

学位論文題名

遺伝子導入した間葉系幹細胞を用いた
関節軟骨再生に関する生物工学的研究

学位論文内容の要旨

関節軟骨は自己修復能力の非常に乏しい組織であり、一度損傷された軟骨組織は自然治癒によって完全には再生しない。そこで、軟骨損傷に対する治療法として、人工関節置換術や自家軟骨移植等の治療法が行われてきたが、それぞれ欠点を有し満足できる治療法は未だに確立されていない。そのような背景の中で近年、間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) を関節軟骨の欠損部に移植する方法が有望な軟骨再生治療法として提案されたが、MSC を軟骨欠損部に移植するだけでは完全な軟骨組織を再生させることはできなかった。これは、移植先の環境下で MSC の軟骨分化を促進するタンパク質 (サイトカイン) の濃度が不十分であるため、MSC が完全な軟骨細胞に分化できなかったことが原因と考えられた。そこで本研究では、サイトカイン遺伝子を導入した MSC を移植することで、MSC 自身をサイトカインの供給源として軟骨再生効果を高めることを考えた。

ここで、本治療法の実現のためには、発がん性や免疫拒絶反応の危険性がない安全で高効率な遺伝子導入法の検討、および導入遺伝子を高発現させるプロモーターの設計が必須である。さらには、サイトカイン遺伝子を高発現可能な MSC の軟骨再生に対する有効性を、実験動物 (*in vivo*) を用いず組織培養下 (*ex vivo*) で簡便に評価する必要もあった。

したがって、本論文では、MSC に対する安全で高効率な遺伝子導入法の検討、および MSC に対して高発現な新規のプロモーターの構築と評価を行った。また、遺伝子導入 MSC の軟骨再生に対する効果をハイスループットに評価できる *ex vivo* 軟骨欠損モデルを構築し、新規プロモーターを用いた遺伝子導入 MSC の評価を行った。

第 1 章は序論であり、本研究の背景と目的を明らかにした。

第 2 章では、安全な非ウイルス遺伝子導入法の中で、一般的に導入効率が高いとされるリポフェクション法とヌクレオフェクション法のヒト MSC に対する遺伝子導入手段としての有効性を比較した。その結果、ヌクレオフェクション法の方がリポフェクション法よりも約 9 倍も高い遺伝子発現量が得られた。さらに、細胞回収率を考慮に入れた遺伝子発現の収量においてもヌクレオフェクション法の方が約 7 倍の遺伝子発現量が得られた。また、ヌクレオフェクション法では、移植を想定し異なるドナーの MSC や異なる分裂回数の MSC へ遺伝子導入しても安定して 40% 以上の高い遺伝子導入効率が得られた。したがって、ヌクレオフェクション法が本治療法において有効な遺伝子導入法であることが明らかとなった。

第 3 章では、MSC に対して高発現が得られる高活性なプロモーターの構築を行うとともに、それらの MSC の軟骨分化に対する有効性を評価した。最初に、MSC の単層増殖培養下において種々のプロモーターの発現効率を比較した。その結果、サイトメガロウイルス DNA 由来の

エンハンサー (CMVE) にヒト I 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎮プロモーター (Col1A1p) を連結した新規の CMVE-Col1A1p が従来のサイトメガロウイルスプロモーター (CMVp) よりも高発現が得られることが確認された。次に、種々のプロモーターに軟骨分化を促進するサイトカインである TGF- $\beta 3$ 遺伝子を連結したベクター DNA を構築し、これらのベクターを導入した MSC を 3 次元軟骨分化培養することで、プロモーターが TGF- $\beta 3$ 産生と MSC の軟骨分化に及ぼす影響を調べた。その結果、CMVE にヒト I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎮プロモーター (Col1A2p) を連結した CMVE-Col1A2p の下流に TGF- $\beta 3$ 遺伝子を連結した pCMVE-Col1A2p/TGF- $\beta 3$ ベクターを MSC に導入すると、従来の pCMVp/TGF- $\beta 3$ ベクターを導入するよりも TGF- $\beta 3$ を高発現できるとともに、従来の TGF- $\beta 3$ タンパクの添加による軟骨分化法より顕著に軟骨分化を促進できることが確認された。したがって、pCMVE-Col1A2p/TGF- $\beta 3$ ベクターが軟骨再生に最も有望なプロモーターであると考えられた。

