



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	骨軟骨欠損に対する高純度アルギン酸ゲルと骨髄穿刺濃縮細胞併用移植の検討 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	徐, 亮
Description	配架番号 : 2536
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14071号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78019
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Liang_Xu_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 徐 亮 (Liang Xu)

学 位 論 文 題 名

骨軟骨欠損に対する高純度アルギン酸ゲルと骨髄穿刺濃縮細胞併用移植の検討
(Therapeutic effect of ultra-purified alginate gel containing bone marrow aspirate concentrate on
osteochondral defects in a rabbit model)

【背景と目的】関節軟骨には、血管新生がなく、細胞分裂活性の低い軟骨細胞が極めて少ないため、自然治癒能力が非常に限られている。軟骨組織再生に必要な生物学的環境には幹細胞、成長因子、および生物学的足場が不可欠である。我々はこれまで、生物学的足場として、軟骨細胞分化誘導能を有するアルギン酸から夾雑物を可能な限り排除した、高純度アルギン酸(Ultra-purified alginate: UPAL)ゲルを開発し、その有用性を示してきた。一方、幹細胞要素として、骨髄間葉系幹細胞(Bone marrow derived-mesenchymal stem cells: MSCs)は細胞分化能と再生組織内でのパラクライン効果を有するために、軟骨や骨組織再生に対する再生医療のための細胞源として着目されている。我々はこれまで UPAL ゲルと MSCs との併用移植による軟骨再生実験において、UPAL ゲルは MSCs に対して細胞増殖および軟骨細胞分化を促進させ良好な軟骨再生を誘導することを示した。しかしながら、十分量の MSCs を移植するためには、生体外で細胞増殖培養を行う必要があるため、二期的な治療を要するという問題点が考えられる。

この問題点を解決するため、我々は術中に作成できる骨髄穿刺濃縮細胞液(Bone marrow aspirate concentrate: BMAC)に着目した。BMAC は、骨髄液の遠心分離により軟骨再生に重要な働きをする MSCs と液性成長因子を含有した濃縮細胞液である。BMAC は骨髄液の遠心操作だけで作成することができるため生体外の細胞培養を必要としないため、一期的な治療に使用することができる。我々は、MSCs に対する細胞増殖能および軟骨分化誘導能に優れた UPAL ゲルと BMAC を組み合わせることにより一期的かつ効果的に軟骨再生を誘導できる可能性があると考えた。本研究の目的は骨軟骨欠損に対する UPAL ゲルと BMAC の併用移植による軟骨及び軟骨下骨の再生効果を検討することである。

【対象と方法】動物欠損モデルとして、日本白色家兔(雄、24 週齢)の膝関節に対して、大腿骨滑車部に骨軟骨欠損(直径 5mm×深さ 2mm)を作成した。BMAC は術中に腸骨から穿刺採取した骨髄液を遠心分離して作成した。各膝を無治療群(Defect 群)、UPAL ゲル単独移植群(UPAL 群)、UPAL ゲルと他家 MSCs 併用移植群(UPAL+MSC 群)、UPAL ゲルと自家 BMAC 併用移植群(UPAL+BMAC 群)の 4 群に無作為に振り分けた。術後 4 週と 16 週における欠損部の修復について肉眼的評価(ICRS スコア, n=10)、組織学的評価(Niederauer スコア, n=10)、軟骨下骨の再生について Micro-CT 評価(軟骨下骨の骨量, n=10)を行った。術後 16 週において、II 型コラーゲンの組織学免疫染色及び HE 染色組織検体を用いて偏光顕微鏡によるコラーゲン配向性の評価(n=10)と修復組織における力学強度の評価(n=6)を行った。統計学的検討には Steel-Dwass 検定を用いた。

【結果】肉眼的評価では、術後 4 週においては、Defect 群では欠損の辺縁部のみに僅かな不透明な線維様組織が見られた。UPAL 群、UPAL+MSC 群では欠損部は部分的にやや不透明な組織で修復され、修復組織の表面には大きな陥凹や亀裂が見られた。UPAL+BMAC 群では表面やや平坦な半透明な硝子軟骨様修復組織で満たされていた。全体的なスコアリングでは UPAL+BMAC 群がほかの三群に比べ

