

学 位 論 文 題 名

骨髄間葉系幹細胞を用いたスキャフォールドフリー 軟骨様組織作製に関する培養プロセス工学的研究

学位論文内容の要旨

関節軟骨は骨端部に覆われており、関節運動において軟骨下骨に掛かる外力を分散・吸収して摩擦の危険性を低下させることによって、長年耐えられる構造を有した特殊な組織である。しかし、軟骨組織は血管・神経・リンパ管を欠き、組織中の細胞が少なく、その周囲に密度の高い ECM が存在し、細胞自体が高度に分化しているためほとんど分裂増殖しないことなどから一度欠損すると修復は非常に困難となる。現在までに様々な治療法が検討されてきたが、未だその有効性は確認されていない。今後もより一層深刻さを増し続ける高齢化社会に向け、変形性関節症などの関節疾患を持つ患者の QOL に多大な影響を及ぼすことから、一刻も早い治療法の確立が期待される。そこで、我々は今回新たに間葉系幹細胞 (MSC) を用いた治療法について検討した。

臨床応用を主眼に置いた場合、患者に対する安全性を考慮することは非常に重要である。例えば、MSC の長期増殖培養中、細胞がその後の工程の安全性に相応しくない変化を生じる危険性が考えられた。さらに、細胞接着材料に起因する安全上の問題が懸念されるためスキャフォールドを用いない培養方法の開発が課題であった。

したがって、これらの問題を解決するため、本論文では軟骨様組織を作製するための培養プロセスにおける増殖及び分化・三次元化工程に関する研究を行い、将来の実用化を目指した最適な培養プロセスを提案した。

以下に各章ごとに得られた結果をまとめて示した。

第 1 章では、序論として本研究の背景と目的を明らかにした。

第 2 章では、MSC の継代増殖培養を行い、培養中の細胞集団に生じる変化について調べた。10% FBS 含有 DMEM 培地を用いて継代増殖培養を行った結果、MSC の増殖能が徐々に低下し、細胞形態は MSC の特徴である細長さを失う傾向を示した。それに伴い MSC のマーカーと言われている CD90 と CD166 陽性細胞の割合が減少した。さらに、軟骨細胞に特異的な遺伝子であるアグリカン遺伝子の発現が継代増殖するにつれて徐々に上昇した。細胞形態からも、軟骨細胞と考えられる接着面積と多角形度が両方とも大きい細胞の割合が増加する傾向が認められた。したがって、継代増殖培養を行うと MSC が少なくとも一部は軟骨細胞に分化していき、細胞集団の不均一性が増大することが示唆された。

第 3 章では、MSC の分化を抑制し、未分化能を維持したまま均一な細胞集団として増殖させることのできる培養方法の検討を行った。MSC の増殖能に FBS のロット差が影響するという結果を得たことから、FBS の割合を低減することによって不均一性を抑制できるのではないかと考えられた。低血清濃度でも増殖可能にするために市販培地の MF-medium を検討した結果、0.1% FBS 含

有 MF-medium では 10% FBS 含有 DMEM 培地と同等の高い増殖能を示すだけでなく、小さく細長い細胞及び CD90 と CD166 陽性細胞の割合が高く維持され、アグリカン遺伝子の発現も低く抑えられることが判明した。また、接着面積と多角形度が両方とも大きい細胞の割合も FBS 濃度が高い培地と比べて低く抑えられた。この結果から、FBS の濃度を低くすることで MSC 増殖培養中の分化を抑えることができ、比較的均一な細胞集団を獲得できることが考えられた。

第 4 章では、一定の大きさと形状を持つスキャフォールドフリー軟骨細胞シートを作製するための培養条件を検討した。まず、細胞数の検討を行った結果、多孔性膜であるセルカルチャーインサートを用いて培養した場合、接着面積 0.3 cm^2 当たり 18.6×10^5 cells が最適な細胞数であることが分かった。一方、それよりも少ない細胞数ではシートが収縮し、多い細胞数では均一な厚さのシートが作製できないことが分かった。また、様々な開孔率のセルカルチャーインサートを用いて培養し、開孔率が及ぼす影響を調べた結果、開孔率が最も高い 12% の膜を使用することにより、収縮しないシートを作製できることが分かった。したがって、スキャフォールドを用いずに一定の大きさの細胞シートを作製する方法が明らかになった。

第 5 章では、スキャフォールドフリー細胞シートにおける MSC の軟骨分化状態を調べた。その前に、まず最適な内部標準遺伝子の検討を行った結果、 ΔCt 法と geNorm の両方の評価方法において 18S リボソーム RNA が最も安定に発現している遺伝子であることを示した。次に、作製したスキャフォールドフリー細胞シートの軟骨関連遺伝子の発現を調べた結果、ペレット培養と比べてアグリカン及び II 型コラーゲン遺伝子の発現が大幅に高いことが判明した。さらに、sGAG 蓄積量を DMMB 法とアルシアンブルー組織染色で調べた結果、シートの方が豊富に蓄積していることを確認した。これらの結果から、シートはペレットよりも軟骨組織に近い構造物であることが示された。最後に、シート培養の方がペレット培養よりも軟骨分化しやすい理由として酸素環境の違いを推察した。その結果、シートは酸素濃度がペレットよりも低くなっている可能性が高いことが計算により分かった。さらに、シートの方が GAPDH 遺伝子、HIF-1 α 遺伝子の発現が高く、シート内部が低酸素環境下にあることが示唆された。したがって、シート培養の方がペレット培養よりも MSC が軟骨分化度が高かった原因の一つに、構造物内部が生体軟骨組織により近い低酸素環境下になっていたからだと推測された。

