

論文内容要旨

論文題目 ヒト骨髄由来間葉系幹細胞を利用した硝子軟骨－線維軟骨複合体の作製

学位申請者 杉野 浩孝

[緒言]

顎関節軟骨は、表層の線維軟骨および深層の硝子軟骨からなる二層構造を特徴とする複合組織である。軟骨は血管、神経、リンパ管を欠き自己修復能力に乏しく、顎関節症等により構造破壊が生じた場合、自然治癒の過程で深層の硝子軟骨が線維軟骨に置換される。しかし線維軟骨と硝子軟骨は構造および機能の点で大きく異なるため、組織修復後、疼痛や機能障害といった症状が頻発する。そこで、昨今の再生医学研究では、硝子軟骨の再生が重要な課題の一つとなっており、間葉系幹細胞をはじめとする多分化能を有する細胞から組織構造を修復する試みが行われている。しかし、これまでの研究においては、均質な硝子軟骨の再生を目的とするに留まり、硝子軟骨と線維軟骨を一つの新生組織体内に作り分けることや、顎関節軟骨のような多層構造をもつ組織の修復は未だ困難である。そこで本研究では、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) を用いて、硝子軟骨および線維軟骨への分化に適した条件を探索するとともに、硝子軟骨および線維軟骨の二層構造をもつ軟骨様組織体の構築を目的とした。

[方法]

細胞は不死化 hMSC および正常 hMSC を用いた。それらを軟骨に分化させるため、高密度での培養が可能なペレット培養を行った。

まず、硝子軟骨及び線維軟骨への分化に適した培養条件の探索するため、種々の細胞成長因子およびコラーゲンを添加した軟骨分化培地を用いてペレット培養をおこなった。細胞成長因子には、トランスフォーミング増殖因子 β -3 (TGF β -3)、インスリン様成長因子-1 (IGF-1)、あるいは骨形成タンパク質-2 (BMP-2) を用い、コラーゲンには I 型あるいは II 型コラーゲンをを用いた。28 日間の培養後に細胞を回収し、リアルタイム PCR (qPCR) によって軟骨関連遺伝子の発現量を分析するとともに、組織切片のトルイジンブルー染色によって軟骨分化の程度を調べた。qPCR による分析結果をもとに、II 型コラーゲン遺伝子および I 型コラーゲン遺伝子の発現比 (col2/col1 比) を算出し、この値が比較的小さい場合を線維軟骨分化に、また、この値が比較的大きい場合を硝子軟骨への分化に適した条件であると判断した。

以上の検討で得られた知見をもとに、線維軟骨様ペレットおよび硝子軟骨様ペレットを作製し、その後、両ペレットを密着させながら培養することによってペレット同士を結合させた。計 28 日間の培養の後に組織切片を作製し、免疫染色法によって組織体内における I 型

別紙様式 2

および II 型コラーゲンの分布について調べた。

[結果及び考察]

II 型コラーゲンおよびアグリカンは、軟骨組織に高発現する細胞外マトリックスである。そこで、培養後のペレット内におけるそれらの発現量を調べた結果、TGFβ-3 を単独、および、TGFβ-3 と BMP-2 あるいは TGFβ-3 と IGF-1 を同時に作用させた場合に、II 型コラーゲンおよびアグリカンの発現がもっとも高値であった。すなわち、hMSC の軟骨分化には、とくに TGFβ-3 が有効であると考えられた。この結果は、以前の報告とよく一致する。

種々の条件下で培養したペレットにおける col2 /col1 比は、TGFβ-3 を単独で添加した場合と比較し、TGFβ-3 と BMP-2 を同時に作用させた場合に小さく、TGFβ-3 と IGF-1 の組合せた場合に大きかった。この結果から、TGFβ-3 に加えて BMP-2 を添加すると線維軟骨様組織が、一方、IGF-1 を添加すると硝子軟骨様組織が形成される傾向にあることがわかった。

TGFβ と BMP はいずれも、Smad 系シグナル伝達経路を介して hMSC の軟骨形成を促進することが知られている。また、過剰なシグナルが組織の線維化を引き起こすとの報告がある。従って、TGFβ-3 と BMP-2 の同時添加でみられた線維軟骨様組織の形成は、過剰なシグナルに起因すると考えられる。他方 IGF-1 は、TGFβ に基づくシグナルとは異なる経路を介して軟骨成熟に関与することが知られている。この効果が、TGFβ-3 と IGF-1 の同時添加による硝子軟骨様組織の形成に寄与したものであると思われる。さらに、ペレットにおける col2 /col1 比は、II 型コラーゲンの添加によって上昇した。すなわち、II 型コラーゲンの添加が硝子軟骨分化に有効であることが示された。以上の細胞成長因子および II 型コラーゲンの効果は、正常 hMSC でも同様にみられた。

線維軟骨様組織および硝子軟骨様組織をもつペレットを別々に作製した後、両者を密着させて培養した。その結果、両ペレットの細胞が界面において増殖し、ペレット同士が合一した。免疫染色により、密着培養の開始初期に線維軟骨様組織であった部位では硝子軟骨様組織であった部位に比べ I 型コラーゲンの産生量が多く、逆に II 型コラーゲンの産生量は少ないことがわかった。この結果は、線維軟骨／硝子軟骨の二層構造をもつ組織体の形成されたことを示している。

[結論]

hMSC の軟骨分化培養において、TGFβ-3 および BMP-2 を培地に添加すると線維軟骨の形成が促進され、一方、TGFβ-3、IGF-1、II 型コラーゲンを添加すると硝子軟骨の形成が促進される。線維軟骨様ペレットと硝子軟骨様ペレットを密着させて培養することによって、線維軟骨／硝子軟骨の二層構造をもつ組織体の形成が可能である。