学位論文題名

Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells
through culture with chondrocytes to
produce adequate cartilage constructs in horses

(軟骨細胞との共培養による馬の骨髄間葉系幹細胞の
効率的軟骨分化に関する研究)

学位論文内容の要旨

競走馬において関節の損傷や疾患は、その能力を低下させる主な原因である。関節機能は、本質的に関節軟骨の状態に左右される。しかし、その軟骨の代謝には不明な点が多く、現段階では関節疾患の早期に軟骨で発生している病態を評価することは非常に困難である。また、関節軟骨の主要構造である硝子軟骨は、一度損傷を受けると完全には修復されない。そのため、細胞生物学的な手法を用いた軟骨再生の試みが行われてきた。軟骨再生への骨髄間葉系幹細胞の応用も行われてきたが、高度に細胞外基質を有する軟骨の再生に対する未分化な細胞の直接的適用は必ずしも効果的ではなく、可能な限り軟骨細胞に分化させて適用する必要がある。本研究の目的は、競走馬において、日常的な運動や関節疾患時に軟骨代謝にどの程度の障害があるのかを明らかにし、その上でその改善法の一つになりえる骨髄間葉系幹細胞の適用を実用化するために、同細胞の効率的軟骨分化法として軟骨との共培養法の効果を検証することである。

まず、日常的な調教を課されている育成中の競走馬における関節軟骨代謝の変動を、血清ケラタン硫酸(KS)濃度を測定することで評価した。本研究には、1歳馬 15頭および2歳馬 15頭、計30頭の育成馬を使用した。血液の採取は、運動の短期的な影響を排除するため、運動後4から12時間に行った。ケラタン硫酸濃度について、1/20/5D4抗体を用いた酵素免疫測定法(ELISA)で得られた濃度(KS5D4)および最近新たに公表された抗体を用いたELISAで得られた濃度(HSKS)の両方を検討した。その結果、従来使用されていたKS5D4では1歳馬と2歳馬の間に差はみられなかったが、HSKSでは、1歳馬に比較して2歳馬で有意に低値を示した。また、KS5D4とHSKS間に有意な相関はみられなかった。一般にKSHSKSは従来から一般的に使用されてきたKD5D4に比較してより小さい分子片を認識できることが指摘されている。このことから、HSKSの測定によってより詳細な軟骨異化の把握が可能と考えられた。これらのことから、骨格系が未成熟な馬において、通常運動により関節軟骨に大きな負荷がかかっていることが示唆された。

次に、離断性骨軟骨症(OCD)あるいは関節内骨折を発症した馬の罹患関節から採取した関節液を用いて軟骨基質の主成分であるコラーゲンの代謝を分析し、これら関節疾患時の軟骨変性の状況を評価した。

本研究には、OCD を発症した馬 12 頭および関節内骨折を発症した馬 6 頭の罹患関節および対側肢関節の計 36 関節から採取した関節液を使用した。コラーゲンの代謝は、関節液中の II 型プロコラーゲン C ペプチド (CPII) および II 型コラーゲン分解領域抗原 (C2C) 濃度を ELISA にて測定することで、それぞれ軟骨基質生成活性および分解活性を評価した。さらに、当該関節の関節鏡検査所見をスコア化し、あわせて分析した。その結果、OCD では対側肢関節に比較して罹患関節では関節液中 C2C 濃度が有意に増加し、関節内骨折では同様に CPII 濃度が有意に増加した。また、これら II 型コラーゲン代謝活性と関節鏡所見スコアとの間には相関がみられなかった。これらのことから、関節鏡所見にかかわらず、これら関節疾患を発症した関節においては、それぞれの病態による関節軟骨代謝が著しく変動しており、それによって将来の変形性関節症が誘発されることが推察された。

これらの結果から、運動および関節疾患において馬の関節軟骨代謝は変動しており、これが関節機能を悪化させる可能性が示唆された。関節軟骨の再生は関節機能維持において重要となるが、通常の内科的あるいは外科的手段では不可能である。そこで、骨髄間葉系幹細胞を用いた組織工学的治療の一助とするため、以下に軟骨細胞を軟骨分化誘導因子として用いる方法の確立を試みた。

まず、馬の骨髄液中のストローマ細胞を分離し、それら細胞内に含まれる骨髄間葉系幹細胞の多分化能を評価した。8 歳雄の軽種馬の胸骨から骨髄液を採取し、プレート上に播種した。付着した細胞を培養して増数、継後、脂肪分化、骨分化および軟骨分化を誘導した。脂肪分化誘導された細胞においては、細胞内にオイルレッド O に染色される脂肪滴が形成され、RT-PCR にて PPAR γ 2 の発現が確認された。骨分化誘導された細胞においては、von Kossa 染色陽性の細胞集塊が形成され、アルカリフォスファターゼも陽性であった。RT-PCR にて I 型コラーゲンおよびオステオカルシンの発現が確認された。軟骨分化誘導された細胞周囲にアルシアンブルーに染色される細胞外基質が形成され、RT-PCR により細胞内に I および II 型コラーゲン、アグリカンおよび SOX9 の発現が確認された。これらのことから、当該馬の胸骨骨髄のストローマ細胞には、多分化能を有する幹細胞が含まれることが確認された。