第 4 章では、軟骨欠損の再生を評価するのに、実際の移植環境下に近い *ex vivo* 軟骨欠損モデルの作製を検討した。初めに、ブタ足関節軟骨組織上への軟骨欠損の作製方法を検討した。その結果、グラインダーで高速回転させた極小の球状カッターを用いることで軟骨細胞や軟骨マトリクスの流出などをほとんど伴わずに欠損を作製できることが確認された。次に、軟骨欠損内におけるヒト MSC の最適な培養方法を検討した。その結果、ブタ骨軟骨ディスクに作製した欠損内ではヒト MSC は分解され軟骨様組織は形成されないが、骨を分離した軟骨ディスク上の欠損内でヒト MSC は十分な軟骨様組織を形成できることが確認された。したがって、異種のヒト MSC でも欠損内で軟骨様組織を形成させることが可能な軟骨欠損モデルの構築に成功した。

第 5 章では、第 4 章で構築した軟骨欠損モデルの培養系を用いて、MSC 移植に用いるサイトカインやサイトカイン遺伝子を導入した MSC の軟骨再生に対する効果の評価が可能であるかを検討した。初めに、サイトカイン濃度、種類に関して評価を行った。その結果、TGF- $\beta 3$ を添加していない増殖培地で MSC を播種した軟骨欠損モデルを培養すると、軟骨マトリクスの少ない組織が欠損内に形成されたのに対し、TGF- $\beta 3$ を含む従来の軟骨分化培地で培養すると豊富な軟骨マトリクスを含む軟骨様組織の形成が認められた。この結果は動物実験において過去に示された結果と一致したことから、本軟骨欠損モデルによって動物実験を再現できる可能性が示唆された。また、軟骨分化培地で培養した MSC は欠損の表層で纖維芽状、欠損の深部で球状の細胞形態を示し、これらの形態は天然の軟骨組織の表層（纖維芽状）と中間層（球状）に見られる軟骨細胞の形態とそれと類似していた。これらの結果から、本軟骨欠損モデルは移植下の微小環境を良く反映したモデルであると考えられた。次にこのモデルを用いて、軟骨再生を促進するサイトカインの一種である FGF-2 および MSC の軟骨再生に対する効果の評価を試みた。その結果、FGF-2 を添加した軟骨分化培地で MSC を播種した軟骨欠損モデルを培養すると、欠損内に天然の軟骨組織の 2 倍以上の高細胞密度の纖維性の軟骨様組織が形成した。この結果から、MSC を FGF-2 とともに移植すると本来の軟骨組織が再生できない可能性が示唆された。最後に、第 3 章で構築した pCMVE-Col1A2p/TGF- $\beta 3$ ベクターを導入した MSC の軟骨再生に対する効果の評価を行った。その結果、pCMVE-Col1A2p/TGF- $\beta 3$ ベクターを導入した MSC は従来の TGF- $\beta 3$ を添加した軟骨分化培地で培養した MSC よりも明らかに豊富な軟骨マトリクスを含む軟骨様組織を欠損内に形成した。この結果から、pCMVE-Col1A2p/TGF- $\beta 3$ ベクターが遺伝子導入 MSC を用いた軟骨再生治療法に有用なベクター DNA となり得ることが明らかとなった。

第 6 章は、本研究の総括である。本研究では、*ex vivo* 軟骨欠損モデルの構築に成功したこと、動物実験を行うことなく pCMVE-Col1A2p/TGF- $\beta 3$ ベクターの有効性を明らかにした。したがって、今後の pCMVE-Col1A2p/TGF- $\beta 3$ ベクターの早期の臨床利用が期待される。

学位論文審査の要旨

主査 教授 高木 瞳
副査 教授 田口 精一
副査 教授 大利 徹

学位論文題名

遺伝子導入した間葉系幹細胞を用いた 関節軟骨再生に関する生物工学的研究

近年、軟骨細胞への分化能を有する間葉系幹細胞 (MSC) を関節軟骨の欠損部に移植する方法が有望な軟骨再生治療法として提案されたが、MSC を軟骨欠損部に移植するだけでは移植先の環境下で MSC の軟骨分化を促進するタンパク (サイトカイン) の濃度が不十分であるため、完全な軟骨組織を再生させることはできなかった。そこで本研究では、サイトカインの遺伝子を導入した MSC を移植することで、MSC 自身をサイトカインの供給源とし軟骨再生効果を高めることを考えた。ここで、本治療法の実現のためには、安全で高効率な遺伝子導入法の検討、および遺伝子を高発現させるプロモーターの設計が必須である。さらには、サイトカイン遺伝子を導入した MSC の軟骨再生に対する有効性を、実験動物 (in vivo) を用いず組織培養下 (ex vivo) で簡便に評価する必要もある。

