A Study on Chondrogenic Differentiation of Bovine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

（牛の骨髄間葉系幹細胞の軟骨分化能に関する研究）

学位論文内容の要旨

骨髄には、骨、軟骨、脂肪やその他の組織に分化する可能性を有する間葉系幹細胞（MSC）が存在する。様々な動物種のMSCが研究されており、種特異的な特徴を有していることが明らかにされている。しかしながら、牛は実験モデルとして *in vivo* および *in vitro* の多くの研究に応用されているにもかかわらず、牛のMSCに関する有用な情報はほとんどない。MSCの軟骨への分化誘導には、ペレット培養系のような細胞相互間を強く保持する要因、転換成長因子であるTGF β 1のような成長因子の存在、そしてポリマーやコラーゲン・タイプIIゲルのような立体構造を維持する環境が必要と思われる。

以上のことから本研究は、幹細胞研究における新しい牛の研究モデルを開発し、ついでこのモデルを用いてMSCの軟骨分化におけるいくつかの要因の役割を解析することを主な目的とした。

まず第1章では、牛骨髄から分離した線維芽細胞様細胞は、MSCとして *in vitro* において増殖性に優れた多分化能細胞であることから、幹細胞研究の分野において有用なモデルとなり得ると判断された。牛のMSCは、プラスチック培養器底に付着して急速に増殖することから、培養液を交換することによって骨髄中の他系統の細胞と分離することができた。初代継代培養細胞は位相差顕微鏡観察および蛍光標示式細胞分取（FACS）分析によって均質の細胞集団と思われた。骨、軟骨および脂肪形成といった多分化能は、これまで他の動物種に対して報告されたプロトコルの組み合わせによって誘導することができた。分化の程度は組織学的検索、ウエスタンブロット法、リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）法による組織特異的遺伝子の発現の分析およびノーザンブロット法によって評価した。骨誘導に続いて、分離された線維芽細胞様細胞は立方形細胞に転換し、アルカリフォスファターゼ陽性細胞のコロニーを形成した。分化の課程でこれらのコロニーはミネラル含有結節に転換した。さらに、オステオカルシンおよびコラーゲン・タイプIのメッセンジャーリボ核酸（mRNA）を発現した。軟骨形成は、コラーゲン・タイプII、アグリカンおよびsox9のmRNA発現の評価、および単層培養においてTGF β 1で刺激された細胞内に合成されたコラーゲン・タイプIIを検出することによって確認された。脂肪形成誘導培養液で18日間培養後、

MSCにおける細胞内脂質液胞の蓄積と脂肪細胞特異遺伝子であるペロキシゾーム増殖活性受容体 (PPAR) $\gamma 2$ および脂肪細胞脂肪酸結合タンパク (aP2) の発現が確認された。

第2章では、ペレット培養系において牛骨髄 MSC の軟骨分化が誘導された。第1章で述べた分化において生物学的に軟骨形成能を有する TGF $\beta 1$ の他に、本章では、MSC の軟骨形成における強い細胞間相互保持環境の影響について解析した。軟骨形成を誘導するため、MSC は TGF $\beta 1$ を 0ng/ml または 10ng/ml 添加した培養液を用いたペレット培養系において培養した。7 日間の培養後、ペレット中央部にアルシアンブルー染色およびコラーゲン・タイプ II 免疫染色で陽性が検知された。軟骨細胞マーカー陽性領域は、培養時間の経過とともに増大し、20 日後にはペレットのほぼ全体に及んだ。イン・サイチュウ (*in situ*) ハイブリダイゼンション法によって、ペレット中央部あるいは細胞集積部の円形細胞内にコラーゲン・タイプ II およびアグリカンの mRNA の強い発現が証明された。一方、コラーゲン・タイプ I の mRNA はペレット表層に強く発現していた。20 日間のペレット培養後、TGF $\beta 1$ 添加に比べて無添加細胞におけるコラーゲン・タイプ II mRNA の発現は 1.7 倍であった。従来必須といわれていた転換因子である TGF β ファミリーの生物活性刺激因子の無添加にもかかわらず、牛 MSC はペレット培養系において独立して自発的な軟骨形成能を示した。

