

学位論文題名

Repair of Rabbit Osteochondral Defects by an Acellular Technique with an
Ultrapurified Alginate Gel Containing Stromal Cell-Derived Factor-1(ケモカインSDF-1含有高純度アルギン酸ゲルを用いた
無細胞移植治療による家兎骨軟骨欠損の修復)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 関節軟骨は自己修復能力に乏しく、特に広範囲欠損においては硝子軟骨での修復は期待できない。手術治療に関しても、これまでのdrillingやmicrofractureといった骨髄刺激手技では線維軟骨での修復しか得られない。これに対し、近年、欧米を中心に行われている非荷重部位の軟骨組織から単離した軟骨細胞を欠損部に移植する自家軟骨細胞移植術(ACD)は関節軟骨本来の硝子軟骨での修復が可能な理想的な手技と考えられてきた。しかし、最近の比較臨床研究においては、従来の方法と比べその臨床成績は必ずしも優れたものではないとの報告も散見される。その理由の一つとして、ACI施行に伴う侵襲の大きさが挙げられる。我々は関節鏡視下移植手術が可能な高純度低エンドトキシナルギン酸ゲル(UPALゲル)を用いた軟骨再生医療に取り組んできた。このアルギン酸ゲルは骨髄間葉系細胞(BMSC)からの優れた軟骨分化誘導能を持つことも証明されてきた。我々は、骨軟骨損傷部周囲に存在するBMSCを効率的に骨軟骨欠損部に誘導できれば、細胞を移植せずにUPALゲルを用い誘導されたBMSCを基盤として関節軟骨を修復できるのではという仮説をたてた。

Stromal cell-derived-factor 1(SDF-1)は損傷組織に発現し、幹細胞や前駆細胞をリクルートする作用を持つケモカインである。過去に、骨軟骨損傷の修復を目的にSDF-1を応用した報告はない。本研究の最終目的は、家兎骨軟骨欠損に対し高純度アルギン酸ゲルを用いSDF-1を局所投与することにより、細胞移植を行わずに軟骨組織修復が可能であることを組織学および生体力学的に証明することである。

【方法】 本研究は国立大学法人北海道大学動物実験委員会による承認を得ており、本大学動物実験施設における動物保護ガイドラインに従っている。20週齢の日本白色家兎の膝関節を切開し大腿骨滑車部に直径4.5mm、深さ3mmの骨軟骨欠損を作成し、骨軟骨欠損モデルとして用いた。UPALゲルにSDF-1を含有したSDF-1群、またコントロールとしてBSAを含有したVehicle群、アンタゴニストであるAMD3100含有のAMD3100群、未治療の欠損群を設定した。

骨軟骨欠損部でのSDF-1蛋白の発現を免疫組織染色およびWestern blottingを用い評価した。

in vivoにおける細胞集積の評価として、欠損モデル作成後1週に各群のアルギン酸ゲルを取り出し、組織標本作成後、細胞数を定量評価した。

肉眼的評価ならびに組織学的・免疫組織学的評価はNiederrauerらの評価法を使用し、再生組織の評価を行った。術後4週・16週目の組織標本を作成し、Safranin-O染色、抗I型コラーゲン染色、抗II型コラーゲン染色を行い評価した。

力学的評価として再生軟骨様組織の圧縮強度を島津製作所の卓上型精密万能試験機を用いて測定した。

in vitroにおける細胞活性試験・細胞浸潤試験・アルギン酸ゲルに包埋したBMSCの軟骨分化の評価をそれぞれCell Counting Kit-8、CytoSelect 96-well cell migration assay、組織

学的評価(HE染色、抗I型コラーゲン染色、抗II型コラーゲン染色)にて評価した。

統計学的解析は統計ソフトGraphPad Prismを使用し、2群間比較はunpaired 2-tailed Student's *t* test、多群間比較は1-way ANOVAにより有意差検定を行った。 $p < 0.05$ を統計学的有意差とした。

