HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ハイドロキシアパタイト複合化ダブルネットワークハイドロゲル上での骨髄間葉系幹細胞の骨分化能評価 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	甲斐原, 拓真
Description	配架番号：2753
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15435号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89882
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	KAIBARA_Takuma_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　甲斐原　拓真

学 位 論 文 題 名

ハイドロキシアパタイト複合化ダブルネットワークハイドロゲル上での
骨髄間葉系幹細胞の骨分化能評価
（Hydroxyapatite-hybridized double-network hydrogel surface enhances differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to osteogenic cells）

【背景と目的】変形性膝関節症は、関節軟骨の損傷に起因する関節疾患である。関節軟骨組織は細胞密度が低く、細胞外マトリックスを豊富に含む組織で潤滑作用と衝撃吸収作用を有する一方で、無血管組織であることから自然治癒能力に乏しい組織であり、損傷軟骨を治療するための様々な治療法が開発されてきた。近年になって、正常関節軟骨に似た組成と材料特性を有するハイドロゲルが人工軟骨の候補材料として注目され、研究・開発が進められてきた。しかし、これまで開発されてきたハイドロゲルは強度が不十分であり、構成成分の大半が水分であるために骨に直接することができないことが問題であった。そのため、ハイドロゲルを用いた人工軟骨は未だに膝関節などの荷重関節において臨床応用には至っていない。我々の研究グループは、人工軟骨として応用可能な材料特性（高強度・低摩耗性・生体内低分解性・高生体親和性）を有する PAMPS/PDMAAm double network (DN) ゲルを開発した。更に、ハイドロキシアパタイト（hydroxyapatite: HAp）を複合化した HAp/DN ゲルは生体内で高い親和性を示し、骨組織と強固に接着することを報告してきた。ゲルと骨の接着様式は、ゲル表面に形成される骨組織において産生される細胞外マトリックスがゲル内部に侵入し、ゲルと骨が直接接着するという全く新しい様式であった。この現象は、HAp/DN ゲル表面が骨髄に存在する間葉系幹細胞（mesenchymal stem cell: MSC）を早期に骨系統細胞へ分化誘導することによって生じることが示唆された。本研究の目的は、HAp/DN ゲル表面が骨髄由来 MSC を骨系統細胞へ分化誘導することが可能かを明らかにすることである。

【材料と方法】日本白色家兎の大腿骨骨髄から分離・培養した細胞（bone marrow-derived cell: BMDC）が MSC としての性質を有するかを検討するために、１）コロニー形成ユニットアッセイ、２）フローサイトメトリーとイムノブロッティング法による MSC 表面マーカーの検出、３）３系統の間葉系細胞（骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞）への多分化能評価を行った。BMDC の培養には、同種血清もしくはウシ胎児血清を含有した培養液を用いた。MSC を通常培養皿のポリスチレンディッシュ（polystyrene dish : PS dish）、DN ゲル、HAp/DN ゲル、HAp 焼結体上で培養した場合の各種評価を行った。細胞形態の観察は位相差顕微鏡と 3D レーザー顕微鏡を用いて行った。ゲルが血清含有タンパク質を吸着する能力は、ゲルを血清に浸漬する前後の表面タンパク質を全反射フーリエ変換赤外分光法で測定した。MSC の骨系統細胞への分化評価は、骨分化マーカーの定量 RT-PCR 及び ALP 活性を用いて行った。骨分化マーカーは初期マーカーとして、*TGF-β1*、*BMP2*、*Runx2* と *Col-1* を用い、中・後期のマーカーとして *ALP*、*OPN*、*BSP* および *OCN* を用いた。HAp/DN ゲルと HAp 焼結体からのカルシウムイオンとリンイオンの溶出挙動を誘導結合プラズマ発光分析にて評価した。HAp/DN ゲル表面の元素量をエネルギー分散型 X 線分光法にて定量評価を行った。*In vivo* での HAp/DN ゲル周囲に形成される組織を評価するために日本

