

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	生田 祥也
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
<p>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)</p>			
論文審査担当者			
主査	教授	檜山 英三	印
審査委員	教授	川上 秀史	
審査委員	教授	瀧原 義宏	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>関節軟骨は自己修復能力が低い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。一方で間葉系幹細胞(MSC)は再生医療における有力な細胞源として注目されており、軟骨損傷に対するMSC関節内注射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MSC投与の動物実験では、細胞投与量を増やすことで関節内の癒痕・遊離体形成が誘発された。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。</p> <p>当科では膝関節軟骨欠損に対し、磁性体を封入したMSC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。静脈内など全身投与後のMSCは肺などの臓器に捕捉されるが、膝関節内へ投与されたMSCの動態は、未だ明らかでなく、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。</p> <p>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<math>5 \times 10^5</math>個のヒトMSC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MSCを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い、長波長の蛍光色素であるXenoLight DiR (DiIC18(7))で標識した後、<math>5 \times 10^4</math>個のヒトMSC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MSC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</p>			

MSC 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、従来の生体蛍光イメージングで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。関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ったが統計学的な有意差はなかった。一方、生体 3 次元蛍光 CT イメージングでは、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。三次元の関心領域で計測した蛍光輝度は、磁場群が投与後 3、7 日目では有意に高値であった。本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 MSC 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。この結果をふまえて細胞を投与していないラット臓器からの RNA 抽出時に細胞数 500 のヒト MSC 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。

本研究において従来の生体蛍光イメージングでは、膝周囲の蛍光輝度は各群間で有意差はなかった。これはラットの膝が小さく、体表からの撮影のみでは移植細胞の詳細な局在を評価できないことが原因と考えられた。一方で生体 3 次元蛍光 CT イメージングでは、非磁場群の蛍光信号が膝関節内に拡散していたのに対し、磁場群では蛍光信号は軟骨欠損部周囲に集積していた。また移植後 3 日目と 7 日目の蛍光信号は磁場群で有意に高値であり、磁気ターゲティング法が移植細胞を欠損部周囲へ集積させるのみならず同部での生着・保持を促進すると考えられた。

これまで MSC の全身投与では肺、肝臓、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 MSC 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 MSC 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、磁性化 MSC 投与と磁気ターゲティングの併用治療における有効性、安全性への寄与が推測された。

以上の結果から、本論文は、膝関節内に移植した磁性化 MSC が外磁場により標的部位へ集積し、移植後の MSC は他の主要臓器に移行しないことを明らかにした。これより軟骨損傷に対する磁性化 MSC 投与と磁気ターゲティングの併用治療における有効性と安全性への寄与が示された。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。