



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15435
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89973
Type	doctoral thesis
File Information	KAIBARA_Takuma.pdf



学 位 論 文

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)

2023 年 3 月

北 海 道 大 学

甲斐原 拓真

学 位 論 文

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)

2023 年 3 月

北 海 道 大 学

甲斐原 拓真

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
方法	10 頁
結果	19 頁
考察.....	31 頁
結論	36 頁
謝辞	37 頁
利益相反	38 頁
引用文献	39 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究は以下の論文に発表した。

Kaibara T, Wang L, Tsuda M, Nonoyama T, Kurokawa T, Iwasaki N, Gong JP, Tanaka S, Yasuda K. Hydroxyapatite-hybridized double-network hydrogel surface enhances differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to osteogenic cells. J Biomed Mater Res A. 110, 747-760, (2022)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Kaibara T, Wang L, Tsuda M, Nonoyama T, Kurokawa T, Kondo E, Iwasaki N, Gong JP, Tanaka S, Yasuda K: Hydroxyapatite-hybridized Double-network Hydrogel Surface Enhances Differentiation of Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells to Osteogenic Cells. Orthopaedic Research Society Annual Meeting, February 4-8, 2022 Tampa Florida, USA.

2. Kaibara T, Wang L, Tsuda M, Nonoyama T, Kurokawa T, Onodera T, Kondo E, Iwasaki N, Gong JP, Tanaka S, Yasuda K: Hydroxyapatite-hybridized Double-network Hydrogel Recruits Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells and Differentiates Them to Osteogenic Cells In Vivo. International Cartilage Regeneration & Joint Preservation Society, April 12-15, 2022, Berlin, Germany.

3. 甲斐原拓真、王 磊、津田真寿美、野々山貴行、黒川孝幸、龔劍萍、岩崎倫政、田中伸哉、安田和則：ハイドロキシアパタイト複合化ダブルネットワークゲル（HAp/DN ゲル）上での骨髄間葉系幹細胞の骨分化能評価、第 36 回日本整形外科学会基礎学術集会、2021 年 10 月 14 日・15 日、三重県伊勢市

要旨

【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- β 1、*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（*TGF β 1*、*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（*TGF β 1*、*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、骨髓由来 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 ゲルが骨髓由来

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。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

PVA	polyvinyl alcohol
FDA	Food and Drug Administration
DN	Double network
PAMPS	poly- (2-acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid)
PDMAAm	poly- (N,N'-dimethylacrylamide)
MBAA	N,N'-methylenebiscrylamide
HEPES	4- (2-HydroxyEthyl) -1-Piperazine Ethane Sulfonic acid
HAp	Hydroxyapatite
MSC	Mesenchymal stem cell
ABS	Autogenous blood serum
BMDC	Bone marrow-derived cell
PS	Polystyrene
FBS	Fetal bovine serum
PBS	Phosphate-buffered saline
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse transcription - polymerase chain reaction
GAPDH	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase
SEM	Scanning electron microscope
ALP	Alkaline phosphate
Runx2	Runt related transcription factor 2
Col-1	Collagen type 1
ALP	Alkaline phosphatase
OPN	Osteopontin
BSP	Bone sialoprotein
OCN	Osteocalcin
TGF- β 1	Transforming growth factor- β 1
BMP-2	Bone morphogenetic protein 2

緒言

変形性膝関節症

変形性膝関節症は、加齢や外傷により膝関節の軟骨に摩耗や変性が生じ、関節変形や機能障害が生じる疾患である。本邦における変形性膝関節症の有病率は60歳以上の男性で47%、女性で60%と報告されており、推定患者数は2500万人以上とされている(Muraki et al., 2009)。世界的に見ても、高齢化の加速に伴い、変形性膝関節症の患者数は増加することが予想される。関節軟骨組織は、細胞外マトリックスに富む組織で潤滑作用と衝撃吸収作用を有する一方で、組織学的に血管を持たないという他の組織では見られない特徴があり、損傷に対する自然治癒能力は非常に乏しい(Bhosale and Richardson, 2008)。損傷した軟骨を放置すると、軟骨の損傷範囲は拡大し、軟骨下骨の変性が進み変形性関節症に至る。変形性膝関節症では、膝関節の疼痛や可動域制限を引き起こし、日常生活の質を著しく低下させ、社会活動への参加も制限される。変形性膝関節症を含む関節疾患による要支援・要介護認定者の割合は2019年国民生活基礎調査によると6.9%で第5位となっており社会的問題となっている。更に、変形性膝関節症患者では心血管疾患や糖尿病などの内科的疾患の発症リスクが高いことが報告されている(Hall et al., 2016)。この様に本疾患の高い有病率と自然治癒しない特徴から、医療経済的な影響は計り知れない。そのため、変形性膝関節症に対する有効な治療法の開発が強く求められている。

変形性膝関節症の治療は、一般的には生活指導、運動療法、内服療法、ヒアルロン酸関節内注射などの保存療法から始まる。保存療法の有効性が報告されているが、前述の様に軟骨損傷は自然治癒しないことから治癒は望めない(Crawford et al., 2013)。保存療法に抵抗を示す症例や疼痛が強く日常生活に支障をきたすようになると外科的手術療法が考慮される。手術法は患者の年齢や軟骨・半月板・靱帯の状態によって決定される(Abramoff and Caldera, 2020)。小さく限局する関節軟骨病変に対しては、骨髄刺激法が選択されることが一般的である。骨髄刺激法は、関節軟骨欠損部位の軟骨下骨に小さな骨孔を穿ち、骨髄に存在する間葉系細胞を軟骨欠損部に誘導することによって軟骨再生を図る簡便な手法であり、良好な臨床成績が報告されている(Steadman et al., 1997)。しかし、骨髄刺激法によって再生される軟骨は線維軟骨であり、正常の軟骨で見られる硝子軟骨ではない(Furukawa et al., 1980)。線維軟骨は硝子軟骨と比較して力学的に劣るため、適応面積は限られており、かつ長期の臨床成績は望めない(Mithoefer et al., 2009)。

そのため、大きな軟骨損傷に対して適応可能な自家骨軟骨柱移植術や自家培

養軟骨移植術などの手術法が開発されてきた。自家骨軟骨柱移植は健全な非荷重部位から関節軟骨と軟骨下骨を円柱状に一塊にして採取し、関節軟骨損傷部に移植する手術法である(Matsusue et al., 1993)。自家骨軟骨柱移植術では正常の硝子軟骨組織で治療できる利点があり、良好な長期臨床成績が報告されている(Dekker et al., 2021)。しかし、この手術法は健全軟骨を犠牲にせざるを得ず、採取可能な軟骨の面積が限られていることや採取部位の変性変化が生じるリスクといった問題点がある。

自家培養軟骨移植は、健全な非荷重部位から採取した少量の軟骨を生体外で培養・増殖させ、軟骨欠損部に移植する手術法である(Brittberg et al., 1994; Krill et al., 2018)。本手術法の良好な臨床成績が報告されている一方で、正常な軟骨組織で観察される層構造が得られないとの報告や移植軟骨の肥大や脱落などの合併症により再手術率が13-68%とも報告されている(Adachi et al., 2014; Harris et al., 2011; Pareek et al., 2016)。また、培養軟骨の成熟には2年以上の期間を要することから長期のリハビリ期間を必要とする(Niemeyer et al., 2008)。

このように膝関節軟骨損傷に対して、様々な治療法が開発・応用されてきたが確立された治療法はなく、新たなコンセプトを持った手術法の開発が期待されている。既存の手術法の限界を克服するためには、健全軟骨を犠牲にすることなく、軟骨損傷部のみを置換する新たな手術法の開発が望まれている(Arakaki et al., 2010)。

人工軟骨開発研究の現状

損傷した関節軟骨を人工材料で置換するという研究は数多く行われてきた。人工軟骨に使用される材料には、膝関節で繰り返し生じる荷重や摩擦の負荷に耐えられる材質が必要となる。即ち、非吸収性で生体適合性が高く、高強度かつ低摩擦性の材質が求められる。金属やポリエチレンなどの素材を人工軟骨として用いる研究が行われてきたが、材料力学特性として硬すぎて相対する関節軟骨が損傷してしまうことから、軟骨の代替材料としては適していない(Bavaresco et al., 2000; Custers et al., 2007)。そこで、人工軟骨の候補材料として、関節軟骨と近い含水量と弾性率を有するハイドロゲルが注目されている。その一つとして、polyvinyl alcohol (PVA) の研究が報告され、2016年にはFDA (Food and Drug Administration) により認可された(Bray and Merrill, 1973; Oka et al., 2000)。しかし、強度、耐疲労性や耐摩耗性の問題があり、その適応は非荷重部の母趾第一中足趾節関節に限られており、未だに荷重関節での臨床応用には至っていない。更には、これらのハイドロゲルは骨に直接接着できないために、金属を介在させるなどの工夫がなされてきたが、脱転のリスクが報告されている(Kobayashi and Oka, 2004)。

PAMPS/PDMAAm DN ゲルの人工軟骨としての応用可能性

PAMPS/PDMAAm Double network (DN) ゲルは、第一のネットワークとして poly-(2-acrylamido-2-methylpropane sulfonic acid) (PAMPS)、第二のネットワークとして poly-(N,N'-dimethylacrylamide) (PDMAAm) を組み合わせて創出されたハイドロゲルである(Jian Ping Gong, 2003)。第一のネットワークは硬くて脆い性質であるのに対し、第二のネットワークは軟らかく伸縮性を持ち、物理的特性の対照的な 2 種類のポリマーネットワークを重合させることによって、破断強度が 3.1 MPa と強靱な DN ゲルが合成される(Yasuda et al., 2005)。

PAMPS/PDMAAm DN ゲルと組成の異なる 3 種類の DN ゲルの pin-on-flat 摩耗試験では、PAMPS/PDMAAm DN ゲルが一番高い耐摩耗性を示し、実際の人工関節で用いられているポリエチレン (UHMWPE : Ultra-high molecular weight polyethylene) に匹敵していた(Yasuda et al., 2005)。この DN ゲルを家兎皮下に移植し 6 週間後に破断強度と破断歪みを測定すると、移植前と比較して素材の劣化はなく、周囲の炎症も軽度であった(Azuma et al., 2007; Tanabe et al., 2008)。また、*ex vivo* における 2 つの接触面での摩擦係数の測定結果では

PAMPS/PDMAAm DN ゲルと正常軟骨の接触面では 0.029 であり、正常軟骨間の摩擦係数の 0.188 と比較して有意に低かった(Arakaki et al., 2010)。実際にこの DN ゲルを家兎大腿骨滑車に移植すると移植後 12 週まで、相対する膝蓋骨の関節軟骨に組織学的変化は観察されなかった(Arakaki et al., 2010)。この様に DN ゲルが人工軟骨として応用可能な生体材料特性を有することが立証されてきたが、この DN ゲルの水分含有率は 94%であり、他のハイドロゲルと同様に構成成分の大半が水分であることから、移植基底面である骨に接着することができないことが臨床応用への障壁となっていた。

骨に接着可能な HAp/DN ゲルの開発

DN ゲルが骨に接着できない問題を解決するために、DN ゲルにハイドロキシアパタイト (hydroxyapatite: HAp) を複合化した HAp/DN ゲルを開発した(Nonoyama et al., 2016)。強アルカリ性の高濃度溶液に短時間浸漬する交互浸漬法により、DN ゲル内に HAp を析出し複合化した HAp/DN ゲルを作製した。HAp/DN ゲル表面の HAp 層内部は、600 nm の HAp ナノ結晶が集積した直径 10 μm の多数の点状凝集体から構成されている(Nonoyama et al., 2016)。この HAp/DN ゲルを家兎大腿骨に移植すると、早期かつ強固に周囲の骨に固着することが示された(Wada et al., 2016)。移植した HAp/DN ゲルの内部 HAp 結晶濃度が上昇していた。この結果から HAp/DN ゲルと骨の接着様式は、ゲル表面に形成された骨組織から産生する細胞外マトリックスがゲル内部に侵入することに

よって生じると考えられた。この現象の初期段階で、HAp/DN ゲルが周囲の骨髄組織内に存在する間葉系幹細胞を骨系統細胞へ早期に分化誘導することが考えられた。そこで本研究の目的は、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。