次に、上記の通り採取された骨髄間葉系幹細胞を含む細胞群 (以下、MSCs) と培養馬軟骨細胞を共培養することで、MSCs を効率的に分化できるかどうかを検討した。3 ヶ月齢の馬の関節から採取した軟骨から酵素処理によって軟骨細胞を単離し、単層で継代培養することで増数した。得られた軟骨細胞を使用時まで凍結保存した。形質転換増殖因子 (TGF) β 1 存在および非存在下で、MSCs と軟骨細胞を 1 対 1 で混合した細胞群 (M 群)、MSCs のみの細胞群 (S 群) および軟骨細胞のみの細胞群 (C 群) をそれぞれ遠心し、その細胞塊を pellet 培養した。形成された pellet 軟骨についてその正常を分析した。アルシアンブルー染色では、M 群で pellet 全領域が、C 群では中央部のみが陽性となった。S 群ではその染色性は非常に低かった。なお、これらの染色性における TGF β 1 の効果はみられなかった。Real time PCR では、硝子軟骨細胞の性質であるアグリカン、II 型コラーゲンおよび SOX9 の発現すべてにおいて M 群で最も強い発現がみられた。S 群では I 型コラーゲンの発現はみられたものの、アグリカン、II 型コラーゲンおよび SOX9 の発現はほとんどみられなかった。また、TGF β 1 添加の一定した効果はみられなかった。さらに、M 群では他の 2 群と比較して培養液中ケラタン硫酸量が最も多く検出された。以上の結果から、MSCs を生きた軟骨細胞と培養することにより、これまで報告された方法 (TGF β 1 添加による concentration 培養) より明らかに硝子軟骨に近い細胞への分化が誘導されたことが確認された。

以上の結果から、MSCs と軟骨細胞の共培養法は、MSCs をより関節内の軟骨細胞に近い状態に分化させる可能性を有することが示唆された。この方法に関する詳細はさらに検討すべき部分も多いが、停滞していた軟骨再生療法に可能性を提示でき、また、同様に細胞外基質を多く持つ組織の再生工学に活用されるものと期待された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 奥 村 正 裕
副 査 教 授 大 橋 和 彦
副 査 教 授 高 橋 芳 幸
副 査 准教授 高 木 哲

学 位 論 文 題 名

Differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells through culture with chondrocytes to produce adequate cartilage constructs in horses

(軟骨細胞との共培養による馬の骨髄間葉系幹細胞の
効率的軟骨分化に関する研究)

競走馬において関節の損傷や疾患は、その運動能力を低下させる主な原因の一つである。関節機能は、本質的に関節軟骨の状態に左右される。しかし、関節軟骨の主要構造である硝子軟骨は、一度損傷を受けると完全には修復されない。近年、骨髄間葉系幹細胞を応用した硝子軟骨の再生が試みられてきたが、高度に細胞外基質を有する硝子軟骨の再生における未分化な細胞の直接的適用は必ずしも効果的ではなく、それらを可能な限り軟骨細胞の機能を発揮できる状態に分化させる必要性が指摘されている。

本論文の第1章では、日常的な調教を課されている育成中の競走馬における関節軟骨代謝の変動を、血清ケラタン硫酸濃度を測定することで評価し、競走馬では通常のトレーニングにより関節軟骨に大きな負荷がかかっていることを明らかにした。

第2章では、離断性骨軟骨症あるいは関節内骨折を発症した馬の罹患関節から採取した関節液中のII型プロコラーゲンCペプチドおよびII型コラーゲン分解領域抗原濃度を測定することで、それぞれ軟骨基質生成活性および分解活性を評価し、それらを当該関節の関節鏡検査所見と比較分析した。その結果、これらの関節疾患では、関節鏡所見で観察されるより重度の軟骨代謝変動が生じていることが明らかとなった。

第1および2章の結果から、競走馬においては、通常のトレーニングや関節疾患によって関節が常に過酷な環境下にあることが判明した。そこで、以下の章では、骨髄間葉系幹細胞をより軟骨細胞に分化させる方法の確立を試みた。

第3章では、成馬から採取した骨髄液中のストローマ細胞を分離し、それら細胞内に含まれる骨髄間葉系幹細胞の多分化能（骨分化、軟骨分化および脂肪分化）を評価し、その性質を明らかにした。

第4章では、採取された骨髄間葉系幹細胞を含む細胞群（以下、MSCs）と3ヶ月齢の馬の関節から採取した同種軟骨細胞を共培養することで、従来の方法では線維軟骨様細胞への分化しかなかったMSCsをより関節内の硝子軟骨細胞に近い状態に分化させることに成功した。

本研究によって得られた成果は、停滞していた軟骨再生療法に可能性を提示できるものと期待されるだけでなく、申請者の考案した方法は高度に細胞外基質を有する他の組織の再生医療にも示唆を与えうるものと判断された。

以上のように申請者は、損傷軟骨の修復を目的にした骨髄間葉系幹細胞の応用において重要な知見を提示した。よって、審査委員一同は、上記博士論文提出者ビビアン レトリー氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。