【結果】免疫組織染色にて欠損作成後1週の骨軟骨欠損部でSDF-1蛋白の発現を認めた。一方、欠損作成後3時間、2週、4週およびsham群では発現が認められなかった。Western blottingにおいても同様の結果が得られた。

in vivoの細胞集積評価ではSDF-1群はコントロール群と比較し明らかに細胞浸潤の増加を認めた。

肉眼的評価ではSDF-1群においてのみ軟骨様の修復を認め、評価スコアもコントロール群に比較し有意に高かった。組織学的・免疫組織学的評価ではSDF-1群は正常軟骨下骨の構築・軟骨組織のII型コラーゲンでの染色・平滑な軟骨表面・tidemarkの形成などの硝子様軟骨組織による損傷部の修復を認めた。評価スコアもコントロール群よりも有意に良好であった。

力学的評価においてSDF-1群の圧縮強度は無治療群と比較し明らかな改善を認め、正常軟骨のおおよそ81%の強度に達した。

in vitroの系ではBMSCの浸潤試験においてSDF-1群はコントロール群と比較し有意に増加した。細胞活性試験およびアルギン酸ゲルに包埋したBMSCの軟骨分化能評価のための組織・免疫組織学的評価ではSDF-1群とコントロール群の群間に明らかな差は認められなかった。

【考察】本研究の目的は高純度アルギン酸ゲルを用いSDF-1を局所投与することにより、家兎軟骨欠損部の修復が促進されることを証明することである。SDF-1治療群はコントロール群と比較し組織学的評価と力学的評価において有意に軟骨修復を促進していた。したがって、SDF-1含有UPALゲルを用いた無細胞移植治療の骨軟骨損傷に対する有効性が証明された。

骨軟骨損傷部周囲に損傷後1週目で一過性にSDF-1蛋白の発現を認めた。さらに、アンタゴニストであるAMD3100の局所投与では骨軟骨欠損部の修復は阻害された。これらの結果よりSDF-1は生体内での軟骨再生過程の早期において重要な役割を担っていることが示された。

損傷の修繕過程にはfiblin clotの形成およびclot内への未分化幹細胞のリクルートなどが含まれる。リクルートされた細胞は硝子軟骨組織ではなく、主に線維性軟骨組織修復を促進する。損傷部周囲の細胞のリクルートという点において、SDF-1治療群はコントロール群と比較し術後1週目の時点で有意に欠損部に浸潤した細胞数が増加した。またin vitroの系における細胞浸潤試験でもSDF-1はBMSCの浸潤細胞数が増え、in vivoの系の結果と矛盾しない。これらの結果はSDF-1の細胞遊走効果によりBMSCを主体とする局所細胞の骨軟骨欠損部への浸潤・集積が促進され、UPALゲルの持つ高い軟骨細胞分化誘導能によりBMSCから軟骨細胞への分化さらには硝子様軟骨組織の再生が促進されたと推測される。

【結論】高純度アルギン酸ゲルを用いてSDF-1を投与することで、硝子軟骨様組織による良好な骨軟骨修復が獲得できた。SDF-1による細胞遊走効果により損傷部周囲のBMSCを効率良く集積させることで、骨軟骨欠損に対する無細胞移植治療の可能性が示唆された。この無細胞移植治療の研究を基礎とした治療は、現在行われている標準的なACI手技の問題点を解決し、より低侵襲で医療コストの削減を可能とする軟骨再生技術の実現を可能とするであろう。

学位論文審査の要旨

主査	准教授	飛 驒 一 利
副査	教授	三 浪 明 男
副査	教授	安 田 和 則
副査	教授	鐘 邦 芳

学位論文題名

Repair of Rabbit Osteochondral Defects by an Acellular Technique with an Ultrapurified Alginate Gel Containing Stromal Cell-Derived Factor-1

(ケモカインSDF-1含有高純度アルギン酸ゲルを用いた
無細胞移植治療による家兎骨軟骨欠損の修復)