方法

1. DN ゲルおよび HAp/DN ゲルの合成方法

1.1 DN ゲルの作製方法

PAMPS/PDMAAm DN ゲルの合成は、我々の研究グループが過去に報告した二段階重合法を用いた(Jian Ping Gong, 2003)。合成するための原料は 2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid (AMPS) (Toagosei Co. Ltd., Japan) と N,N'-dimethylacrylamide (DMAAm) (KOHJIN Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いた。架橋剤として、N,N'-methylenebisacrylamide (MBAA) (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan)、重合開始剤として 2-oxoglutaric acid (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Osaka, Japan) を用いた。1 対のガラス板に挟めたセルにモノマー、架橋剤および重合開始剤を含む水溶液を注入し、紫外線（波長 365 nm）を約 8 時間照射し、第 1 ネットワークである PAMPS ゲルを合成した。この PAMPS ゲルに MBAA および 2-2-oxoglutaric acid を含む DMAAm 溶液 (2 mol/L) に平衡に達するまで浸漬し、紫外線を約 8 時間照射して、PAMPS ゲルの網目構造内に第 2 ネットワークである PDMAAm を重合することで、PAMPS/PDMAAm ゲルを合成した。未反応物を除去するため 4- (2-Hydroxyethyl) -1-Piperazine Ethane Sulfonic acid (HEPES) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 緩衝液に浸漬し、毎日交換し平衡状態に達したものを細胞培養に用いた (Gong, JP *et al.*, 2014)。合成されたシート状の DN ゲルから円盤状（直径 35 mm、厚さ 2 mm）に型抜きし、*in vitro* の実験に用いた（図 1 A）。円柱状（直径 4.5 mm、厚さ 7.0 mm）に型抜きしたゲルプラグを *in vivo* 実験に使用した（図 1D）。

1.2 HAp/DN ゲルの作製方法

HAp/DN ゲルは過去に我々の研究グループが報告した方法に従って作製した (Nonoyama *et al.*, 2016)。最初に DN ゲルを 1M Tris 緩衝液に浸漬し、pH 9.0 のアルカリ性に調整した。次に、300 mM リン酸水素二カリウム (K_2HPO_4) 溶液に 110 秒間浸漬した後に純水で 10 秒間洗浄し、更に 500 mM 塩化カルシウム ($CaCl_2$) に 110 秒間浸透した後に再び純水で 10 秒間洗浄した。この過程を 5 回繰り返した。その後に $CaCl_2$ 水溶液 (500 mmol/L、pH 11.0) 中に浸漬し 37°C で 24 時間かけて平衡化し、最終的に DN ゲルの最外層に約 500 μ m 厚の HAp (Hydroxyapatite) ナノ粒子が生成された HAp/DN ゲルが作製された。円盤状と円柱状の HAp/DN ゲルを準備し、それぞれ *in vitro* と *in vivo* の実験に用いた（図 1 B、図 1 E）。

1.3 HAp 焼結体ディスクの準備

直径 35 mm、厚さ 1 mm の HAp 焼結体ディスクを企業に依頼し作製した (NGK Spark Plug Co., Ltd. Aichi, Japan)。

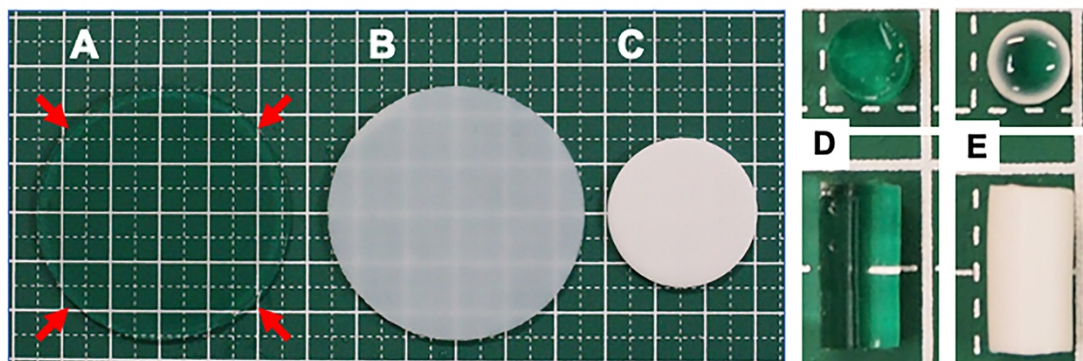


図 1 基材の外見写真。ディスク状の DN ゲル (A)、HAp/DN ゲル (B)、HAp 焼結体 (C)。円柱状の DN ゲル (D)、HAp/DN ゲル (E)

1.4 基材の物理的性質

DN ゲル、HAp/DN ゲル、HAp 焼結体の含水性と力学的特性を表 1 に示す。

表 1 : DN ゲル、HAp/DN ゲル、HAp 焼結体の含水性と力学的特性

		DN ゲル	HAp/DN ゲル	HAp 焼結体
構成成分 (%)	水	92.0	87.7	0.0
	ポリマー	8.0	8.2	0.0
	無機質	0.0	4.1	100
ヤング率 ^{a)} [MPa]		0.035 ± 0.004	0.084 ± 0.004	414 ± 4
90% 歪みでの応力 [MPa]		7.39 ± 0.48	9.50 ± 1.54	-
ヤング率 ^{b)} [MPa]		0.074 ± 0.001	0.159 ± 0.008	-
破壊応力 ^{b)} [MPa]		0.61 ± 0.03	0.45 ± 0.03	-
破壊歪み ^{b)} [mm/mm]		3.23 ± 0.36	1.64 ± 0.19	-

a)圧縮試験にて測定、b)引張試験にて測定

2. 家兔骨髓由来間葉系幹細胞の採取と培養方法

動物実験は、「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に則り、医学

研究科付属動物実験施設にて行った。体重 3.9 kg 以上の成熟した雌の日本白色家兎を用い、大腿骨の骨髓組織から間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell: MSC) を含む細胞を採取した。初めにイソフルランによる吸入麻酔で全身麻酔を導入し、左心室から 18 ゲージ針を用いて直接に血液を採取し、安楽死させた。採取した血液を 3,000 rpm で 10 分間遠心分離を行い、上清の血清を回収した。血清を 56°C で 30 分間加熱し、含有する補体を非働化した。この血清を RPMI1640 培地 (Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) に 10% の濃度で添加し、更に L-グルタミン (2 mM)、ペニシリン (100 unit/ml)、ストレプトマイシン (0.1 mg/ml) を添加した。この培地を "ABS (autogenous blood serum) 含有培地" として使用した。

次に大腿骨を切除・摘出し、ノミを用いて大腿骨矢状面に沿って半割した。大腿骨髓腔から鋭匙を用いて採取した骨髓組織を無血清 RPMI1640 培地に浸漬し、メスを用いて細分化した後、70 μ m セルストレーナー (BD falcon, Bedford, MA, USA) を用いて残渣を取り除き濾過した。濾過した試料を 1,000rpm で 5 分間遠心分離し、上清を除去した。0.75% 塩化アンモニウムを含む Tris 緩衝液に室温にて 20 分間静置し、赤血球を溶血させ取り除いた。無血清 RPMI1640 で再度洗浄し、1,000rpm で 5 分間遠心分離後に上清を除去して残ったペレットを、MSC を含む骨髓由来細胞 (Bone Marrow-Derived Cell: BMDC) として回収した。得られた BMDC の半分は、直径 60 mm の polystyrene (PS) dish 上で ABS 含有培地を用いて 37°C、5% CO₂ 下で 3 日間培養を行った。残り半分の BMDC は、ABS 含有培地の代わりにウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum: FBS) (Gibco® -life Technologies, Grand Island, NY, USA) を 10% 添加した "FBS 含有培地" で 3 日間培養を行なった。培地交換により PS dish 非接着細胞を除去した後、Trypsin-EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用いて PS dish に接着する細胞を回収した。回収した細胞を同じ条件下で培養を繰り返し、本研究では 3 継代目の細胞を使用した。

3. 細胞の形態観察

培養細胞の形態は、位相差顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて観察した。HAp/DN ゲルディスクは透光性が低いため、5% メタノールと 7.5% 酢酸に 7 日間常温で浸漬し漂白した。この処理により、HAp/DN ゲルディスクは半透光性となり位相差顕微鏡での細胞形態観察が可能となった。非透光性な HAp 焼結体では、漂白処理を行っても半透光性にする事ができないため、細胞の形態観察はできなかった。

4. 細胞増殖アッセイ

ABS 含有培地もしくは FBS 含有培地で培養した 3 継代目の BMDC を 60 mm PS dish に 5.0×10^4 個播種し、37°C、5% CO₂ 下で 4 日間培養した。PS dish に接着した細胞を Trypsin-EDTA で回収し、位相差顕微鏡 (Olympus) 下でセルカウンターを用いて細胞数を連日計測した。計測は異なるサンプルを用いて 3 回行った。

5. コロニー形成ユニットアッセイ

BMDC の自己複製能を調べるために、3 継代目の BMDC を 35 mm PS dish に 5.0×10^2 個播種し、3 日毎に細胞培養液を交換した。接種 10 日後に 4%パラホルムアルデヒドで 30 分間固定し、0.5%クリスタルバイオレット (Kanto Kagaku, Tokyo, Japan) で 10 分間、常温にて染色を行った。50 個以上の細胞を含みクリスタルバイオレットに染色されたコロニーを手動で数えた。計測は異なるサンプルを用いて 3 回行った。

6. フローサイトメトリー

3 継代目の BMDC を Trypsin-EDTA を用いて回収し、リン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline: PBS) で 2 回洗浄した後、4%パラホルムアルデヒドで 30 分間常温にて固定した。各特異的な一次抗体 [抗 CD44 (Bio-Rad, MCA806GA, Hercules, CA, USA)、抗 CD73 (Abcam, ab81720, Cambridge, UK)、抗 CD90 (Abcam, ab-225)、抗 CD105 (Abcam, ab107595) および抗 CD45 (Abcam, ab107; Bio-Rad, MCA808GA595) 抗体] を添加して、室温で 30 分間静置した。再度 PBS を用いて洗浄後、Alexa Fluor 488 標識二次抗体 (1:250 希釈、Invitrogen, Life Technologies Corporation, Oregon, USA) で処理し、FACS Canto II 装置 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を用いてフローサイトメトリー分析を実施した。二次抗体のみと反応した試料を陰性対照として使用した。陰性対照において陽性細胞が検出されないことを閾値とし、各表面抗原の陽性細胞比率を測定した。

7. イムノブロッティング法

解析対象の細胞に radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA lysis buffer) [1% Triton X-100、1 mM sodium orthovanadate (Na₃VO₄)、protease inhibitor mixture: Complete (EDTA-free) protease inhibitor (Roche, Basel, Switzerland)] を添加し、氷上にて 20 分間静置後、4°C で 15,000 rpm、10 分間遠心し、沈殿に注意して上清を回収した。回収した上清に 5×還元サンプルバッファー (5×Laemmli sample buffer) を添加し、95°C で 5 分間熱変性させ、イムノブロッティング法のサンプルとして用いた。10% SDS アクリルアミドゲルを用いて

SDS-PAGE を実施し、分離した蛋白質を PVDF 膜 (Millipore, Billerica, MA, USA) に転写した。転写後の PVDF 膜は TBS-T で希釈した 5% スキムミルク溶液を用いてブロッキング後、一次抗体と 4°C で一晩インキュベートを行った。TBS-T で 3 回洗浄後に二次抗体と室温で 1 時間インキュベートし、再度 TBS-T で洗浄後、ECLTM Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) による処理後、LAS 4000 mini (GE Healthcare) を用いてシグナルを検出した。一次抗体は抗 CD44 抗体 (Bio-Rad, MCA806GA)、抗 CD73 抗体 (Abcam, ab-81720)、抗 CD90 抗体 (Abcam, ab-225)、および抗 CD105 抗体 (Abcam, ab-107595) を使用した。

7. BMDC の多分化能評価

3 継代目 BMDC の 3 系統の間葉系細胞 (骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞) への多分化能を評価した。各系統への分化培地の組成を下記に示す。

骨芽細胞への分化誘導のために、10% ABS または 10% FBS を含む low-glucose RPMI1640 培地に 50 mg/ml ascorbic acid 2-phosphate (Fujifilm Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)、10 mM β -glycerophosphate (Fujifilm Wako Pure Chemical Industries) および 100 nM dexamethasone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を添加し PS dish に 1.0×10^4 cells/ml の BMDC を播種し 3 日毎に培地を交換した。細胞は 4% formaldehyde で 10 分間固定し、2% Alizarin Red S (pH 6.4, Nacalai tesque, Kyoto, Japan) で 30 分間、室温にて染色し骨芽細胞への分化を評価した。

軟骨細胞への分化誘導のために、 1.0×10^5 cells/ml の BMDC を PS dish に播種した。培地は high-glucose RPMI 1640 培地に insulin-transferrin-sodium selenium supplement (Corning® ITS Premix, Corning Life Sciences, Bedford, MA, USA)、40 mg/ml L-proline (Fujifilm Wako Pure Chemical Industries)、100 mg/ml sodium pyruvate (Sigma-Aldrich)、50 mg/ml ascorbic acid 2-phosphate、10 ng/ml transforming growth factor- β 1 (Peprotech Company, Rocky Hill, NJ, USA) および 100 nM dexamethasone を添加し、3 日毎に培地交換した。細胞は 4% formaldehyde で 10 分間固定した。軟骨細胞への分化評価のために、細胞を alcian blue 溶液 (pH 2.5, Muto Pure Chemical, Tokyo, Japan) で 10 分間常温にて染色した。

