

論 文 内 容 要 旨

A Cartilaginous Construct with Bone Collar Exerts Bone-Regenerative Property Via Rapid Endochondral Ossification

(骨殻付き軟骨原基様組織は速やかな軟骨内骨化を生じることで骨再生を促進する)

Stem Cell Reviews and Reports, 19(6): 1812–1827, 2023.

主指導教員：水野 智仁教授

(医系科学研究科 歯周病態学)

副指導教員：安達 伸生教授

(医系科学研究科 整形外科学)

副指導教員：宿南 知佐教授

(医系科学研究科 生体分子機能学)

森本 慎

(医系科学研究科 医歯薬学専攻)

【目的】

歯周炎による歯周組織欠損、特にⅢ級根分岐部病変や水平性骨欠損のような不可逆的な大規模骨欠損に対して効果的な治療法は確立されていない。生体外から機能的な細胞を十分量補充する細胞治療の開発が必要である。当研究室では、自己複製能および多分化能を有する間葉系幹細胞 mesenchymal stem cell(MSC)に着目して研究を行ってきた。その結果 MSC と細胞外基質 extracellular matrix(ECM)からなる直径 1mm ほどの立体的細胞集塊 clumps of MSCs/ECM complexes (C-MSC)の作製方法を確立した。さらに C-MSC は in vitro 培養条件によって、その性質を調節可能であることを見出し、骨分化誘導を施した C-MSC が自身の膜性骨化を介して骨再生を促進することを報告してきた。さらに、適度な軟骨分化誘導を施すことによって軟骨内骨化を介した骨再生を促進できる可能性を示した。しかし、軟骨誘導を施した C-MSC を移植し、12 週間後によく骨再生効果が得られたが、その骨再生メカニズムは十分明らかとなっていない。一方、骨の発達や骨折治癒過程は、MSC 由来の軟骨がボーンカラー(骨殻)によって囲まれた後に、毛細血管の浸潤に伴った軟骨内骨化によって生じることが知られている。そこで本研究では、軟骨誘導と骨誘導を組み合わせ、ヒト骨髄由来細胞集塊 C-MSC から骨殻構造を持つ軟骨組織を作製し、迅速かつ確実な軟骨内骨化の様式で速やかに骨再生を達成する新規骨再生細胞治療の開発を目指した。

【方法】

ヒト骨髄由来 MSC を 48 well plate に 1.0×10^5 cells/well の高密度で播種し、ECM を十分に産生させ、得られた細胞シートを well から鈍的に剥離し、低接着 plate に移し浮遊培養を開始した。浮遊直後から軟骨誘導培地を用いて C-MSC を作成した。内部にサフラニン陽性の軟骨基質を認める 10 日目(CIM10)まで軟骨誘導を施し、さらに 7 日間軟骨誘導培地で培養したもの(CIM17)と、骨分化誘導培地に切り替えたもの(CIM10-OIM7)を作成し、in vitro 解析を行った。また in vivo にて SCID マウス頭蓋骨欠損モデルへ CIM17 また CIM10-OIM7 を移植 4、8 週後に回収し、解析を行った。加えて、周囲環境による影響を受けにくい SCID マウスの皮下移植モデルに移植し、解析を行った。

【結果】

in vitro での組織学的解析において、CIM10-OIM7 内部は CIM17 と同様にサフラニン陽性の軟骨基質が観察された。一方、マイクロ CT 解析から、CIM10-OIM7 外周には、CIM17 では認められない不透過像が観察された。その不透過物は、HE 染色、アリザリンレッド染色から骨殻様組織であることが確認された。さらに、遺伝子発現について qPCR 法を用いると、CIM10-OIM7 では CIM17 と比較し、骨分化関連遺伝子や、血管新生に関与する VEGF mRNA が有意に増加していた。

頭蓋骨への移植実験では、マイクロ CT 解析から、CIM17 移植 4 週間後には、移植体の外周の一部に、骨様組織が観察された。一方、CIM10-OIM7 移植では、全周が骨様組織で覆われた移植体によって欠損部が満たされていた。移植 8 週間後には、CIM17 移植体内部に一部不透過像を認めたのに対し、CIM10-OIM7 ではより多くの不透過像を認めた。

頭蓋骨の組織学的解析では、両群において、移植体内部への毛細血管の侵入が観察された。しかし、移植 4 週目において、CIM10-OIM7 移植群のほうが CIM17 移植群より多くの血管侵入を認めた。流入血管周囲には TRAP 陽性多核巨細胞が認められ、内部のサフラニン陽性領域は時間依存的に減少していた。CIM10-OIM7 移植 8 週間後には、移植体内部に骨組織と豊富な血管からなる骨髄様構造を認めた。新生骨組織を、ヒト Vimentin 特異抗体と細胞骨格 F-actin 特異抗体を用いた免疫染色を行ったところ、ヒト細胞由来で、樹状突起構造をし、周囲細胞とネットワーク形成した骨細胞を認めた。以上から、CIM10-OIM7 は移植先でより迅速に、かつ効果的に軟骨内骨化に基づく骨形成を達成することが示された。

皮下移植においても頭蓋骨欠損モデルと同様に、CIM10-OIM7 移植において、移植体内部への早期の血管の流入、軟骨吸収、骨形成が生じることを確認した。

【結論】

ヒト骨髄由来細胞集塊 C-MSC に対して、軟骨・骨誘導を適切な時期に施すことで、骨殻様構造を持ち、VEGF mRNA 高発現する軟骨様組織が得られる。この骨殻付き軟骨様組織移植は、移植後速やかに軟骨内骨化を生じ、確実な骨再生効果を発揮する新規骨再生療法となりえることが示された。