠損部に生じた血塊内移植の二つの方法を牛モデルで検討した。その結果、血塊内移植した損傷部の修復組織では硝子軟骨の再生がみられるなど、血塊内移植法は軟骨細胞を移植しない対照群および関節内移植した群より肉眼的および組織学的に有効な成績が得られた。

本研究の成果から、HA および Asc は移植軟骨細胞の増殖促進および移植環境の改善に有用であると考えられた。また、移植した軟骨細胞は損傷軟骨表面に遊

走して付着し、かつ機能を保持して増殖する可能性が示唆された。さらに、軟骨欠損部血塊内に培養軟骨細胞を移植する血塊内移植法によって移植軟骨細胞から硝子軟骨が形成されることを初めて見いだした。

以上のように申請者は、獣医整形外科分野における損傷軟骨の再生療法のための軟骨細胞培養法ならびに移植法の改善に貢献した。よって、審査員一同は、金根亨氏が博士(獣医学)の学位を授与される資格を有するものと認めた。