脂肪細胞への分化誘導のために、 1.0×10^5 cells/ml の BMDC を PS dish に播種した。培地は low-glucose RPMI 1640 に 10% ABS または 10% FBS、0.5 mM isobutylmethylxanthine (Fujifilm Wako Pure Chemical Industries)、0.2 mM indomethacin (Fujifilm Wako Pure Chemical Industries)、100 nM dexamethasone、10 mg/ml insulin (Fujifilm Wako Pure Chemical Industries) を添加した。細胞は

4% formaldehyde で 10 分間固定し、0.5% Oil Red O 溶液 (Sigma-Aldrich) を用いて 20 分間常温で静置し脂質滴を染色した。

8. 3D レーザー顕微鏡

HAp/DN ゲルの表面形態と表面に接着した細胞を 3D レーザー顕微鏡 (VK-9710 KEYENCE, Osaka, Japan) で観察した。試料表面は、PBS 緩衝液に含まれる塩の再結晶を防ぐために蒸留水で洗浄した。余剰な水が付着した表面は空气中で自然乾燥させた。波長 480 nm のレーザー光で得られた反射画像にて観察を行った。

9. 顕微全反射フーリエ変換赤外分光法

ゲル表面への血清タンパク質の吸着を、顕微全反射フーリエ変換赤外分光法 (IRT-3000 N, JASCO, Japan) を使用して評価した。家兎血清は上述の方法を用いて取得した。直径 35 mm、厚さ 2 mm の DN ゲルおよび HAp/DN ゲルを 1 ml の家兎血清に 24 時間浸透し、測定前に血清液を拭き取った。ダイヤモンドブリズムを接触させた領域の DN ゲルおよび HAp/DN ゲルの反射光を 800/cm から 1800/cm までの範囲で測定した。全てのデータに対して、水のスペクトラムを差し引き、ベースラインを補正した。血清の吸光スペクトルを明確に示すために、スペクトル値を 5 倍にして表記した。

10. RNA 抽出および遺伝子発現解析

RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて細胞から total RNA を抽出し、SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) を用いて cDNA を合成した。遺伝子発現解析は Power SYBR® Green Master Mix の調整法に準じて、StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) を使用し定量 RT-PCR 法を実施した。glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内在性コントロールとして用いた。cDNA を含む各 RT 反応液 1 μ l に、SYBR Green Premix, Ex Taq II (Takara, shiga, Japan) 10 μ l、10 μ M forward プライマー 0.18 μ l、10 μ M reverse プライマー 0.18 μ l、滅菌蒸留水 8.64 μ l を添加し、各反応液を 95°C にて 10 分間反応させた後に、95°C で 15 秒、60°C で 1 分の条件下で 40 サイクル反応させ、最後に 72°C にて 5 分反応させた。使用したプライマーの配列は以下の表 1 に示す通りである。

表 1: 実験に使用した RT-PCR プライマー

Gene	Forward primer (5' – 3')	Reverse primer (5' – 3')
TGF- β 1	AGTTACAGCAGGAGCAGC	TACAGTGACCTCAACACTCC
BMP-2	CAGCGGAAACGCCTCAAA	GAAAGGGACCGACTAGT
Runx2	GGCAGGTGCTTCAGAACTGG	GTGGTGGCAGGTAGGTATGG
Col-1	GCGAGGAAGGAAGGGAAG	AGAGTGACCTTCGGGACCG
ALP	GCTGAGCCTGAGCAGCGTT	TCTGCTGACTGACTGGTTCA
OPN	TTGATGAGGGAGGACGATG	CAGAGATTGGGTCATAGA
BSP	AAGCTCGCTCTCTGCAGGTC	GGACCTGACAATGAACCGTT
OCN	GAAGCCCAGCGGTGCA	CACTACCTCGCTGCCCTCC
GAPDH	TCACCATCTTCCAGGAGCGA	CACAATGCCGAAGTGGTCGT

11. 誘導結合プラズマ発光分光分析法

HAp/DN ゲルおよび 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光分析により定量的に測定した。PBS 溶液中の直径 35 mm、厚さ 2 mm の両基材を滅菌蒸留水で洗浄した。その後、生理食塩水（Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Japan）30 ml に浸漬した基材を 120°C で 20 分間オートクレーブ滅菌した。37°C で 1 日、7 日、14 日間静置した後の溶出液 9.9 ml に 70 wt% 濃硝酸（FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation）を 0.1 ml 添加し ICPE-9000 装置（Shimadzu Co., Japan）を用いてカルシウムイオンとリンイオンの濃度を測定した。

12. 走査型電子顕微鏡と元素マッピング

HAp/DN ゲル上で培養した細胞の形態観察と元素マッピングは、エネルギー分散型 X 線分光器付き走査型電子顕微鏡（JSM-6010A, JEOL, Japan）を使用して評価した。湿潤試料を用いる場合は乾燥による収縮を防ぐためにカーボンテープにて強固に固定した。この試料を低真空（66 Pa）の SEM チャンバーに装填し後方散乱電子画像を取得した。凍結乾燥試料を用いる場合は、液体窒素中で凍結させた後に乾燥させ、カーボンテープで固定し、金-パラジウム合金でスパッタコートした（E-1010 ion sputter system Hitachi, Japan）。この試料を真空

チャンバー（ $\sim 10^{-5}$ ）に装填した。20 kV 加速電圧の電子銃を表面に照射し発生した特性 X 線から、炭素、酸素、カルシウム、リンの元素マッピングを作成した。

13. アルカリフォスファターゼ（ALP）活性の測定

3 継代目の MSC を PS dish、DN ゲル、HAp/DN ゲル、HAp 焼結体上に播種し、ABS 含有培地で 4 日間培養を行い、Trypsin-EDTA で細胞を回収した。アルカリフォスファターゼ（Alkaline phosphate: ALP）の活性は、TRACP & ALP assay kit（Takara Bio, Inc., Shiga, Japan）を用いて測定した。最初に培養上清を除去し、生理食塩水で基材に接着した細胞を 1 回洗浄した後、細胞抽出液 50 μ l を添加しスクレーパーを用いて回収した。24 mg の pNPP（p-nitrophenyl phosphate）を 5 ml のアルカリ性ホスファターゼ用緩衝液に溶解し、反応基質溶液とした。反応基質溶液 50 μ l を加え、37°C で 60 分間反応させた後、405 nm の吸光度を分光光度計（Spectra MAX microplate reader, Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA）にて測定した。PS dish 上の細胞の ALP 活性を基準にして ALP 活性を相対値で表記した。各試料の計測を 6 回ずつ行った。

14. ゲル円柱プラグの家兎骨髄への移植と免疫組織学的解析

体重 3.7 ± 0.3 kg の成熟した雌の日本白色家兎 16 羽を用いた。手術はイソフルランを用いた全身麻酔下に行った。両側の大腿をイソジンで消毒し、滅菌ドレープで両膝を覆った。両側遠位大腿外側に 2 cm の皮膚切開を行い、大腿骨外側顆を露出させた後に、大腿骨外側顆に直径 4.3 mm、深さ 7 mm の骨孔を作製した（図 2）。その後、直径 4.5 mm、高さ 7 mm の DN および HAp/DN ゲル円柱プラグを両側の骨孔に移植した。関節包と皮膚は 3-0 ポリエステル糸を用いて縫合した。対照群として、骨孔のみ作製しゲル円柱プラグを移植しない群を用意した。術後はケージ（310×550×320 mm）内で自由に行動させた。術後 3 日目（6 羽）、7 日目（5 羽）、14 日目（5 羽）に致死量のペントバルビタールを経静脈的に投与し安楽死させ、両側の大腿骨遠位部を採取して組織学的および免疫組織学的検査を行った。採取した大腿骨は、10% 中性緩衝ホルマリン溶液で 3 日間固定し、50 mM EDTA で 4 週間脱灰した後、パラフィンブロックに包埋した。円柱状骨孔の長軸に対して平行に、厚さ 3 μ m の標本作製した。この標本をヘマトキシリン・エオジンで染色し組織学的観察を行った。免疫組織化学的検査のために、一次抗体として抗 CD44 抗体（Bio-Rad、MCA806GA）、抗 CD105 抗体（Abcam、ab107, 595）、抗 Runx2 抗体（purified mouse monoclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA, sc-390,715）、抗 OCN 抗体（purified mouse monoclonal IgG, Abcam, ab13420）を用

い、二次抗体（Histofine Simple Stain MAX PO, Nichirei, Tokyo, Japan）を用いた。

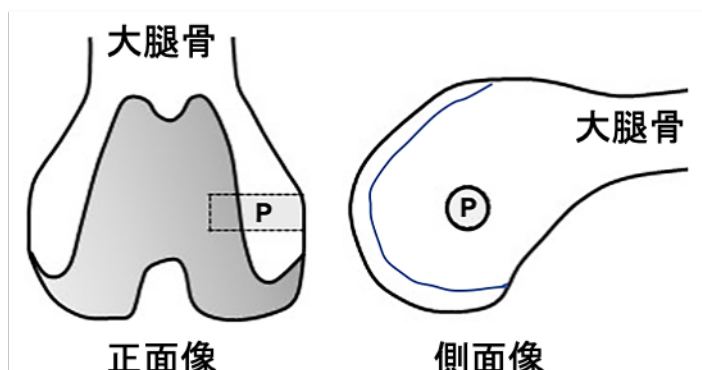


図 2：大腿骨へのゲル円柱プラグ移植の模式図。P: plug。

統計的評価

各測定値は平均値と標準偏差で示した。細胞増殖アッセイと誘導結合プラズマ発光分光分析法の測定値は Mann-Whitney U-test で評価した。各基材上で培養した細胞の各種測定値の比較には、一元配置分散分析または二元配置分散分と多重比較検定（Tukey's HSD test）を用いた。有意水準は 0.05 とした。

結果

1. 家兎骨髓由来細胞 (BMDC) の間葉系幹細胞 (MSC) としての性質の検証 (Substudy 1)

本研究で使用した BMDC が MSC としての性質を有するか検証するために、自己複製能、多分化能、MSC 表面マーカー (CD44、CD73、CD90、CD105) の発現を評価した。BMDC を PS dish 上で培養した際の形態学的観察では、ABS 含有培地を用いると小型で紡錘形状の細胞が均一に観察されたのに対して、FBS 含有培地を用いた場合は小型の紡錘形細胞と大型の円形細胞が混在する像が観察された (図 3)。

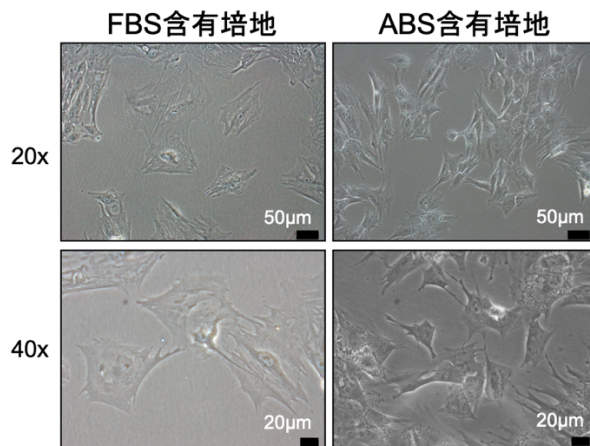


図 3 家兎骨髓由来細胞の形態学的観察

FBS 含有培地(左列)と ABS 含有培地(右列)を用いて PS dish 上で培養した BMDC の位相差顕微鏡での観察像を示す。

細胞増殖アッセイでは、ABS 含有培地で培養した BMDC は、指数関数的な増殖が観察されたのに対して、FBS 含有培地で培養した BMDC では、細胞は増殖しなかった。培養後 1 日目以降 4 日目までの全ての日数で、ABS 含有培地で培養した条件で有意に細胞数が多かった ($P < 0.05$) (図 4)。

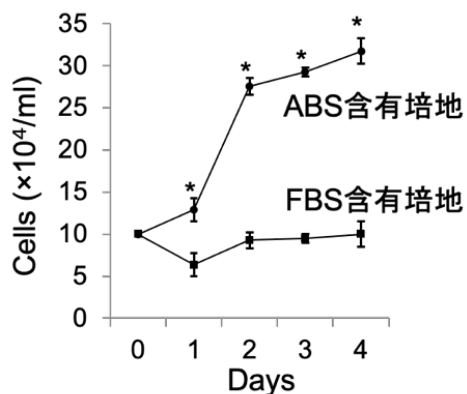


図 4：細胞増殖アッセイ

FBS 含有培地と ABS 含有培地を用いて PS dish 上で培養した場合の BMDC の経時的細胞数の変化を示す。* $P < 0.05$ 。

コロニー形成ユニットアッセイでは、ABS 含有培地で培養した BMDC のコロニー形成ユニット数は 21 ± 1 個であり、自己複製能が示された（図 5）。FBS 含有培地で培養した場合、コロニー形成は観察されなかった。

