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［全文の要約］
Author(s)	徐, 亮
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2536 他
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/2115/78020
Type	doctoral thesis
File Information	Liang_Xu_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文(要約)

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)

2020 年 3 月 24 日

北海道大学

徐　亮(XU LIANG)

【背景と目的】

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、軟骨細胞分化誘導能を有する高純度アルギン酸（Ultra-purified alginate: UPAL）ゲルを開発し、その生体内移植に関する有用性を示してきた。しかし一方で、大きな骨軟骨欠損に対して UPAL ゲル単独投与では修復効果が不十分である問題も報告された。幹細胞要素として、骨髄間葉系幹細胞（Bone marrow derived-mesenchymal stem cells: MSCs）は軟骨や骨組織再生に対する再生医療の細胞源として UPAL ゲルと併用することで軟骨及び軟骨下骨修復を促進することが認められたが、それほど大量な MSC 細胞を得るためには、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も考えられる。今回我々は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り、生体外の細胞培養を必要としないため、豊富な細胞や液性因子が一期的に確保できる。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 を併用することで、UPAL ゲル単独投与では修復が不十分な大きな骨軟骨欠損に対して、一期的かつ効果的に軟骨及び軟骨下骨の再生が可能ではないかという仮説を立て検証した。

【対象と方法】

動物欠損モデルとして、過去の研究結果を参考にして日本白色家兎(雄、24 週齢、52 匹（104 膝））の膝滑車部に UPAL 単独で修復が見込めないサイズ（直径 5mm、深さ 2mm）の骨軟骨欠損を作成した。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（骨量計測，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。統計解析は、群間の多重比較は Kruskal-Wallis test を用い、Steel-Dwass test で事後検定した。有意水準は 0.05 以下とした。

【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瘢痕組織で修復され、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な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 群の修復組織におけるコラーゲン配向性及び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、UPALゲル単独で修復が不十分であった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。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を明らかにした。さらに、骨髄液（骨髄刺激法）と併用することにより、硝子軟骨の再生を促進することは報告された。しかし、大きな骨軟骨欠損に対して、この併用法では十分な修復が得られていなかった。一方、UPALゲルと高濃度のMSCsと併用することで、大きな骨軟骨欠損に対して、良好な組織修復効果が得られたが、それほど大量な細胞を得るため、一度生体外細胞増殖培養が必要なため、二期的な手術を要する問題点も報告されている。本研究に用いたBMACは骨髄液の遠心分離により濃縮なMSCsと液性成長因子が一期的に確保できるため、骨髄液との併用に比べ、より良好な軟骨修復が得られ、軟骨の量だけではなく組織学的な質の向上にも寄与したと考えている。また、BMACは骨折後骨癒合不全に対して、骨癒合を促進した報告もあるため、UPALゲルとBMACを併用することにより、軟骨修復のみならず軟骨下骨の修復も認められた。

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があり、MSCsの良好なscaffoldとするUPALゲル内で、濃縮なMSC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、UPAL ゲル単独投与で修復が不十分であった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、従来法では治癒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。