

論 文 内 容 要 旨

In Vitro Safety and Quality of Magnetically Labeled Human Mesenchymal Stem Cells Preparation for Cartilage Repair

(軟骨修復に対する *in vitro* における磁性化ヒト骨髄間葉系幹細胞の安全性と品質評価)

Tissue Engineering Part C: Methods, 2019, in press.

主指導教員：安達 伸生教授

(医系科学研究科 整形外科学)

副指導教員：大段 秀樹教授

(医系科学研究科 消化器・移植外科学)

副指導教員：久保 忠彦准教授

(医系科学研究科 整形外科学)

根木 宏

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【目的】

関節軟骨は一度損傷すると修復が困難であり変形性関節症に移行し、疼痛や関節機能の低下につながる。ヒト骨髄間葉系幹細胞(MSC)は軟骨分化能を有し、軟骨損傷に対する治療の有効な手段として研究されてきた。Kobayashi らは MSC の細胞質に超常磁性酸化鉄(Ferucarbotran)を取り込ませ磁性化させることで、外部からの磁場によって細胞を軟骨欠損部に誘導する磁気ターゲティング法を報告した。磁気ターゲティング法は、低侵襲に MSC を効率的に軟骨欠損部に誘導することが可能であり、ミニブタを用いたモデルでは良好な軟骨修復が得られた。一方で高濃度の Ferucarbotran による磁性化がヒト MSC の軟骨分化を阻害することが明らかとなり磁気ターゲティングの臨床応用に向けて MSC の磁性化における安全性と品質の評価が必要である。本研究の目的は軟骨修復における磁性化ヒト MSC の安全性と品質を評価することである。

【方法】

実験には購入した 3 つの異なるドナーのヒト MSC を用いた。磁性化 MSC の安全性の評価のため、ヒト MSC を過去の報告と同様の Ferucarbotran 添加濃度 (97.56 μ g Fe/mL) で 12 時間磁性化し 0.55–5.48T の磁束密度のもと 10 分間磁場を照射し核型分析、コロニー形成アッセイ、そして長期培養における細胞増殖能の評価を行った。細胞増殖能の評価については磁性化を行わない control に加え、Ferucarbotran 添加量を倍量にしたもの、磁性化時間を 2 倍及び 3 倍にしたものを作成し培養時間に対する累積世代数(PDL: population doubling level)を検討した。磁性化 MSC の品質評価のため Ferucarbotran 添加濃度 (97.56 μ g Fe/mL=標準濃度) で磁性化する群に加えて、1/4, 1/2, 3/4 および 2 倍の濃度で磁性化する群、磁性化をしない control 群を作成した。各群で trypan blue 染色を行い cell viability を測定した。またそれぞれの磁性化濃度における細胞ライセートを作成し細胞内の鉄含有量を測定した。磁場への反応性を評価するため各群において永久磁石(0T,100mT,250mT,500mT)を設置した Micro fluidics chip へ 3.0×10^5 個/ml に調整した磁性化細胞を注入し、磁石に反応性を示さなかった細胞数(UAC)を検討した。さらに軟骨分化能を評価するためペレットカルチャーによる軟骨分化誘導を行い、スフェロイドの長径およびその切片の Toluidine 染色による組織学的評価、glycosaminoglycan(GAG)量、Type II コラーゲンの mRNA 発現量を評価した。

【結果】

核型分析ではいずれのドナーにおいても異常は認めなかった。コロニー形成アッセイでは足場依存性のコロニーの形成は認めなかった。細胞増殖能についてはいずれのドナーにおいても磁性化によってわずかに増殖能の促進を認めたが、1 つのロットにおいては 2 倍の濃度で磁性化を行ったものよりも通常濃度で磁性化を行った MSC に増殖能が高い傾向が認められた。すべてのドナーにおいて 100 日以内に MSC の細胞増殖は低下を示した。品質評価において、いずれの濃度においても磁性化 MSC の cell viability に有意差は認めなかった。それぞれの磁性化濃度における細胞内鉄含有量は濃度依存性に上昇する傾向を認めたが、ドナー間で鉄含有量には差を認めた。ペレットカルチャーにおけるスフェロイドのサイズは 2 倍の濃度で磁性化を行った場合はいず

れのドナーにおいても小さく、Toluidine による染色性も低かった。また、細胞内鉄含有量が多い傾向にあるドナーでは全体的にサイズが小さく Toluidine による染色性も低い傾向にあった。同様に GAG 量及び Type II コラーゲンの mRNA 発現量についても濃度依存性に低下を認め、細胞内鉄含有量が多い傾向にあるドナーでは特に低下を認めた。磁場に対する磁性化 MSC の反応性については磁束密度 0mT 下においてはいずれの濃度においても差は認めなかったが、磁束密度の上昇とともに UAC 量は減少し、標準濃度においては 100mT 以上の磁束密度下では全てのドナーにおいて control 群に比較し UAC 量は有意に低下した。一方で、細胞内鉄含有量が多い傾向にあるドナーにおいては 100mT の磁束密度下においても 1/2 の Ferucarbotran 添加濃度で UAC 量の有意な低下を示した。

【考察】

本研究の結果、MSC の磁性化は MSC の核型への影響は示さず、コロニー形成アッセイでは足場非依存性増殖を示さなかった。また磁性化に伴い増殖能が亢進する一方で、長期の経過に伴い増殖は停止していた。以上のことから MSC の磁性化はその増殖能を促進させる一方で異常な増殖を来す悪性転化の危険性は低く MSC の安全性に影響を及ぼさないことが示された。一方で、ペレットカルチャーの結果、過去の報告と同様に添加される Ferucarbotran の濃度によって軟骨分化能が障害されることが判明した。過去の報告に基づいた Ferucarbotran 添加濃度 (97.56 μ g Fe/mL) では磁気ターゲティング法により良好な軟骨の修復が獲得できている。本研究においても同濃度による磁性化を行えば 100mT 以上の磁束密度下において磁性化 MSC の誘導性が獲得できることが示された。一方で、同等の濃度と磁性化時間で磁性化を行ってもドナー間で細胞内の鉄含有量が異なるため、事前に移植する MSC の品質を評価することで軟骨欠損部への磁性化 MSC の誘導および欠損部における軟骨分化を効率的に行うことが可能であると考えられる。