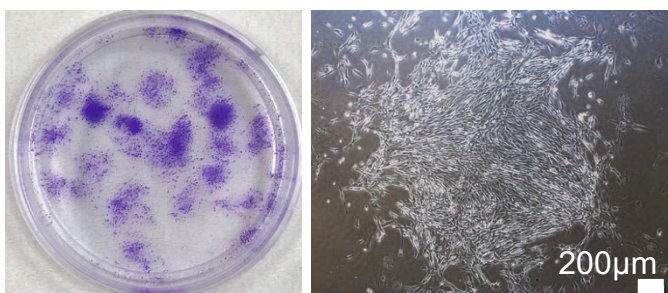


図 5：コロニー形成ユニットアッセイ

BMDC を ABS 含有培地で PS dish 上にて培養した場合のコロニー形成能を評価した。クリスタルバイオレットで染色された細胞の肉眼像（左写真）と位相差顕微鏡でのコロニー像（右写真）。

フローサイトメトリー解析では、ABS 含有培地で培養した BMDC は CD44 と CD105 の陽性細胞の割合が高く、CD73、CD90、CD45 陽性細胞の割合が低かった（図 6）。一方、FBS 含有培地で培養した BMDC では、増殖が遅いために解析に十分量の細胞が得られなかった。

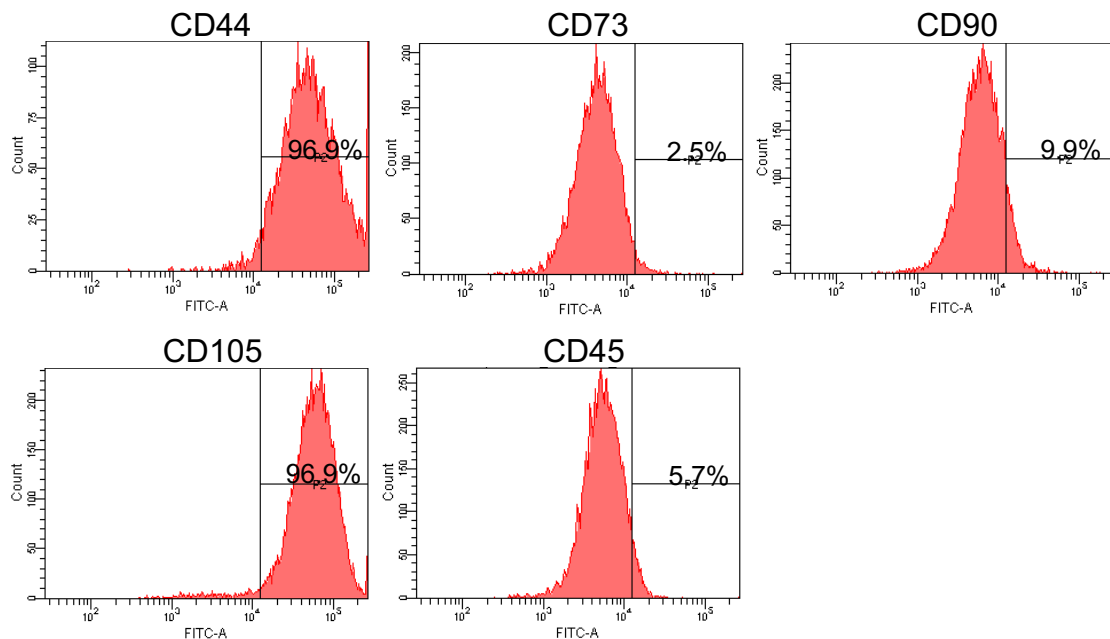


図 6 : フローサイトメトリー解析

BMDC を ABS 含有培地で PS dish 上にて培養した場合の、各表面抗原の陽性細胞比率の評価を示す。

イムノブロットティング法では、ABS 含有培地で培養した BMDC は CD73、CD90、CD105、CD44 が高発現していた（図 7）。FBS 含有培地で培養した BMDC は CD73 と CD105 は発現しておらず、CD90 と CD44 のタンパク質発現を示すバンドは微弱であった。更にこれらの BMDC では、造血系マーカーである CD45 が発現していないことが確認された。

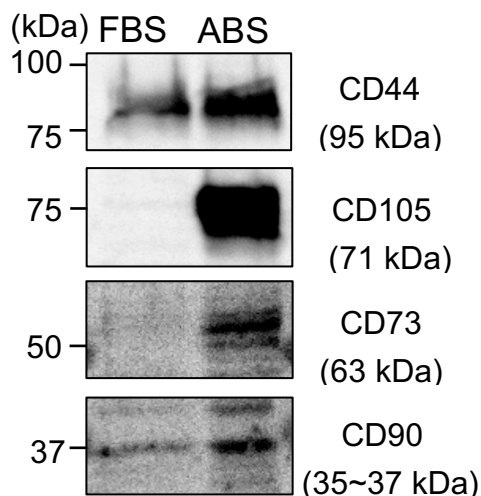


図 7：イムノブロッティング法

BMDC を FBS 含有培地と ABS 含有培地を用いて PS dish 上で培養した場合の MSC 表面マーカーのタンパク質発現を示す。

分化培地添加による BMDC の多分化能の評価では、ABS 含有培地を使用した場合は培養後 14 日後に骨細胞、4 日後に軟骨細胞、7 日後に脂肪細胞への分化が認められた（図 8）。一方、FBS 含有培地で培養した場合は、多分化能は認めなかった。

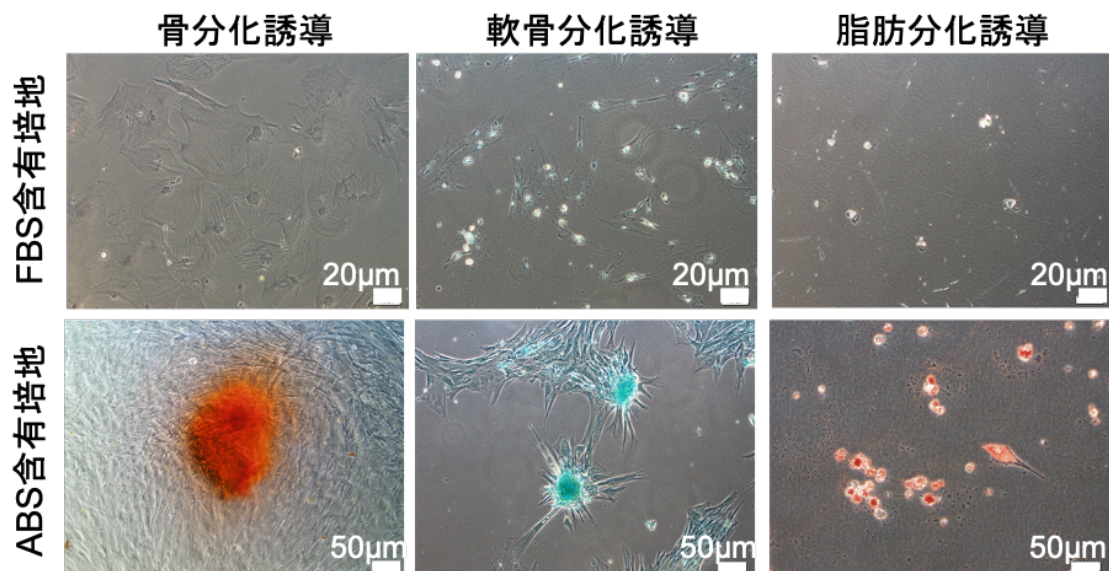


図 8：BMDC の多分化能

骨分化誘導（Alizarin Red 染色）、軟骨分化誘導（Alcian blue 染色）、脂肪分化誘導（Oil Red 染色）を示す。FBS 含有培地を用いると分化誘導が認められないのに対して（上段）、ABS 含有培地を用いると 3 系統への分化が観察された（下段）。

2. HAp/DN ゲルによる *in vitro* での MSC の骨系統細胞への分化促進能の検証 (Substudy 2)

Substudy 2 では HAp/DN ゲルが *in vitro* で MSC の骨系統細胞への分化を促進するかどうかの検証を行った。3 継代目の MSC を DN ゲル、HAp/DN ゲル、HAp 焼結体上に 2.0×10^5 cells/ml の細胞密度で、PS dish 上には 2.0×10^4 cells/ml の細胞密度で播種した。PS dish 上で細胞播種密度を低くした理由は、PS dish では細胞増殖が速く、数日でコンフルエントになり細胞死が生じるためである。位相差顕微鏡による細胞形態観察では HAp/DN ゲル上で培養した細胞は、4 日目で細胞間での凝集が観察され、7 日目と 14 日目では個々の細胞が多角形状になった (図 9)。一方、PS dish 上で培養した細胞は 14 日間を通して紡錘形を維持していた。DN ゲル上で培養した細胞は 4 日目から凝集してスフェロイドを形成した。

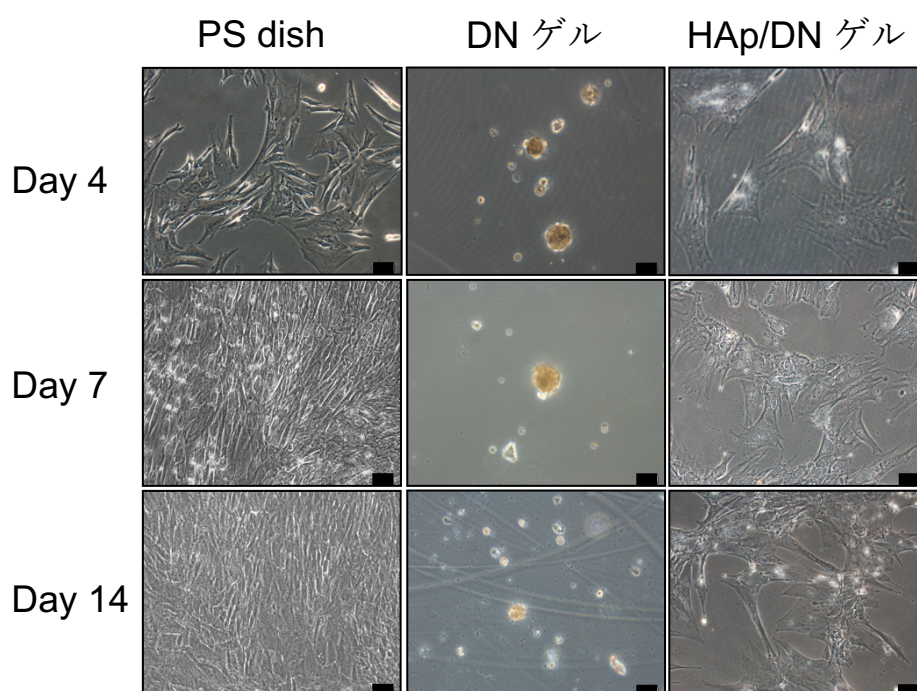


図 9 : PS dish、DN ゲル、HAp/DN ゲル上での細胞形態観察

各マテリアル上で 14 日間に渡って培養した MSC の位相差顕微鏡での観察像を示す。スケールバーは 50 μm を示す。

次に、MSC がどのように HAp/DN ゲル表面に接着するか、3D レーザー顕微鏡を用いて観察した (図 10)。HAp/DN ゲル表面は、マクロ的には平坦であるが、ミクロ的には HAp ナノ粒子で構成された顆粒状かつ皺状の構造を有していた。DN ゲルの表面は無構造で平坦であった。HAp/DN ゲル上では、これらの表面構造を足場に細胞が接着しており、細胞播種 7 日目には細胞同士が凝集

している像が観察された。

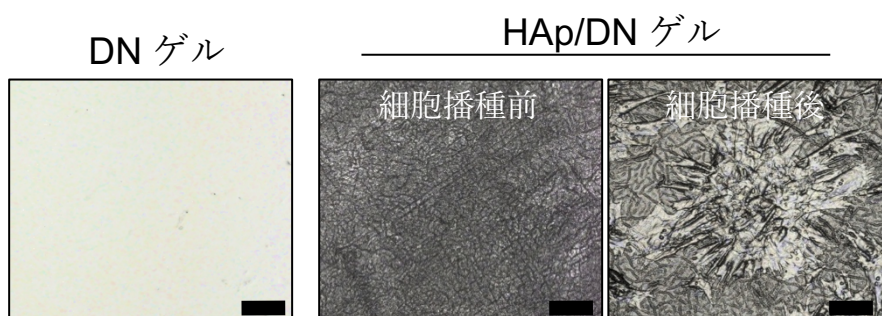


図 10 : 3D レーザー顕微鏡像

DN ゲルと HAp/DN ゲル表面構造の 3D レーザー顕微鏡による観察像を示す。HAp/DN ゲルでは MSC を播種した後の観察像も示す。スケールバーは 50 μm を示す。

