

論 文 内 容 要 旨

Magnetic Resonance Imaging Evaluation of
Cartilage Repair and Iron Particle Kinetics After
Magnetic Delivery of Stem Cells
(MRI を用いた間葉系幹細胞の磁気ターゲティング
における磁性体と軟骨修復の評価の検討)
Tissue Engineering: Part C Methods, 24(12):679-687, 2018.

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)

大田 悠貴

(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、関節軟骨の損傷は変形性関節症を惹起し、関節機能の低下や疼痛の原因となる。そのため、損傷した軟骨に対する適切な治療が求められている。軟骨再生医療において、胚性幹細胞や軟骨細胞移植が有用なソースとして報告をされているが、当教室では軟骨採取に比べて採取が低侵襲な骨髄間葉系細胞（MSC）を用いた再生医療について今まで報告してきた。Kobayashi らは、関節軟骨欠損に対して間葉系幹細胞（MSC）を磁性化し、体外磁場装置を用いて軟骨欠損部位へ細胞を集積させる磁気ターゲティング法を開発した。当教室では MSC 磁気ターゲティング法を用いた軟骨再生治療の臨床試験を開始している。これまでに *in vivo* イメージングによる移植細胞動態の評価は行ったが、移植細胞内に取り込まれている磁性体（ferucarbotran）の動態や MRI 撮影の影響については明らかではない。本研究では関節軟骨欠損モデルに対して MSC 磁気ターゲティングを行い、MRI を用いた経時的評価で、移植細胞内の ferucarbotran の動態と MRI 撮影の安全性について確認することを目的とした。

【方法】

日本白色家兎を使用し ϕ 2mm の膝関節軟骨欠損モデルを作成した。軟骨欠損部に ferucarbotran を用いて磁性化した MSC（磁性化 MSC）を投与し磁気ターゲティングを行った群（m-MSC 群）、欠損部に MSC を投与した群（MSC 群）、欠損部に PBS を投与した群（control 群）を作成した。各群を動物用 4.7T-MRI を用いて、処置後 1 週、4 週、12 週で膝関節矢状断のプロトン密度強調（PDW）画像、T2*画像および T2 計算画像を撮影した。また同時に骨軟骨欠損部の肉眼的評価（Gross grading score）と HE 染色、サフラニン O 染色、Berlin blue 染色、Type II コラーゲンの免疫学的染色を行い再生組織の組織学的評価（Wakitani score）も行った。

【結果】

肉眼所見では control 群の骨軟骨欠損部に明らかな変化を認めなかったが、MSC 群と m-MSC 群では骨軟骨欠損部が経時的に修復組織で充填されており、処置後 12 週における Gross grading score は m-MSC 群で 12.0 点、MSC 群で 8.0 点、control 群で 3.5 点であり、m-MSC 群が他群に比べて有意に良好であった（ $p < 0.05$ ）。組織学的評価では、処置後 12 週で m-MSC 群の欠損部は硝子軟骨により覆われており、Wakitani score は m-MSC 群で平均 2.0 点であり、MSC 群（7.0 点）・control 群（11.4 点）に比べて有意に良好であった。処置後 4 週と 12 週における Type II コラーゲンの免疫学的染色について、m-MSC 群で修復組織は良好に染色されたが、MSC 群・control 群では修復組織は染色されなかった。m-MSC 群の Berlin blue 染色において、処置後 1 週で軟骨欠損部と一致した部位に ferucarbotran を取り込んだ細胞が多数検出されたが、処置後 4 週で ferucarbotran を取り込んだ細胞は減少し、そして処置後 12 週では ferucarbotran を取り込んだ細胞は認めなかった。

PDW 画像では、骨軟骨欠損部が MSC 群と m-MSC 群で徐々に軟部組織で覆われていることが確認で

きた。T2 計算画像から作成した T2 mapping では、欠損部と一致した部位に修復組織を認め、修復組織の T2 値は正常の軟骨と同等の T2 値であった。処置後 12 週における欠損部で軟骨組織と同等の T2 値を描出した領域の割合は m-MSC 群は 63.6%であり、MSC 群(52.3%)・Control 群(40.0%)に比べて有意に広がった ($p < 0.05$)。T2*画像では、m-MSC 群において欠損部から関節内に及ぶ ferucarbotran による低信号領域が確認でき、低信号領域は経時的に縮小していった。

【考察】

本研究において、軟骨欠損部に磁性化 MSC を投与し磁気ターゲティングを行った群は、欠損部に MSC を投与した群・欠損部に PBS を投与した群に比べて骨軟骨欠損部の修復について優れており、MRI で評価できることが示された。T2 mapping 画像は軟骨と同等の T2 値を有する修復組織を描出することが出来た。処置後 12 週の T2 mapping 画像で m-MSC 群は他群に比べて有意に広く T2 値を描出でき、組織学的評価においても同様の結果を認めた。つまり、T2 mapping 画像における描出した T2 値や面積は組織学的な軟骨修復を反映していた。

また、本研究の結果より、移植した磁性化 MSC の局在と膝関節内での ferucarbotran の動態は T2*画像で評価できることが証明された。m-MSC 群では、移植した磁性化 MSC は T2 *画像における低信号領域として描出され、外磁場によって誘導した欠損部に一致して集積していた。T2*画像において m-MSC 群では処置後 1 週と 4 週で膝関節内の低信号領域は他群に比べて有意に広く経時的に縮小した。Berlin blue 染色によって移植細胞内の ferucarbotran は処置後 1 週で軟骨欠損部と一致した部位に検出され、処置後 4 週で減少し、そして処置後 12 週で消失した。つまり、T2 *画像における低強度領域の経時的な減少は、Berlin blue 染色における ferucarbotran の減少を反映していた。

本研究において骨軟骨欠損部の軟骨再生治療として磁気ターゲティング法は有用であり、治療後に MRI を用いることで修復組織を非侵襲的かつ安全に評価できることが証明された。