第3章では、MSC の軟骨形成におけるコラーゲン・タイプ II の影響に焦点を当て、細胞外基質 (ECM) の違いによる MSC の軟骨形成反応を解析した。牛骨髄 MSC が単層培養、ならびに同様にアルギン酸塩、コラーゲン・タイプ I およびコラーゲン・タイプ II ヒドロゲルにおいて培養された。培養液は、牛胎児血清ならびに TGF $\beta 1$ の添加または無添加で用いられた。ECM 中におけるグルコサミノグルカンおよび新たに合成されたコラーゲン・タイプ II の存在により、軟骨分化は立体的なヒドロゲルピース培養後 3 日目で確認された。分化はコラーゲン・タイプ II ヒドロゲル培養において最も顕著で、かつ時間依存性であった。軟骨細胞特異遺伝子である、*sox9*、コラーゲン・タイプ II、アグリカンおよび *COMP* の発現レベルは qRT-PCR で測定し、ヒドロゲル中の遺伝子の分布は *in situ* ハイブリダイゼンション法で局在化した。全ての遺伝子は ECM 中のコラーゲン、特にタイプ II の存在によって発現が亢進した。一方、軟骨細胞脱分化マーカーであるコラーゲン・タイプ I mRNA の発現は抑制された。さらに、コラーゲン含有 ECM で培養された MSC に対する TGF $\beta 1$ の軟骨形成への影響を調べた。コラーゲン・タイプ I 存在下におけるデキサメサゾンあるいは TGF $\beta 1$ の添加は骨形成の遺伝子表現型の発現により適した条件を提供したが、コラーゲン・タイプ II の存在は軟骨遺伝子表現型の発現を促進した。このことから、コラーゲン・タイプ II は単独で牛骨髄細胞からの MSC の軟骨形成を誘導・維持する能力を有し、TGF $\beta 1$ はそれを劇的に促進することが判明した。

本研究の結果次のことが明らかになった。すはわち、1) 牛の骨髄から得られた細胞は、MSC として増殖性に優れた多分化能細胞であることが確認された。2) 牛の MSC は、ペレット培養系においていかなる生物学的刺激因子の添加なしに自発的に軟骨分化能を有する種特異性が明らかとなった。3) 関節軟骨の生理学的構成成分であるコラー

ゲン・タイプIIは牛MSCの軟骨形成を誘導・維持し、TGF β 1の添加によって軟骨形成を劇的に促進した。

本研究の成果によって、幹細胞研究における新たな動物実験モデルが提供されると共に、MSCの軟骨形成に影響を及ぼす成長因子、培養系およびECMの役割と牛MSCにおける独特な軟骨分化の機序が明らかにされた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 永 徹
副 査 教 授 斉 藤 昌 之
副 査 教 授 岩 永 敏 彦 (医学研究科)
副 査 助 教 授 奥 村 正 裕

学 位 論 文 題 名

A Study on Chondrogenic Differentiation of Bovine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

(牛の骨髄間葉系幹細胞の軟骨分化能に関する研究)

骨髄には、骨、軟骨、脂肪および他の組織への分化能を有する間葉系幹細胞(MSC)が存在する。様々な動物種の MSC の性状が明らかにされつつあるが、現在のところ牛骨髄の MSC に関する有用な情報はほとんどない。以上のことから申請者は、動物の軟骨再生医療に資するため、牛骨髄 MSC の軟骨への分化能に関して基礎的に検討し、以下の成績を得た。

まず、牛骨髄の細胞からプラスチック培養器の底に付着して急速に増殖する性状を利用して分離した間葉系細胞は、他の動物種の MSC と同様な方法で、骨、軟骨および脂肪細胞へ分化させることができた。したがって、牛の骨髄から分離された間葉系細胞は増殖性に優れた多分化能を有する MSC であることが確認された。

次に、遠心後の細胞集塊であるペレット培養系における牛骨髄 MSC の軟骨分化能、ならびに他の動物で添加が必須といわれる強い軟骨原性を有する転換成長因子(TGF) β -1 の効果について検討した。その結果、牛の骨髄 MSC はペレット化した高密度三次元培養によって、TGF β -1 未添加でも軟骨細胞に分化することが初めて明らかにされた。

最後に、牛骨髄 MSC の軟骨細胞への分化は、コラーゲンタイプIIのヒドロゲル内培養において顕著であり、TGF β -1 の添加によって MSC の軟骨原性がさらに促進されることを明らかにした。

以上のように申請者は、これまで報告されている動物種と異なり、牛の骨髄 MSC が特異な軟骨分化様式を有することを明らかにした。これらの知見は軟骨再生医療に止まらず、骨髄幹細胞研究そのものに新しい動物実験モデルを提供するものと考えられた。

よって、審査員一同は、上記博士論文提出者 Dark BOSNAKOVSKI 氏が博士(獣医学)の学位を授与されるに十分な資格を有するものと認めた。