次に、DN ゲルおよび HAp/DN ゲルの血清由来タンパク質の吸収能を顕微全反射フーリエ変換赤外分光法で評価した。血清は 1645/ cm^{-1} と 1546/ cm^{-1} に特徴的なピークを示し、各々アミド I とアミド II のバンドに一致していた (図 11)。血清の吸収ピークに対応するピークが、血清に浸漬した HAp/DN ゲル (図 11、オレンジ線) で観察されたが、DN ゲル (水色線) では観察されなかった。この結果は、HAp/DN ゲルが血清タンパク質を吸着し、このタンパク質を足場にした細胞接着を誘導している可能性を示唆した。

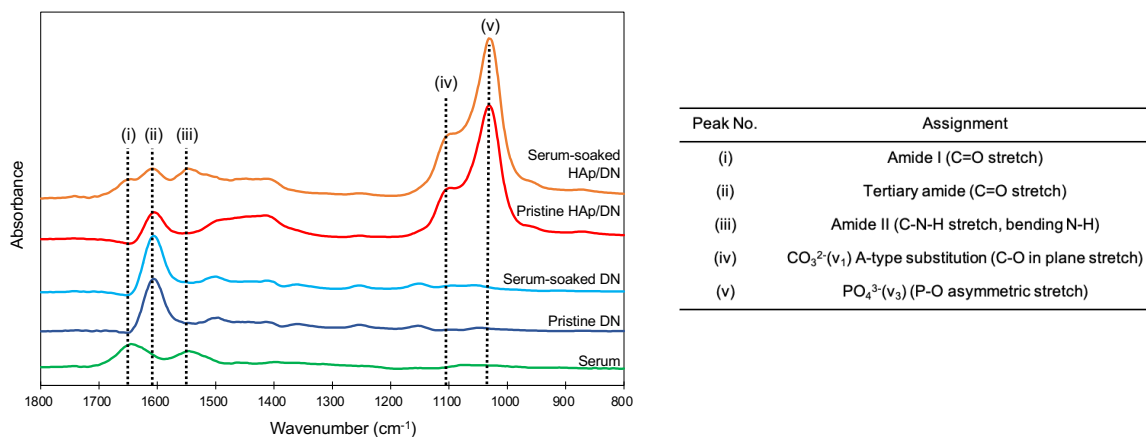


図 11 : 顕微全反射フーリエ変換赤外分光法

血清 (緑線)、DN ゲル (青線) および HAp (赤線)、血清に浸漬させた後の DN ゲル (水色線) および HAp/DN ゲル (オレンジ線) の顕微全反射フーリエ変換赤外分光法を示す。

MSC 培養後 7 日目および 14 日目における骨分化マーカーの定量的 RT-

PCR 解析を行った (図 12)。骨分化の初期マーカーとして *Runx2* (Runt related transcription factor 2)、*Col-1* (Collagen type 1) を、中・後期のマーカーとして *ALP* (Alkaline phosphatase)、*OPN* (Osteopontin)、*BSP* (Bone Sialoprotein)、*OCN* (Osteocalcin) を用いた。更に、骨形成を誘導するシグナル伝達経路について *Runx2* の上流に位置する重要な因子である *TGF- β 1*、*BMP-2* を解析した (Horn et al., 2008)。HAp/DN ゲル上で培養した MSC の 7 日目と 14 日目の遺伝子発現プロファイルを、PS dish、DN ゲル、HAp 焼結体上で培養した MSC と比較した。PS dish で 7 日間培養した MSC の各遺伝子マーカーの遺伝子発現量を基準値とした。

HAp/DN ゲル上で培養した MSC では、初期マーカーである *TGF- β 1*、*BMP-2*、*Col-1* が 7 日目と 14 日目共に他の基材上で培養した細胞よりも有意に高値であった ($P < 0.05$)。14 日目のこれらのマーカーの発現量は 7 日目のそれよりも有意に減少していた ($P < 0.0001$)。一方、*Runx2* は 7 日目のみ HAp/DN ゲル上で培養した MSC で他の基材上で培養した細胞よりも有意に高値 ($P < 0.0001$) であったが、14 日目の発現量は 7 日目の発現量よりも有意に減少 ($p < 0.0001$) した。中・後期マーカーの *ALP*、*BSP* と *OCN* に関して、HAp/DN ゲルディスク上で培養した MSC では 7 日目、14 日目ともに他の基材上で培養した細胞と比較して有意に高値で ($P < 0.05$)、*OPN* は 7 日目のみ有意に高値であった ($P < 0.01$)。一方、DN ゲルおよび HAp 焼結体上で培養した MSC では、*TGF- β 1*、*BMP-2*、*Col-1*、*ALP*、*OPN*、*BSP* および *OCN* の遺伝子発現レベルは、7 日目および 14 日目のいずれにおいても、PS dish 上で培養した細胞と比較して有意な差を示さなかった。*Runx2* は 7 日目、14 日目ともに PS dish 上で培養した細胞と比較して、有意に高値であった ($P < 0.0130$)。HAp 焼結体上で培養した細胞の 7 日目の *OCN* の発現量は PS dish 上で培養した細胞よりも有意に高かった ($P = 0.0077$)。

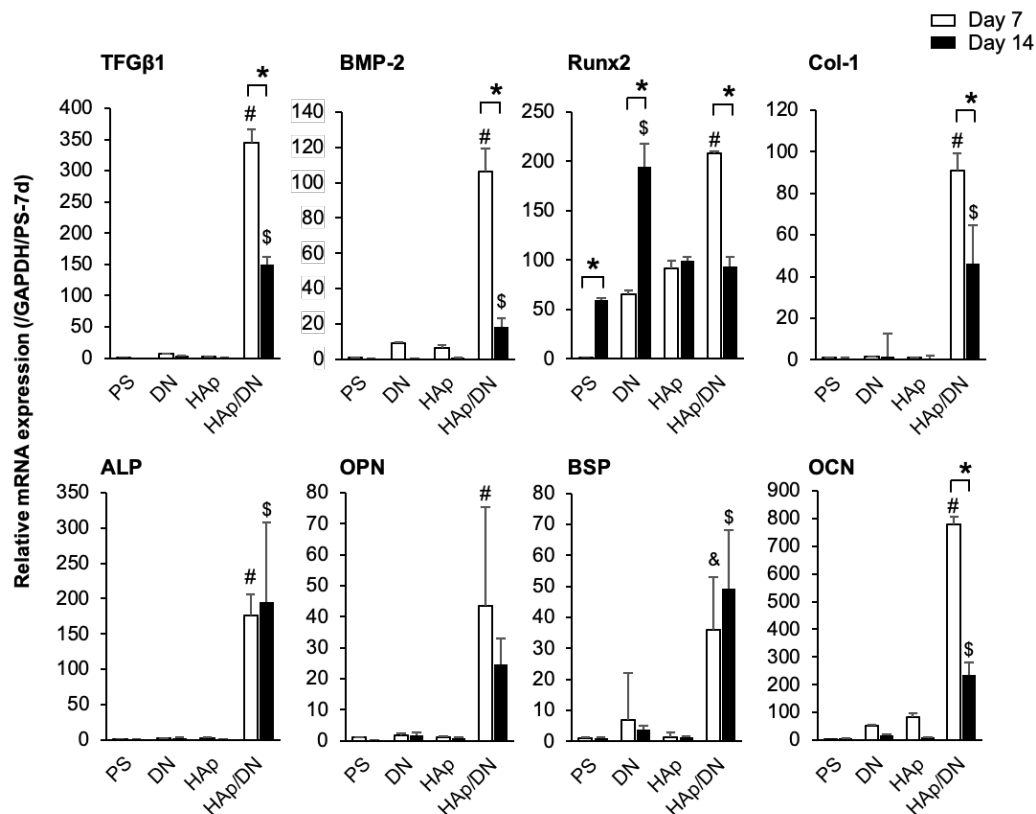


図 12 : MSC の骨分化マーカーの遺伝子発現量

MSC を PS dish、DN ゲル、HAp 焼結体および HAp/DN ゲル上で、1 週間もしくは 2 週間培養した場合の骨分化マーカーの遺伝子発現量を示す。

次に MSC がどのようにして骨系統細胞に分化するのかを検証するために、HAp/DN ゲルと HAp 焼結体から溶出されるカルシウムイオンとリンイオンを誘導結合プラズマ発光分光分析法にて測定した (図 13)。カルシウムイオンの溶出は、HAp 焼結体からは 14 日間一定であったが、HAp/DN ゲルからの溶出は経時的に漸増した。HAp/DN ゲルは HAp 焼結体と比較して 7 日目と 14 日目でカルシウムイオンの溶出が有意に高値であった ($P < 0.001$)。HAp/DN ゲルからのリンイオン溶出は時間依存的に増加し、14 日目では HAp 焼結体からの溶出量と比較して有意に高値であった ($P < 0.001$)。

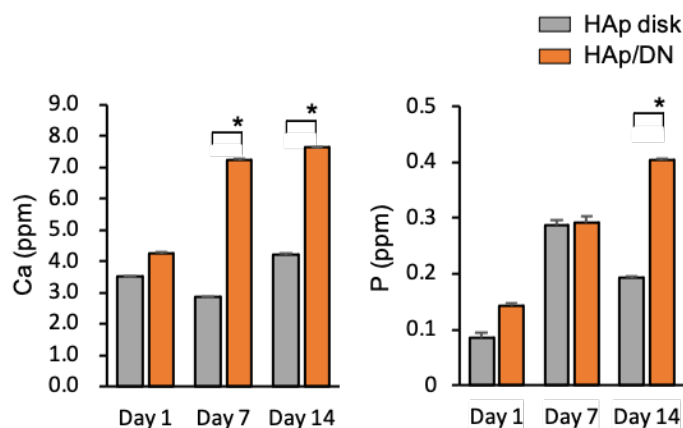


図 13 : 誘導結合プラズマ発光分光分析法によるカルシウムイオンとリンイオンの濃度測定

HAp 焼結体と HAp/DN ゲルから溶出されるカルシウムイオンとリンイオンの濃度測定結果を示す。

MSC を HAp/DN ゲル上で 1 週間もしくは 2 週間培養した際の、ゲル表面の炭素、酸素、リン、カルシウムの元素分布をエネルギー分散型 X 線分光器により解析した (図 14, 15)。HAp/DN ゲル上で細胞が存在しない領域の 1800 から 2000 ピクセルに対して、ピクセルあたりの各元素含有量の強度を解析した (図 15)。HAp の構成元素である酸素、カルシウム、リンは、7 日目と比べて 14 日目に強度が低下した。これらの結果から HAp/DN ゲル上で MSC を培養した場合、HAp/DN ゲルから 2 週間にわたりカルシウムイオンとリンイオンが恒常的に放出されていることが示された。