有意に優れていた。術後 16 週においては、Defect 群では部分的な不透明な線維組織修復は見られた。UPAL 群と UPAL+MSC 群では全体的には修復されたが、半透明な修復組織表面は小さな陥凹や亀裂も見られた。一方で、UPAL+BMAC 群では周囲正常組織とほぼ同じ性状のある表面平滑な組織により覆われ、主に硝子様軟骨組織で修復されていた。全体的なスコアリングでは術後 4 週のものと同様に UPAL+BMAC 群は他群に比べ、有意に優れていた。

組織学的評価では、術後 4 週においては、Defect 群ではほぼ Safranin-O に染色されない線維性の癒痕組織で修復され、UPAL 群と UPAL+MSC 群では修復組織に Safranin-O に染色された硝子様軟骨組織が一部見られ、UPAL+BMAC 群では Safranin-O に染色された硝子様軟骨組織が多く見られた。拡大像において、Defect 群では修復組織に中等度の炎症細胞浸潤を認めたことに比べ、ほかの三群ではほぼ炎症所見を認めていなかった。全体的なスコアリングでは、UPAL+BMAC 群は他群に比べ、有意に優れていた。術後 16 週においては、Defect 群では修復組織に硝子様軟骨組織は一部見られたが、半分以上は Safranin-O に染色されない線維組織であり、欠損部周囲の正常軟骨部の Safranin-O 染色も減少しており変性が示唆された。UPAL 群と UPAL+MSC 群の修復組織では半分～半分以上に Safranin-O に染色された硝子様軟骨が占めていた。それに対して、UPAL+BMAC 群では欠損部周囲正常軟骨とほぼ同じ性状と厚さのある Safranin-O に強く染色された硝子様軟骨組織で覆われていた。また拡大像所見において、全群では、明らかな炎症所見を認めなかった。軟骨下骨の修復において、Defect 群ではほぼ見られていなかったが、UPAL 群及び UPAL+MSC 群では、部分的な軟骨下骨の修復が見られた。一方で、UPAL+BMAC 群では、広範囲な軟骨下骨の修復が見られていた。

Micro-CT を用いた軟骨下骨の骨量の評価においても、UPAL+BMAC 群では修復された軟骨下骨の骨量では、術後 4 週と 16 週とも Defect 群と UPAL 群に比べ、有意に高かった。同様に術後 16 週において、UPAL+BMAC 群の修復部におけるコラーゲン配向性、力学強度も他群に比べ有意に優れていた。

【考察】本研究ではUPALゲルとBMACの併用移植することにより、ウサギモデルを用いて、大きな骨軟骨欠損に対して良好な軟骨及び軟骨下骨組織の修復があることを示した。BMACはMSCsも含める豊富な細胞成分と液性因子を含み、scaffoldと併用することで良好な軟骨分化能を示すと報告がある一方で、単独投与の治療効果は確実ではないとの報告もあるから、BMAC移植に最適なScaffoldを選別することが重要と考えられている。なお、過去の検討結果において、UPALゲルはMSCsの細胞増殖能及び軟骨分化能を促進することがあるから、BMACと併用することで、BMAC内に含まれる豊富なMSCsに対して軟骨形成を促進することが考えられた。また、BMAC中に含まれるTGF- β 、PDGF、BMP-2、BMP-7などの液性因子は、MSCsに対する軟骨細胞及び骨細胞への分化誘導能もあるから、MSCsの良好なscaffoldとするUPALゲル内で、細胞と液性因子の相乗効果により、同時に良好な軟骨及び軟骨下骨再生が得られたことに従って、良好な力学特性のある再生組織が得られたと考えられた。

【結論】UPALゲルとBMACを併用することにより、大きな骨軟骨欠損に対して良好な軟骨及び軟骨下骨の修復効果があることを示した。移植したBMAC内に含まれる豊富なMSCsが足場であるUPALゲル内で軟骨や軟骨下骨に分化することで軟骨および軟骨下骨が修復したと考えられた。本法を用いることで細胞移植を要する大きな骨軟骨欠損に対して一期的に治療できる可能性を示した。本検討は、従来法では治療することが困難であった重度関節軟骨障害に対する、新たな低侵襲治療法を提案するものであり、本検討結果は、その実現可能性を充分に実証するものである。