第 6 章では、総括として本研究で得られた成果についてまとめた。

本研究では、軟骨組織修復を目的とした理想的な軟骨様組織を、MSC を用いて作製するための増殖培養及びシート培養による分化培養プロセスを提案した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 高 木 睦

副 査 教 授 田 口 精 一

副 査 教 授 大 利 徹

学 位 論 文 題 名

骨髄間葉系幹細胞を用いたスキャフォールドフリー 軟骨様組織作製に関する培養プロセス工学的研究

関節軟骨は骨端部を覆っており、軟骨下骨に掛かる外力を分散・吸収して摩耗の危険性を低下させ、長年耐えられる特殊な組織である。しかし、軟骨組織は血管・神経・リンパ管を欠き、組織中の細胞が少なく、その周囲に密度の高い細胞外マトリックスが存在することなどから一度欠損すると修復は非常に困難となる。現在までに様々な治療法が検討されてきたが、未だその有効性は確認されていない。今後もより一層深刻さを増し続ける高齢化社会に向け、変形性関節症などの関節疾患を持つ患者の QOL に多大な影響を及ぼすことから、一刻も早い治療法の確立が期待される。そこで、我々は今回新たに間葉系幹細胞 (MSC) を用いた治療法について検討した。

臨床応用を主眼に置いた場合、患者に対する安全性を考慮することは非常に重要である。例えば、MSC の長期増殖培養中、細胞がその後の工程の安全性に相応しくない変化を生じる危険性が考えられた。さらに、安全上の問題が懸念されるためスキャフォールドを用いない培養方法の開発が課題であった。

したがって、これらの問題を解決するため、本論文では軟骨様組織を作製するための培養プロセスにおける増殖及び分化・三次元化工程に関する研究を行い、将来の実用化を目指した最適な培養プロセスを提案した。

以下に各章ごとに得られた結果をまとめて示した。

第 1 章では、序論として本研究の背景と目的を明らかにした。

第 2 章では、MSC の継代増殖培養を行い、培養中の細胞集団に生じる変化について調べた。10% FBS 含有 DMEM 培地を用いて継代増殖培養を行った結果、MSC の増殖能が徐々に低下し、細胞形態は MSC の特徴である細長さを失う傾向を示した。それに伴い MSC のマーカー CD90 と CD166 の陽性細胞の割合が減少した。さらに、軟骨特異的遺伝子であるアグリカンの発現が継代増殖するにつれて徐々に上昇した。細胞形態からも、軟骨細胞と考えられる接着面積と多角形度が大きい細胞の割合が増加する傾向が確認された。したがって、継代増殖培養を行うと MSC が少なくとも一部が軟骨細胞に分化し、細胞集団の不均一性が増大することが示唆された。

第 3 章では、MSC の分化を抑制し、未分化状態を維持したまま均一な細胞集団として増殖できる培養方法の検討を行った。そこで、FBS 濃度の低減化を考えた。低血清濃度でも増殖可能な MF-medium を使用した結果、FBS を 0.1% に低減しても高い増殖能を示すだけでなく、小さく細

長い細胞及び CD90 と CD166 陽性細胞の割合が高く維持され、アグリカン遺伝子の発現も低く抑えられることが判明した。このことから、FBS の濃度を低くすることで MSC 増殖培養中の分化を抑えることができ、比較的均一な細胞集団を獲得できることが示された。

第 4 章では、一定の大きさや形状を持つスキャフォールドフリー軟骨細胞シートを作製するための培養条件を検討した。まず、細胞数の検討を行った結果、多孔性膜であるセルカルチャーインサートを用いて培養した場合、接着面積 0.3 cm^2 当たり 18.6×10^5 cells が最適な細胞数であることが分かった。これよりも多くても少なくとも収縮や亀裂が生じることが分かった。また、様々な開孔率 (=孔面積/接着面積) のセルカルチャーインサートを用いて培養した結果、最も高い 12% の膜を使用することにより、収縮しないシートを作製できることが分かった。したがって、スキャフォールドを用いずに一定の大きさの細胞シートを作製する方法が明らかになった。

第 5 章では、スキャフォールドフリー細胞シートにおける MSC の軟骨分化状態を調べた。作製した細胞シートの軟骨特異的遺伝子の発現を調べた結果、ペレットと比べてアグリカン及び II 型コラーゲン遺伝子の発現が大幅に高かった。また、DMMB 法とアルシアンブルー染色で調べた結果、シートは sGAG 蓄積量も高いことが分かった。これらの結果から、シートの方が軟骨組織に近い構造物であることが示された。最後に、シート培養が軟骨分化しやすい理由として酸素環境に違いがあることを推察した。計算した結果、シートはペレットよりも酸素濃度が低くなっている可能性が高いことが分かった。また低酸素関連遺伝子である GAPDH、HIF-1 α 遺伝子の発現がシートで高かった。したがって、シート培養の軟骨分化度が高かった原因の一つに、構造物内部が生体軟骨組織に近い低酸素環境下になっていたからだと推測された。

これを要するに、軟骨組織修復を目的とした理想的な軟骨様組織を、MSC を用いて作製するための増殖培養及びシート培養による分化培養プロセス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。