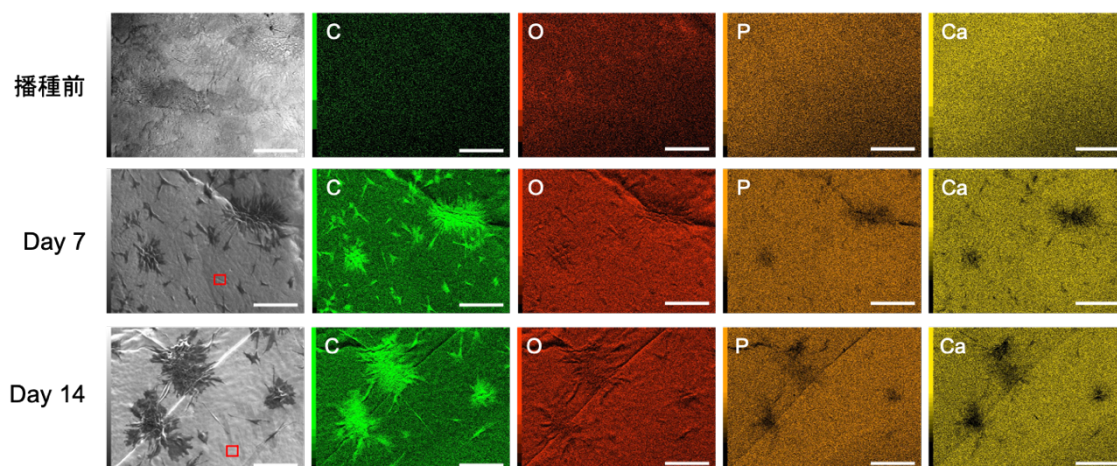


図 14 : 走査型電子顕微鏡写真での元素マッピング

MSC を HAp/DN ゲル上に播種する前と播種後 7 日目及び 14 日目の走査型電子顕微鏡写真と元素マッピングを示す。

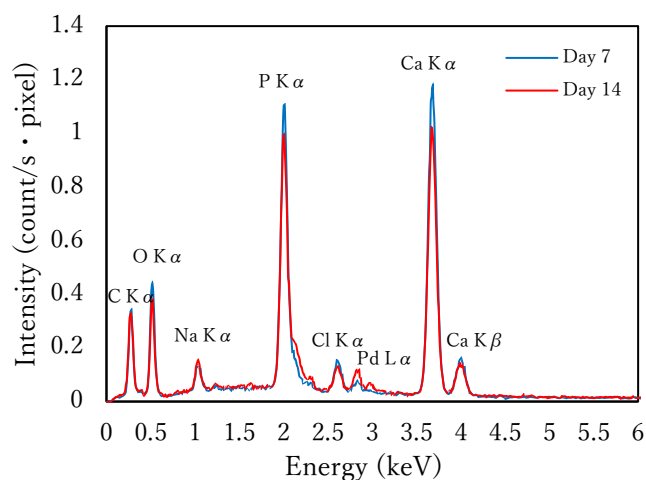


図 15 : 元素マッピングにおける元素量の強度

各 SEM 画像における HAp/DN ゲル表面の元素量の強度をエネルギー分散型 X 線分光器で測定した。

骨芽細胞としての機能の指標である ALP 活性を、MSC を各基材へ播種後 4 日目に測定した (図 16)。HAp/DN ゲル上で培養した細胞における相対的な活性値は、他の 3 つの基材上で培養された細胞よりも有意に高く ($P < 0.0001$)、DN ゲルと HAp 焼結体上で培養した細胞における相対的な活性値は、PS dish 上で培養された細胞よりも有意に高かった。

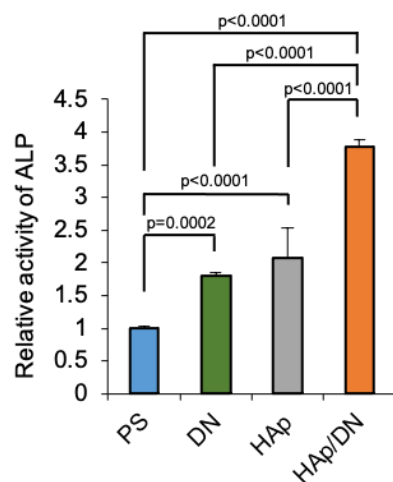


図 16 : ALP 活性値

MSC を PS dish、DN ゲル、HAp 焼結体および HAp/DN ゲル上で培養した場合の相対的 ALP 活性値を示す。

以上より Substudy 2 の結果は、HAp/DN ゲル表面構造が MSC の接着を促進

し、*in vitro* 環境における骨髄由来 MSC の骨系統細胞への分化を促進することを示した。

3. *in vivo* の HAp/DN ゲルプラグ周囲に形成された組織の Runx2 と OCN の発現検証 (Substudy 3)

Substudy 3 では、DN ゲルプラグおよび HAp/DN ゲルプラグを遠位大腿骨に移植し、ゲルプラグ周辺に形成された組織に MSC がリクルートされるか、また *in vitro* の Substudy 2 において、HAp/DN ゲル上で培養した MSC で高発現した *Runx2* および *OCN* が *in vivo* でも同様に発現するかを検討した。HAp/DN ゲルプラグ移植後 3 日目で、HAp/DN ゲル表面に CD44+ CD105+ の MSC マーカー陽性紡錘形細胞が観察された (図 17)。一方で、対照群と DN ゲルプラグの周囲には赤血球と結合組織のみが観察された。

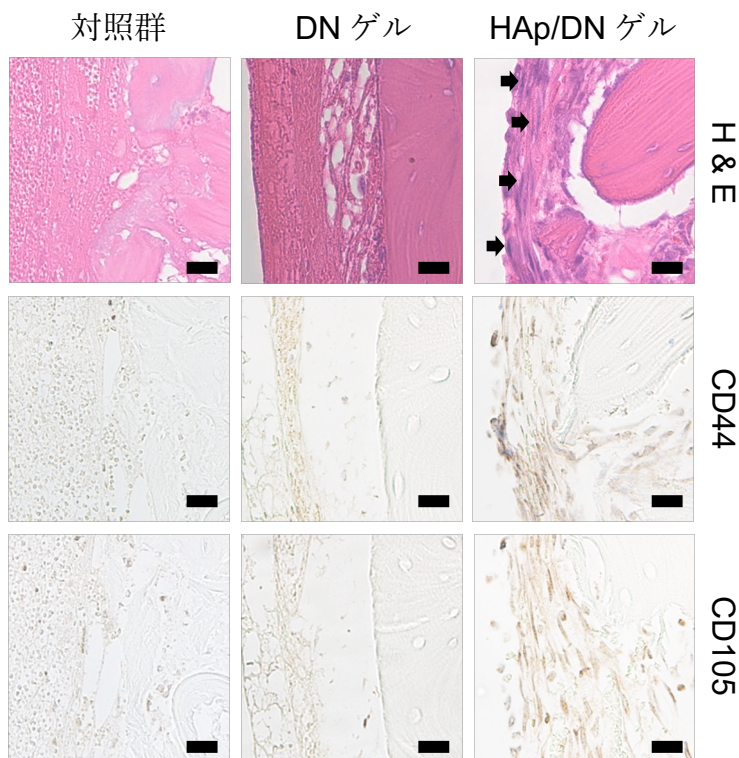


図 17：組織学的および免疫組織学的評価

遠位大腿骨に DN ゲルもしくは HAp/DN ゲルを移植後 3 日目の組織学的評価および免疫組織化学的評価を示す。MSC のマーカーとして CD44 と CD105 を用いた。対象群は、骨孔を作製するのみでゲルは埋植しない群とした。黒矢印は、CD44 と CD105 陽性の紡錘形細胞を示す。

ゲルプラグ移植後 7 日目には、HAp/DN ゲル表面と骨壁の間には小さな円形の核を持つ四角形状の細胞や小さな円形の核を持つ円形の細胞で満たされていた (図 18)。特に HAp/DN ゲルに接する面では、これらの細胞が整列していた。これらの細胞では、Runx2 陽性かつ OCN 陰性という骨芽細胞に特徴的な染色パターンを示した。14 日目には、ゲル表面と骨壁との間が骨組織で満たされ、その中には大きな楕円形の核を持つ細胞質に富む多角形の細胞が散在していた。これらの細胞では、OCN 陽性かつ Runx2 陰性であり骨細胞に特長的な染色パターンを示した。一方、DN ゲルプラグの周囲には、7 日目と 14 日目ともに紡錘形の細胞を含む線維組織が観察された。これらの細胞では、Runx2 や OCN は染色されなかった。

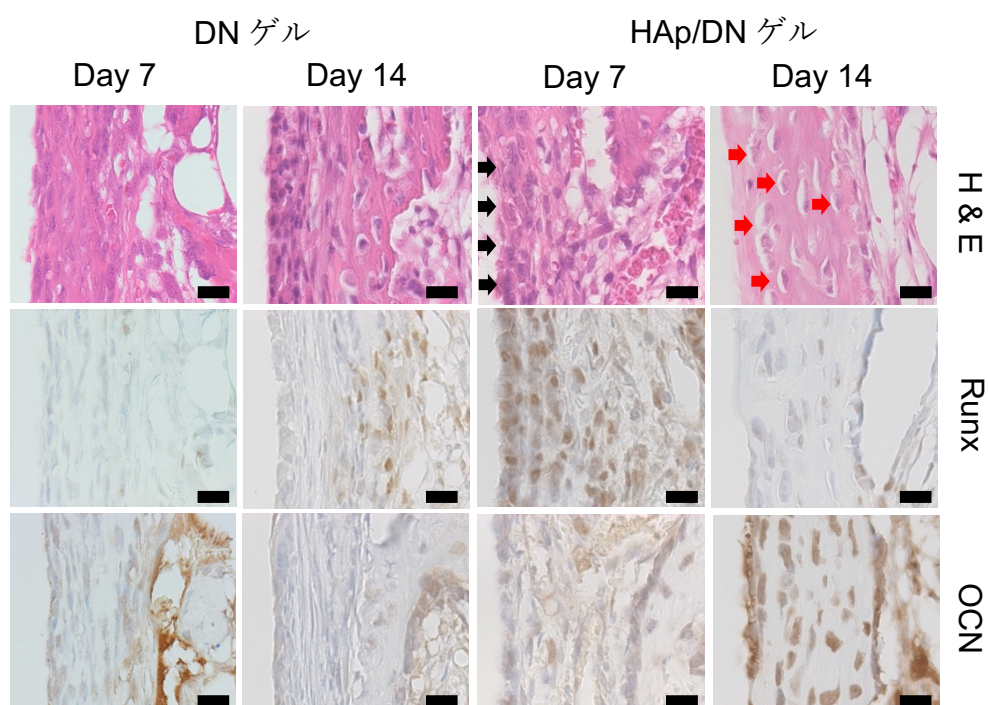


図 18 : 組織学的および免疫組織化学的評価

遠位大腿骨に DN ゲルもしくは HAp/DN ゲルを移植後 3 日目の組織学的評価および免疫組織化学的評価を示す。骨芽細胞のマーカーとして Runx2 を、骨細胞のマーカーとして OCN を用いた。黒矢印は Runx2 陽性細胞を、赤矢印は OCN 陽性細胞を示す。

考察

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。そのために我々は家兎骨髄から採取した MSC を用いて実験を行った。MSC の特性は、採取部位、分離・培養方法、継代数など多くの要因に影響される(Baksh et al., 2007; Horn et al., 2008; Wagner et al., 2008) 。そのため、本研究で用いた BMDC が MSC としての特徴を示すか Substudy1 で検証した。MSC はコロニーを形成する線維芽細胞様細胞として初めて報告された(Friedenstein et al., 1970)。国際細胞治療学会では、ヒト MSC の定義として、1) PS dish に接着し、2) 特徴的な表面マーカー (CD105 +、CD73 +、CD90 +、および CD45 -) の発現パターンを示し、3) *in vitro* で 3 種類の間葉系細胞 (骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞) に分化できる細胞と定義された(Dominici et al., 2006)。本研究の Substudy1 では、BMDC を ABS 含有培地で培養した場合に上記のような MSC の特性を有することが示された。

Vasicek らの近年の報告によると、家兎 MSC では文献によって異なる細胞表面マーカーの発現パターンを示すが、CD44 が CD105、CD73、CD90 よりもより普遍的に発現していると報告した(Vasicek et al., 2020)。本研究のフローサイトメトリー解析では、BMDC を ABS 含有培地で培養した条件で CD44 と CD105 の MSC マーカーが高発現することが示された。一方、イムノブロットイング法では、CD44、CD105、CD73、CD90 のすべてが陽性であった。フローサイトメトリー解析とイムノブロットイング法の結果の違いは、イムノブロットイング法は細胞表面タンパク質のみならず細胞質内局在タンパク質をも高感度に検出可能であることに起因すると考えられた。一方で、FBS 含有培地で培養した BMDC では MSC としての性質を有さなかった。FBS はロット間のばらつきがあることが知られている(Stein, 2007)。Bahn らは家兎 MSC を培養する際に、ABS 含有培地を用いると 3 継代目まで細胞は均一な紡錘形状を保つが、FBS 含有培地を用いると不均質な細胞形態を示すことを報告している(Bahn et al., 2012)。Shahdadfar らは、ABS が MSC のアポトーシスを抑制する遺伝子の発現を促進し、FBS が細胞周期を延長する遺伝子の発現を促進すると報告している(Shahdadfar et al., 2005)。本研究では、家兎骨髄から採取した MSC の培養において、ABS が重要な役割を果たすことが示唆された。

Substudy2 では始めに、MSC が HAp/DN ゲル表面にどのように接着しているかを観察した。HAp/DN ゲルのマクロ的には平坦であるがミクロ的には粗造な表面に、MSC が接着している像が 3D レーザー顕微鏡で観察された。HAp のミクロ的に粗造な表面構造は細胞接着を促進することが報告されている

(Deligianni et al., 2001; Iwamoto et al., 2016)。従って、HAp/DN ゲルの表面構造は MSC の接着を促進する構造と考えられた。

