

論文内容要旨

In Vivo Kinetics of Mesenchymal Stem Cells
Transplanted into the Knee Joint in a Rat Model
Using a Novel Magnetic Method of Localization
(磁気ターゲティング法を用いラット膝関節内に投
与した骨髄間葉系幹細胞の体内動態解析)
Clinical and Translational Science, 8 (5): 467-474,
2015.

主指導教員：安達 伸生教授
(統合健康科学部門 整形外科学)
副指導教員：大段 秀樹教授
(応用生命科学部門 消化器・移植外科学)
副指導教員：久保 忠彦准教授
(統合健康科学部門 整形外科学)

生田 祥也
(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

論文題目

In Vivo Kinetics of Mesenchymal Stem Cells Transplanted into the Knee Joint in a Rat Model Using a Novel Magnetic Method of Localization

(磁気ターゲティング法を用いラット膝関節内に投与した骨髄間葉系幹細胞の体内動態解析)

関節軟骨は自己修復能力が低いため外傷性の軟骨損傷は自然治癒せず、軟骨変性が進行し変形性膝関節症となる。軟骨損傷に対する外科治療として、骨髄刺激法や骨軟骨柱移植が広く行われてきたが、その効果や適応範囲には限界があった。一方で自家骨髄間葉系幹細胞の関節内注射による治療の有効性が報告されているが、軟骨修復には投与された細胞の一部しか寄与していないと推測されている。また膝関節軟骨欠損モデルに対する間葉系幹細胞投与の動物実験では、細胞投与量を増やすことで関節内遊離体形成などの合併症が誘発された。細胞治療の安全性確保のためには適切な数の移植細胞を関節内へ効果的に投与する必要がある。

当科では膝関節軟骨欠損に対し、磁性体を封入した骨髄間葉系幹細胞を注射などで低侵襲に体内へ投与し、体外から磁場により欠損部へ集積させる「磁気ターゲティング」を開発し、これまでの動物実験において、その有効性を報告してきた。骨髄間葉系幹細胞は静脈内などの全身投与後には肺などの臓器に捕捉されることが報告されているが、膝関節内に投与された細胞の動態については、未だ明らかにされておらず、安全性確保の点で非常に重要である。今回、膝関節軟骨再生の臨床応用に向けた安全性評価のための非臨床試験として、生体 3 次元蛍光 CT イメージングを用いラット膝関節軟骨欠損モデルにおける磁気ターゲティング後の移植細胞の体内動態、経時的な分布の変化を調査した。

9 週齢雌ヌードラットの右膝に関節切開を加え、軟骨欠損を作製しない群(正常軟骨群 ; n=6)と作製する群(軟骨欠損群 ; n=6)および軟骨欠損を作製し磁気ターゲティングを併用する群(磁場群 ; n=6)へ類別した。またラット尾静脈より 5×10^5 個のヒト骨髄間葉系幹細胞を全身投与する、静脈投与群を作製した。軟骨欠損群、磁場群では大腿骨滑車部に径 2mm の全層軟骨欠損を作製した。ヒト骨髄間葉系幹細胞を長波長の蛍光色素である XenoLight DiR (DiIC18(7))で標識し、MRI 用造影剤として臨床使用されているフェルカルボトランにより磁性体封入を行った後、 5×10^4 個のヒト骨髄間葉系幹細胞を正常軟骨群、軟骨欠損群および磁場群のラット膝関節内へ投与した。なお磁場群では、超小型超伝導バルク磁石を用い生成した磁場(1.5 テスラ)の存在下に細胞投与を行い、軟骨欠損部を投与後 10 分間磁場内に保持した。生体 3 次元蛍光イメージング機器である IVIS Spectrum CT を用い、細胞投与直後、投与後 1、3、7、14、21、28 日目に生体蛍光イメージングを行い、投与した骨髄間葉系幹細胞の分布を 3 次元 CT 画像上で経時的に評価した。また関心領域を設定し右膝関節周囲の蛍光輝度を計測した。28 日目には主要臓器(脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓)および右膝を摘出し体外での蛍光イメージングを行った。摘出した主要臓器の凍結切片を作製しベルリンブルー染色、抗ヒトミトコンドリア抗体による免疫染色を行い、主要臓器における鉄、ヒト骨髄間葉系幹細胞の含有を調査した。さらに主要臓器より

RNA を抽出し、特異性を有するヒト GAPDH をプライマーとして RT-PCR を行い、ヒト遺伝子発現の有無を評価した。

結果は、膝関節内の蛍光信号は各群とも投与後 1 日目で最高値となり、以降は漸減した。開心領域を用い計測した蛍光輝度は磁場群で高い傾向にあり、投与後 3、7 日目では有意に高値であった。3 次元 CT 画像上で、正常軟骨群、軟骨欠損群では大腿骨滑車部および軟骨欠損部以外にも膝関節内で蛍光分布が分散していたが、磁場群では軟骨欠損部周囲のみに蛍光を認めた。生体 3 次元蛍光 CT イメージングシステムの検出限界を調査するため行った、蛍光標識した骨髄間葉系幹細胞の *in vitro* イメージングでは、蛍光輝度は細胞数に比例しており、検出限界は細胞数 1000 であった。この結果をふまえラット臓器からの RNA 抽出時に細胞数 500 のヒト骨髄間葉系幹細胞を加え、RT-PCR における陽性対照群とした。静脈投与群では、体外蛍光イメージングにて肺、肝臓、脾臓に蛍光がみられ、免疫染色でヒト由来の細胞を肺、肝臓、脾臓、腎臓に認め、RT-PCR ではすべての主要臓器にヒト遺伝子の発現を認めた。一方、すべての関節内投与群で生体および体外イメージングにおける主要臓器での蛍光はみられなかった。また RT-PCR におけるヒト遺伝子の発現や免疫染色でのヒト由来細胞の存在も認めなかった。

これまで骨髄間葉系幹細胞の全身投与では肝臓、肺、脾臓などにおける捕捉が報告されているものの、膝関節内に投与された骨髄間葉系幹細胞の動態については不明であった。本結果より膝関節内に投与された骨髄間葉系幹細胞は他の主要臓器へ移行しないことが明らかとなった。さらに膝関節の局所における経時的な移植細胞数の変化とともに、磁気ターゲティングによって関節内へ注入された移植細胞のほとんどが軟骨欠損部周囲へと集積することが明らかとなり、本法の有効性、安全性への寄与が推測された。