白色家兎の大腿骨外側顆にプラグ状のゲルを埋植し、移植後 3 日、7 日、14 日に組織学的および免疫組織学的評価を行った。

【結果】家兎 BMDC を同種血清含有培地で培養すると、１）コロニー形成能を示し、２）MSC 表面マーカーが陽性で、３）３系統の間葉系細胞（骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞）への多分化能を示した。しかし、ウシ胎児血清含有培地で培養するとこれらの MSC としての性質は観察されなかった。同種血清含有培地で培養する BMDC、即ち MSC を HAp/DN ゲル上で培養すると、HAp/DN ゲル表面の微細な粗造構造上に紡錘状形態を示し接着していた。HAp/DN ゲルを血清含有培養液に浸漬させると血清タンパク質を広く吸着していた。HAp/DN ゲル上で 1 週間培養した MSC の骨形成マーカー（*TGFβ1*、*BMP-2*、*Runx2*、*Col-1*、*ALP*、*OPN*、*BSP*、*OCN*）の mRNA 発現量は、他の３つの基材上での発現量と比較して有意に亢進した（$P < 0.0001$）。培養２週では骨分化早期マーカー（*TGFβ1*、*BMP-2*、*Runx2*、*Col-1*）が 1 週と比較して有意に低下した。中・後期の骨分化マーカーである *ALP*、*OPN*、*BSP* の遺伝子発現レベルは、14 日目においても上昇が維持されていた。PS dish、DN ゲル、HAp 焼結体で培養した MSC では、*Runx2* 以外の骨分化マーカーに有意な発現変化を認めなかった。HAp/DN ゲルに浸漬させた培養液中のカルシウムイオンとリンイオン濃度は経時的に漸増し、14 日後では HAp 焼結体と比較して有意に高値であった（$P < 0.001$）。MSC 培養条件下での HAp/DN ゲル表面のカルシウムイオンとリンイオンの元素強度は、7 日と比較して 14 日時点で減少していた。ALP 活性は、HAp/DN ゲル上で培養した MSC で、他の基材上で培養した MSC と比較して有意に亢進した（$P < 0.0001$）。*in vivo* ゲル埋植実験では、DN ゲル表面では周囲に線維性組織が形成されるのみであったのに対して、HAp/DN ゲル周囲の組織では埋植後 3 日で MSC マーカー（CD44・CD105）陽性細胞がリクルートされ、7 日で Runx2 陽性・OCN 陰性の骨芽細胞が観察され、14 日で Runx2 陰性・OCN 陽性の骨細胞を含む類骨形成が確認された。

【考察】

本研究では、骨髄由来 MSC を HAp/DN ゲル上で培養すると骨分化マーカーの遺伝子発現と ALP 活性が早期に上昇したことから、HAp/DN ゲルが骨髄由来 MSC の骨系統細胞への分化を早期に誘導したことが示された。MSC がどのように HAp/DN ゲルに接着しているかを明らかにするために 3D レーザー顕微鏡で HAp/DN ゲルの表面構造と、細胞の HAp/DN ゲルへの接着像を観察した。HAp/DN ゲルはミクロ的に表面が粗造であり、この構造上に MSC が紡錘形状を示しながら接着していた。HAp のミクロ的に粗造な表面構造が細胞の接着に有利との報告があり、HAp/DN ゲルの表面構造が MSC の接着に適していると考えられた。血清でプレコーティングした HAp では細胞接着能が亢進するとの報告があり、実際に本研究では、HAp/DN ゲルはフィブロネクチンなどの接着タンパク質を含む血清含有タンパク質を吸着していた。これらの研究成果から、MSC は HAp/DN ゲルの微細な表面構造と吸着した血清タンパク質を足場にして接着と増殖をしていることが示唆された。

次になぜ HAp/DN ゲルは MSC を骨系統細胞へ分化誘導することができるのか検討した。本研究の結果で、HAp/DN ゲルからカルシウムイオンとリンイオンが 14 日間漸増的に溶出し、実際に HAp/DN ゲル上で MSC を培養する条件では HAp/DN ゲル表面のカルシウムイオンとリンイオンの元素量が 7 日と比較して 14 日で減少していた。カルシウムイオンやリンイオンは MSC の骨分化誘導を促進するとの報告があり、本研究では HAp/DN ゲル上で培養された MSC がカルシウムイオンとリンイオンを利用して骨系統細胞へ分化したことを示唆している。

HAp/DN ゲルを *in vivo* で家兎大腿骨に移植したところ、HAp/DN ゲル表面に、3 日で MSC マーカー陽性細胞、7 日で骨芽細胞、14 日で骨細胞を含む類骨形成が観察された。これは *in vitro* の実験で実証された MSC が骨系統細胞へ分化する現象の一連の過程が *in vivo* でも観察されたと考えられた。

【結論】

本研究では HAp/DN ゲル表面が骨髄由来 MSC を骨系統細胞へ分化誘導することを明らかにした。