本研究では HAp/DN ゲルを血清中に浸漬すると、HAp/DN ゲルが血清中のタンパク質を広く吸着することを顕微全反射フーリエ変換赤外分光法で示した。Vohra らは、HAp は血中に豊富に存在する接着性タンパク質を吸着すること、またフィブロネクチン、FBS、あるいは I 型コラーゲンでプレコートした HAp ディスクには MSC が高い細胞接着能を示すことを報告している(Vohra et al., 2008)。フィブロネクチンはアミド I の赤外スペクトルに相当し(Baujard-Lamotte et al., 2008)、これは血清浸漬した HAp/DN ゲルで観察された赤外吸収ピークと一致していた。従って本研究では、HAp/DN ゲルは MSC の接着に適した表面構造を有し、吸着されたフィブロネクチンなどの血清タンパク質が MSC の接着にさらに寄与している可能性を示唆するものであった。

本研究の MSC の遺伝子発現解析では、HAp/DN ゲル表面で 7 日間培養すると初期骨分化マーカーである *TGF- β 1*、*BMP-2*、*Runx2*、*Col-1* の遺伝子発現が上昇し、その後 14 日目にこれらの発現レベルが低下することが明らかとなった。また、中・後期の骨分化マーカーである *ALP*、*OPN*、*BSP*、*OCN* の遺伝子発現は 7 日目に上昇し、*OCN* を除くこれらのマーカーの遺伝子発現レベルは 14 日目において上昇が維持されていた。これらの HAp/DN ゲル上で培養した MSC の骨分化マーカーの遺伝子発現プロファイルは、骨系統細胞への分化時に見られる典型的な遺伝子発現プロファイルである(Bruderer et al., 2014; Komori, 2010; Lee et al., 2000; Miron and Zhang, 2012)。一方、DN ゲルおよび HAp は、7 日および 14 日のいずれにおいても、*Runx2* を除く全ての骨分化マーカーの遺伝子発現に全く影響を与えないか、あるいは僅かな影響を与えるに過ぎなかった。また、骨芽細胞の機能を表す *ALP* 活性は、HAp/DN ゲル上で培養された MSC において、他の 3 つの基材上で培養された MSC よりも有意に高かった。この結果は、上述の HAp/DN ゲル表面が MSC の骨分化マーカーの遺伝子発現に有意に影響することを支持するものであった。従って、これらの結果は HAp/DN ゲルが *in vitro* において骨髄由来 MSC の骨系統細胞への分化を促進することを示した。PS dish、DN ゲル、HAp 焼結体上で培養した MSC では、*Runx2* 遺伝子の発現プロファイルが他の遺伝子と明らかに異なっていた。まず PS dish では、7 日目にと比較して 14 日目の *Runx2* の遺伝子発現が有意に亢進していた。Li らは、PS dish 上で培養したヒト MSC では、継代を重ねると細胞老化が進み自発的な骨分化が誘導され、*Runx2* などの骨分化マーカーの発現が上昇し、この現象はヒストン H3 のアセチル化というエピジェネティックな制御異常と関連していることを報告した(Li et al., 2011)。この報告は、本研究において PS dish 上で 14 日培養した MSC で *Runx2* 遺伝子の発現が上昇した理由を

説明し得るものであると考えられる。本研究では、DN ゲルおよび HAp 焼結体は、PS dish での培養と比較して、7 日目および 14 日目のいずれにおいても、*Runx2* の遺伝子発現が僅かではあるが有意に上昇していた。この事象を説明し得る先行研究はないが、PS dish 上での MSC 培養と同様の現象が起きていたと考えられる。このような PS dish、DN ゲル、HAp 焼結体での骨分化マーカー遺伝子の発現上昇は *Runx2* のみで見られ、他の骨分化マーカーでは見られなかった。従って *Runx2* 遺伝子単独の発現上昇は、MSC の骨分化を意味するものではないと考えた。実際に Wada らは DN ゲルを家兎大腿骨に移植しても、生体内で骨分化が誘導されないことを報告している(Wada et al., 2016)。また、HAp 焼結体は *in vitro* あるいは *in vivo* において MSC の骨分化を誘導できないことが知られている(Damien and Parsons, 1991)。

Substudy3 では、*in vivo* で HAp/DN ゲル円柱プラグを骨孔に移植すると、移植 3 日目に HAp/DN ゲルと骨壁の界面に MSC マーカー陽性の紡錘形細胞がリクルートされることが確認された。術後 7 日目には *Runx2* 陽性細胞が観察されたが、OCN 陽性細胞は観察されなかった。術後 14 日目には、OCN 陽性細胞が観察されたが、*Runx2* 陽性細胞は観察されなかった。形態的には、7 日目に観察された小型の円形核を持つ多角形の細胞は骨芽細胞であり、14 日目に観察された大きな楕円形の核を持つ細胞質に富んだ多角形の細胞は未熟な骨細胞であると考えられる。これらの *in vivo* での結果は、HAp/DN ゲル表面にリクルートされた MSC が、生体内において骨芽細胞とそれに続く骨細胞へと分化することを示唆している。*Runx2* の *in vivo* での発現プロファイルは、Substudy2 の *in vitro* での遺伝子発現プロファイルと一致するものであった。一方で OCN の *in vitro* と *in vivo* の発現プロファイルには差異が認められた。*in vitro* における OCN の遺伝子発現は 1 週間で上昇し、2 週間で減少したのに対し *in vivo* では、術後 14 日目で初めて OCN 陽性細胞が観察された。Catelas らは、ヒト MSC を *in vitro* で骨系統細胞に分化誘導した場合の遺伝子発現プロファイルを解析し、7 日目に上昇した OCN の発現が 28 日目に向けて徐々に減少しており、この現象はビタミン D の欠乏によるものであると考察している(Catelas et al., 2006)。本研究の *in vitro* の条件では、通常の *in vivo* の環境下で存在する骨芽細胞から骨細胞への成熟に必要な因子が不足している可能性が示唆された。これらの結果から、HAp/DN ゲルが骨髄由来 MSC に与える *in vitro* での効果は、*in vivo* 環境でも再現されている可能性が高いことが示唆された。

コラーゲン、ヒアルロン酸、アルギン酸、フィブリンなどを用いた MSC の骨分化を誘導する *in vitro* の研究が数多く行われている(Catelas et al., 2006; Krishna et al., 2016; Oh et al., 2012; Westhrin et al., 2015)。しかし、これらの研究はゲル内で MSC を培養する 3 次元培養であった。ハイドロゲル表面で MSC を

培養し、骨分化を誘導する *in vitro* の研究は少ない。Engler らは、硬さの異なる様々なコラーゲンコートしたポリアクリルアミドゲル上で MSC を 2 次元培養したところ、柔らかい条件では神経分化マーカー、硬い表面では骨分化マーカー、中間の硬さの条件では筋分化マーカーの発現が上昇したと報告している (Engler et al., 2006)。このように、*in vitro* の 2 次元培養で MSC を骨系統細胞へ分化誘導するためには、硬い表面が必要である考えられていた。しかし、本研究の 2 次元培養法で MSC の骨分化を誘導した HAp/DN ゲルは、圧縮試験でのヤング率が 84 kPa と低く、比較的柔らかい素材である (Nonoyama et al., 2016)。従って本研究では、HAp/DN ゲルが硬い素材ではないにも関わらず、2 次元培養法で MSC を骨系統細胞に分化誘導することが可能なこれまでにないバイオマテリアルであることを示唆している。なぜ HAp/DN ゲルが MSC の骨分化マーカーの発現を上昇させ、*in vitro* での MSC の骨分化を促進したのかを本研究で明らかにした。HAp 焼結体の結晶化度は非常に高く、HAp からのカルシウムイオン溶出は非常に限定的である。しかし HAp/DN ゲルでは、表面に直径約 600 nm の HAp ナノ粒子が存在しており、この HAp ナノ粒子の結晶化度は HAp 焼結体よりも低いため、*in vitro* の培養液中や *in vivo* の生体内組織であっても HAp/DN ゲル表面からカルシウムイオンやリンイオンが溶出し得る (Nonoyama et al., 2016)。実際に本研究では、HAp/DN ゲルからカルシウムイオンとリンイオンが 2 週間にわたり漸増しながら放出されていた。更に HAp/DN ゲル上で MSC を培養すると、7 日目に比べて 14 日目にはこれらのイオンの含量が減少していることがわかった。これらの結果から、HAp/DN ゲルから安定的に溶出されたカルシウムイオンとリンイオンを MSC が利用して、骨分化が誘導されていることが示唆された。また、Chai らは、リン酸カルシウムを用いたバイオマテリアル上でヒト骨膜由来 MSC を培養すると、カルシウムイオンとリン酸イオンが用量および時間依存的に骨分化マーカーの遺伝子発現を上昇させることを報告した (Chai et al., 2011)。また、両イオンともに BMP-2 の遺伝子発現を上昇させたと報告している。これらの結果は、放出されたカルシウムイオンとリン酸イオンが BMP シグナル伝達経路を活性化した結果、MSC の骨分化を誘導する可能性を示唆している。Kim らは、dexamethasone 添加培地で培養したヒト骨髄由来 MSC において、カルシウムとリン酸イオンの組み合わせが BMPs/SMAD および RAS シグナル伝達経路を介して骨分化を誘導することを報告している (Kim et al., 1999)。また、Jung らは、MC3T3-E1 細胞 (骨芽細胞株) を培養し、HAp から放出されるカルシウムイオンが、L 型カルシウムチャネルおよびカルシウム/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ 2 を介して、骨関連タンパク質、OPN と BSP の発現を活性化し、骨芽細胞への分化を促進することを報告した (Jung et al., 2010)。Dvorak らは、骨芽細胞はカルシウムイオ

ン濃度を感知し、時間および濃度依存的に反応すること、そしてカルシウムイオンの変動が骨細胞の運命に影響を与えることを報告している(Dvorak et al., 2004)。従って、HAp/DN ゲルから溶出されるカルシウムイオンとリン酸イオンが BMP/SMAD シグナル伝達経路を介して、MSC の骨分化を誘導する上で重要な役割を担っていると考えられる。本研究では、HAp/DN ゲルによる骨分化誘導のシグナル伝達経路を明らかにするために、マイクロアレイ解析を用いて MSC の遺伝子発現を網羅的に解析する次の研究が必要であることが示唆された。

本研究にはいくつかの限界がある。第一に、本研究では家兎から採取した骨髓由来細胞を用いたため、起源が異なる種の細胞について言及することができない。第二に、ABS にどのような生物学的活性因子が含まれているかを明らかにしていないため、ABS が FBS よりも骨髓由来 MSC の培養に優れている理由を説明することができていない。第三に、本研究では骨分化に関連する 8 つのマーカー分子の mRNA 発現量を評価したが、これらのタンパク質発現レベルを確認していないことである。第四に、培養期間が 14 日間と限られているため、*in vitro* で MSC が HAp/DN ゲル上で成熟した骨細胞へ分化できたかは明らかにされていない。これらの限界を越えて、本研究では比較的柔らかい HAp/DN ゲルが、2 次元培養においても *in vitro* で骨髓由来 MSC の骨系統細胞への分化を誘導することを示した最初の研究であり、価値の高い研究と考える。

結論

1. 本研究から得られた新知見

- 1) 家兎骨髄由来細胞を自家血清含有培地で培養すると MSC としての性質を有する細胞が得られる。
- 2) 骨髄由来 MSC を HAp/DN ゲル上で培養すると、骨系統細胞への分化誘導が生じる。
- 3) MSC は、HAp/DN ゲルのミクロ的に粗造な表面構造に接着する。
- 4) HAp/DN ゲルから安定して溶出するカルシウムイオンとリンイオンが、MSC の分化誘導に重要な役割を果たしている。
- 5) *in vivo* 条件下において HAp/DN ゲルは早期に MSC をリクルートし、1 週で骨芽細胞に、2 週で骨細胞へ分化促進した。

2. 新知見の意義

HAp/DN ゲルを大腿骨に移植した場合に、早期かつ強固に固着する理由は、大腿骨骨髄に存在する MSC を骨系統細胞へ早期に分化誘導することによって生じることが明らかになった。本研究により得られた新知見により、HAp/DN ゲルを人工軟骨として臨床応用できる可能性が高まった。

3. 本研究で得られた新知見に基づく今後の研究の展開

本研究で明らかになった HAp/DN ゲルの骨への早期接着メカニズムを元に、HAp/DN ゲルが人工軟骨として臨床応用できる可能性が高まった。HAp/DN ゲルが MSC をリクルートし、骨形成を促すことが明らかになったため、今後は表面にポーラス構造を持たせることにより、MSC のリクルート及び骨分化誘導が生じる面を拡大し、初期固定性を高めるような新規バイオマテリアルの開発を検討している。

4. 今後の課題

本研究では大腿骨外側顆にゲルプラグを移植しているが、これは実際の臨床での臨床応用を想定した移植部位ではない。今後は膝関節内の荷重部に移植することによって、本研究と同様に MSC をリクルートし骨系統細胞へ分化させることができるかを検討する必要がある。