したがって、本論文では、MSC に対する安全で高効率な遺伝子導入法の検討、および MSC に対して高発現な新規のプロモーターの構築と評価を行った。また、MSC の軟骨再生に対する効果を評価できる ex vivo 軟骨欠損モデルを構築し、新規プロモーターを用いたサイトカイン遺伝子導入 MSC の評価を行った。

第 1 章は序論であり、本研究の背景と目的を明らかにした。

第 2 章では、遺伝子導入法の中でも安全性と導入効率が高いとされるリポフェクション法とヌクレオフェクション法のヒト MSC に対する有効性を比較した。その結果、ヌクレオフェクション法の方がリポフェクション法よりも約 7 倍も高い遺伝子導入効率が得られ、ヌクレオフェクション法が MSC に対して有効な遺伝子導入法であることが確認された。

第 3 章では、MSC に対して高発現が得られる高活性なプロモーターの構築を行うとともに、それらの MSC の軟骨分化に対する効果を評価した。その結果、新規に構築した CMVE-Col1A2 プロモーターにサイトカインである TGF- β 3 の遺伝子を連結した pCMVE-Col1A2p/TGF- β 3 ベクターを MSC に導入すると、MSC は 30 ng/ml 以上の TGF- β 3 産生を伴って従来の TGF- β 3 タンパクの添加 (10 ng/ml) による軟骨分化法より顕著な軟骨分化を示した。したがって、pCMVE-Col1A2p/TGF- β 3 ベクターは軟骨再生に有望なプロモーターであると考えられた。

第 4 章では、実際の移植環境下に近い ex vivo 軟骨欠損モデルの作製を検討した。その結果、ブ

タ骨軟骨ディスクに作製した欠損内ではヒト MSC は分解されたが、骨を分離した軟骨ディスク上の欠損内でヒト MSC は十分な軟骨様組織を形成できることが確認された。したがって、異種のヒト MSC でも評価可能な軟骨欠損モデルの構築に成功した。

第 5 章では、第 4 章で構築した軟骨欠損モデルを用いて TGF- β 3 遺伝子を導入した MSC の軟骨再生に対する効果の評価を行った。最初に、TGF- β 3 を添加していない培地で軟骨ディスクを培養すると、欠損内の MSC は軟骨マトリクスの少ない組織を形成したのに対し、TGF- β 3 を含む培地で培養すると MSC は豊富な軟骨マトリクスを含む軟骨様組織を形成した。この結果は過去の動物実験での結果と一致したことから、本軟骨欠損モデルによって動物実験を再現できる可能性が示唆された。また、軟骨分化培地で培養した MSC は欠損の表層で繊維芽状、欠損の深部で球状の細胞形態を示し、これらの形態は天然の軟骨組織の表層と中間層に見られる軟骨細胞の形態とそれぞれ類似していた。この結果から、本軟骨欠損モデルは移植下の微小環境を良く反映したモデルであると考えられた。最後に、第 3 章で構築した pCMVE-Col1A2p/TGF- β 3 ベクターを導入した MSC の軟骨再生に対する効果の評価を行った結果、pCMVE-Col1A2p/TGF- β 3 ベクターを導入した MSC は TGF- β 3 を添加した培地で培養した MSC よりも明らかに本来の軟骨に近い軟骨様組織を形成した。この結果から、pCMVE-Col1A2p/TGF- β 3 ベクターが遺伝子導入 MSC を用いた軟骨再生治療法に有用なベクター DNA となり得ることが組織レベルで明らかとなった。

これを要するに、軟骨再生に適した pCMVE-Col1A2p/TGF- β 3 ベクターを構築するとともに、ex vivo 軟骨欠損モデルの構築にも成功したことで、動物実験を行うことなく pCMVE-Col1A2p/TGF- β 3 ベクターの有効性を明らかにしたものであり、動物細胞培養工学および再生医療工学に貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士（工学）の学位を授与される資格あるものと認める。