申請者は、家兎骨軟骨欠損に対し SDF-1 を導入した高純度アルギン酸ゲルを用いることにより、細胞移植を行うことなく軟骨組織修復が可能である可能性を組織学的および生体力学的に示した。また、受傷後 1 週における骨軟骨欠損部での SDF-1 タンパクの発現、SDF-1 が BMSC に与える影響について詳細に解析し、その研究結果を報告した。

受傷後1週の組織学的検討において、骨軟骨欠損部にSDF-1タンパクの発現を認め、受傷後3時間、2週、4週およびsham群では発現が認めなかった。また同タンパクの発現は、Western blotting法においても同様の結果が確認された。in vivoにおけるSDF-1の細胞集積能を評価したところ、SDF-1群はコントロール群と比較して、明らかな細胞浸潤の増加を認めた。また、同実験系において再生軟骨組織を評価したところ、肉眼的評価においてSDF-1群では軟骨様の組織修復を認めた。組織学的・免疫組織学的評価においてSDF-1群は、正常軟骨下骨の構築・軟骨組織のII型コラーゲンでの染色・平滑な軟骨表面・tidemarkの形成などの硝子様軟骨組織に特徴的な損傷部の修復を認めた。また、組織学的評価スコアにおいても、コントロール群と比較し有意に高かった。生体力学的評価においても、SDF-1群の圧縮強度は、無治療群と比較し明らかな改善を認め、その圧縮強度は正常軟骨のおよそ81%に達した。SDF-1がBMSCに与える影響についてin vitroにて検討を行った結果、SDF-1群はBMSCの細胞浸潤能を有意に増加させたが、細胞増殖能およびアルギン酸ゲルに包埋した軟骨組織への分化能には影響を与えないことが明らかとなった。これらの結果は、SDF-1がBMSCの細胞特性に直接影響を及ぼすのではなく、細胞浸潤(細胞遊走)に影響を与えること

により、軟骨組織再生を促進させている可能性を示唆している。

以上の結果より、高純度アルギン酸ゲルにSDF-1を含有させることで、硝子軟骨様組織による良好な骨軟骨修復が可能なが示された。また、SDF-1含有高純度アルギン酸ゲルは、骨軟骨再生医療に有用である可能性が証明された。本結果は、細胞移植を行わない軟骨組織修復治療の可能性を示唆するものであった。

主査の飛騨准教授からは、1) OA(変形性関節症)は今回の実験で用いられたゲルでの治療ターゲットではないのかとの質問、2) SDF-1を人体に使用した際の具体的な副作用についての質問、3) 論文に記載されているSDF-1の徐放試験の結果を学位審査論文に記載しなかった理由に関する質問を受けた。副査の安田教授からは4) *in vivo*でのcell homing assayに関して、集積した細胞をBMSCと同定できなかつたと学位審査論文に記載されているが、その詳細について、5) AMD3100とは具体的にどのような化合物か、6) 今回の研究で使用したゲルを臨床応用する際には、埋植試験が必要になると考えられるが、埋植試験はすでに行っているのか、との質問を受けた。副査の鑑教授からは、7) 家兎の骨軟骨欠損モデルにおける欠損の大きさ(サイズ)の妥当性、8) 圧縮試験を行う際の生体力学的妥当性、9) スコアリングを行う際の2人の検者における盲検法の統計学的妥当性に関して質問を受けた。副査の三浪教授からは10) 今回の研究で用いたゲルの将来的展望、11) SDF-1の臨床応用について質問を受けた。申請者はいずれの質問に対しても、自己の実験データや過去の報告を引用しながら概ね適切な回答をなし得た。

この論文は、ケモカインであるSDF-1タンパクを骨軟骨再生分野に応用し、良好な軟骨再生が得られた初の研究である。SDF-1による細胞遊走能促進効果により、損傷部周囲の細胞を効率良く集積させることによって、骨軟骨欠損に対する無細胞移植治療の可能性が示唆された。本研究でターゲットとしている細胞移植を行わずに組織を再生させる試みは、現在行われている標準的なACI手技の問題点を解決し、より低侵襲で医療コスト削減を可能とする軟骨再生の実現を可能とする技術と考えられる。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。