謝辞

本研究と論文作成にあたり直接ご指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院整形外科学教室の名誉教授安田和則教授に深謝いたします。また、適切な助言と直接の御指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院腫瘍病理学教室、田中伸哉教授、津田真寿美准教授に感謝の意を表します。また培養機材に関する指導、情報提供をいただきました北海道大学大学院先端生命科学研究院先端融合科学研究部門ソフト&ウェットマター研究室の龔劍萍教授および野々山貴行准教授、同転成ソフトマター研究室の黒川孝幸教授に感謝いたします。

最後に、本論文を作成するに当たってご指導・ご協力を頂いたすべての皆様に、重ねて御礼申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない

引用文献

- Abramoff, B., and Caldera, F.E. (2020). Osteoarthritis: Pathology, Diagnosis, and Treatment Options. *Med Clin North Am* 104, 293-311.
- Adachi, N., Ochi, M., Deie, M., Nakamae, A., Kamei, G., Uchio, Y., and Iwasa, J. (2014). Implantation of tissue-engineered cartilage-like tissue for the treatment for full-thickness cartilage defects of the knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 22, 1241-1248.
- Arakaki, K., Kitamura, N., Fujiki, H., Kurokawa, T., Iwamoto, M., Ueno, M., Kanaya, F., Osada, Y., Gong, J.P., and Yasuda, K. (2010). Artificial cartilage made from a novel double-network hydrogel: In vivo effects on the normal cartilage and ex vivo evaluation of the friction property. *J Biomed Mater Res A* 93, 1160-1168.
- Azuma, C., Yasuda, K., Tanabe, Y., Taniguro, H., Kanaya, F., Nakayama, A., Chen, Y.M., Gong, J.P., and Osada, Y. (2007). Biodegradation of high-toughness double network hydrogels as potential materials for artificial cartilage. *J Biomed Mater Res A* 81, 373-380.
- Bahn, J.J., Chung, J.Y., Im, W., Kim, M., and Kim, S.H. (2012). Suitability of autologous serum for expanding rabbit adipose-derived stem cell populations. *J Vet Sci* 13, 413-417.
- Baker, M.I., Walsh, S.P., Schwartz, Z., and Boyan, B.D. (2012). A review of polyvinyl alcohol and its uses in cartilage and orthopedic applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 100B, 1451-1457.
- Baksh, D., Yao, R., and Tuan, R.S. (2007). Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* 25, 1384-1392.
- Baujard-Lamotte, L., Noinville, S., Goubard, F., Marque, P., and Pauthe, E. (2008). Kinetics of conformational changes of fibronectin adsorbed onto model surfaces. *Colloids Surf B Biointerfaces* 63, 129-137.
- Bavaresco, V.P., de Carvalho Zavaglia, C.A., de Carvalho Reis, M., and Malmonge, S.M. (2000). Devices for use as an artificial articular surface in joint prostheses or in the repair

of osteochondral defects. *Artif Organs* 24, 202-205.

Bhosale, A.M., and Richardson, J.B. (2008). Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *British Medical Bulletin* 87, 77-95.

Bray, J.C., and Merrill, E.W. (1973). Poly(vinyl alcohol) hydrogels for synthetic articular cartilage material. *J Biomed Mater Res* 7, 431-443.

Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., and Peterson, L. (1994). Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331, 889-895.

Bruderer, M., Richards, R.G., Alini, M., and Stoddart, M.J. (2014). Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *Eur Cell Mater* 28, 269-286.

Catelas, I., Sese, N., Wu, B.M., Dunn, J.C., Helgersson, S., and Tawil, B. (2006). Human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation in fibrin gels in vitro. *Tissue Eng* 12, 2385-2396.

Chai, Y.C., Roberts, S.J., Schrooten, J., and Luyten, F.P. (2011). Probing the osteoinductive effect of calcium phosphate by using an in vitro biomimetic model. *Tissue Eng Part A* 17, 1083-1097.

Crawford, D.C., Miller, L.E., and Block, J.E. (2013). Conservative management of symptomatic knee osteoarthritis: a flawed strategy? *Orthop Rev (Pavia)* 5, e2.

Custers, R.J., Dhert, W.J., van Rijen, M.H., Verbout, A.J., Creemers, L.B., and Saris, D.B. (2007). Articular damage caused by metal plugs in a rabbit model for treatment of localized cartilage defects. *Osteoarthritis Cartilage* 15, 937-945.

Damien, C.J., and Parsons, J.R. (1991). Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. *J Appl Biomater* 2, 187-208.

Dekker, T.J., Aman, Z.S., DePhillipo, N.N., Dickens, J.F., Anz, A.W., and LaPrade, R.F. (2021). Chondral Lesions of the Knee: An Evidence-Based Approach. *J Bone Joint Surg Am* 103, 629-645.

Deligianni, D.D., Katsala, N.D., Koutsoukos, P.G., and Missirlis, Y.F. (2001). Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials* 22, 87-96.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.

Dvorak, M.M., Siddiqua, A., Ward, D.T., Carter, D.H., Dallas, S.L., Nemeth, E.F., and Riccardi, D. (2004). Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5140-5145.

Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., and Discher, D.E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126, 677-689.

Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., and Lalykina, K.S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3, 393-403.

Furukawa, T., Eyre, D.R., Koide, S., and Glimcher, M.J. (1980). Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg Am* 62, 79-89.

Hall, A.J., Stubbs, B., Mamas, M.A., Myint, P.K., and Smith, T.O. (2016). Association between osteoarthritis and cardiovascular disease: Systematic review and meta-analysis. *Eur J Prev Cardiol* 23, 938-946.

Harris, J.D., Siston, R.A., Brophy, R.H., Lattermann, C., Carey, J.L., and Flanigan, D.C. (2011). Failures, re-operations, and complications after autologous chondrocyte implantation--a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage* 19, 779-791.

Horn, P., Bork, S., Diehlmann, A., Walenda, T., Eckstein, V., Ho, A.D., and Wagner, W. (2008). Isolation of human mesenchymal stromal cells is more efficient by red blood cell

lysis. *Cytotherapy* 10, 676-685.

Iwamoto, T., Hieda, Y., and Kogai, Y. (2016). Effect of hydroxyapatite surface morphology on cell adhesion. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 69, 1263-1267.

Jian Ping Gong, Y.K., Takayuki Kurokawa, Yoshihito Osada (2003). Double-Network Hydrogels with Extremely High Mechanical Strength. *Adv Mater* 15.

Jung, G.Y., Park, Y.J., and Han, J.S. (2010). Effects of HA released calcium ion on osteoblast differentiation. *J Mater Sci Mater Med* 21, 1649-1654.

Kim, C., Cheng, S., and Kim, G. (1999). Effects of dexamethasone on proliferation, activity, and cytokine secretion of normal human bone marrow stromal cells: possible mechanisms of glucocorticoid-induced bone loss. *Journal of Endocrinology* 162, 371-379.

Kobayashi, M., and Oka, M. (2004). Composite Device for Attachment of Polyvinyl Alcohol-hydrogel to Underlying Bone. *Artificial Organs* 28, 734-738.

Komori, T. (2010). Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. *Adv Exp Med Biol* 658, 43-49.

Krill, M., Early, N., Everhart, J.S., and Flanigan, D.C. (2018). Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) for Knee Cartilage Defects: A Review of Indications, Technique, and Outcomes. *JBJS Rev* 6, e5.

Krishna, L., Dhamodaran, K., Jayadev, C., Chatterjee, K., Shetty, R., Khora, S.S., and Das, D. (2016). Nanostructured scaffold as a determinant of stem cell fate. *Stem Cell Research & Therapy* 7.

Lee, K.S., Kim, H.J., Li, Q.L., Chi, X.Z., Ueta, C., Komori, T., Wozney, J.M., Kim, E.G., Choi, J.Y., Ryoo, H.M., et al. (2000). Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol* 20, 8783-8792.

Li, Z., Liu, C., Xie, Z., Song, P., Zhao, R.C.H., Guo, L., Liu, Z., and Wu, Y. (2011).

Epigenetic Dysregulation in Mesenchymal Stem Cell Aging and Spontaneous Differentiation. PLoS ONE 6, e20526.

Matsusue, Y., Yamamuro, T., and Hama, H. (1993). Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. Arthroscopy 9, 318-321.

Miron, R.J., and Zhang, Y.F. (2012). Osteoinduction: a review of old concepts with new standards. J Dent Res 91, 736-744.

Mithoefer, K., McAdams, T., Williams, R.J., Kreuz, P.C., and Mandelbaum, B.R. (2009). Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee: an evidence-based systematic analysis. Am J Sports Med 37, 2053-2063.

Muraki, S., Oka, H., Akune, T., Mabuchi, A., En-yo, Y., Yoshida, M., Saika, A., Suzuki, T., Yoshida, H., Ishibashi, H., et al. (2009). Prevalence of radiographic knee osteoarthritis and its association with knee pain in the elderly of Japanese population-based cohorts: the ROAD study. Osteoarthritis Cartilage 17, 1137-1143.

Niemeyer, P., Pestka, J.M., Kreuz, P.C., Erggelet, C., Schmal, H., Suedkamp, N.P., and Steinwachs, M. (2008). Characteristic complications after autologous chondrocyte implantation for cartilage defects of the knee joint. Am J Sports Med 36, 2091-2099.

Nonoyama, T., Wada, S., Kiyama, R., Kitamura, N., Mredha, M.T., Zhang, X., Kurokawa, T., Nakajima, T., Takagi, Y., Yasuda, K., et al. (2016). Double-Network Hydrogels Strongly Bondable to Bones by Spontaneous Osteogenesis Penetration. Adv Mater 28, 6740-6745.

Oh, S.A., Lee, H.Y., Lee, J.H., Kim, T.H., Jang, J.H., Kim, H.W., and Wall, I. (2012). Collagen three-dimensional hydrogel matrix carrying basic fibroblast growth factor for the cultivation of mesenchymal stem cells and osteogenic differentiation. Tissue Eng Part A 18, 1087-1100.

Oka, M., Ushio, K., Kumar, P., Ikeuchi, K., Hyon, S.H., Nakamura, T., and Fujita, H. (2000). Development of artificial articular cartilage. Proc Inst Mech Eng H 214, 59-68.

Pareek, A., Carey, J.L., Reardon, P.J., Peterson, L., Stuart, M.J., and Krych, A.J. (2016).

Long-Term Outcomes after Autologous Chondrocyte Implantation: A Systematic Review at Mean Follow-Up of 11.4 Years. *Cartilage* 7, 298-308.

Shahdadfar, A., Fronsdal, K., Haug, T., Reinholt, F.P., and Brinchmann, J.E. (2005). In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells* 23, 1357-1366.

Steadman, J.R., Rodkey, W.G., Singleton, S.B., and Briggs, K.K. (1997). Microfracture technique for full-thickness chondral defects: technique and clinical results. *Operative Techniques in Orthopaedics* 7, 300-304.

Stein, A. (2007). Decreasing variability in your cell culture. *BioTechniques* 43, 228-229.
Tanabe, Y., Yasuda, K., Azuma, C., Taniguro, H., Onodera, S., Suzuki, A., Chen, Y.M., Gong, J.P., and Osada, Y. (2008). Biological responses of novel high-toughness double network hydrogels in muscle and the subcutaneous tissues. *J Mater Sci Mater Med* 19, 1379-1387.

Vasicek, J., Kovac, M., Balazi, A., Kulikova, B., Tomkova, M., Olexikova, L., Curlej, J., Bauer, M., Schnabl, S., Hilgarth, M., et al. (2020). Combined approach for characterization and quality assessment of rabbit bone marrow-derived mesenchymal stem cells intended for gene banking. *N Biotechnol* 54, 1-12.

Vohra, S., Hennessy, K.M., Sawyer, A.A., Zhuo, Y., and Bellis, S.L. (2008). Comparison of mesenchymal stem cell and osteosarcoma cell adhesion to hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med* 19, 3567-3574.

Wada, S., Kitamura, N., Nonoyama, T., Kiyama, R., Kurokawa, T., Gong, J.P., and Yasuda, K. (2016). Hydroxyapatite-coated double network hydrogel directly bondable to the bone: Biological and biomechanical evaluations of the bonding property in an osteochondral defect. *Acta Biomater* 44, 125-134.

Wagner, W., Horn, P., Castoldi, M., Diehlmann, A., Bork, S., Saffrich, R., Benes, V., Blake, J., Pfister, S., Eckstein, V., et al. (2008). Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS One* 3, e2213.

Westhrin, M., Xie, M., Olderøy, M., Sikorski, P., Strand, B.L., and Standal, T. (2015). Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in mineralized alginate matrices. PLoS One 10, e0120374.

Yasuda, K., Ping Gong, J., Katsuyama, Y., Nakayama, A., Tanabe, Y., Kondo, E., Ueno, M., and Osada, Y. (2005). Biomechanical properties of high-toughness double network hydrogels. Biomaterials 26, 4468-4475.