

氏名	系数 万紀	
学位の種類	博士 ( 医学 )	
学位記番号	第 6309 号	
授与報告番号	甲第 3578 号	
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 31 日	
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当者	
学位論文名	Transplantation of scaffold-free cartilage-like cell-sheets made from human bone marrow mesenchymal stem cells for cartilage repair: A preclinical study	
論文審査委員	主査教授 中村 博亮	副査教授 鰐淵 英機
	副査教授 吉川 貴仁	

## 論文内容の要旨

### 【目的】

骨髄由来間葉系細胞（以下 hBMSCs）を利用した scaffold - free 軟骨様細胞シートを作製し、ヌードラット軟骨欠損モデルに移植した。本研究の目的は、同細胞シート使用による軟骨修復の効果を検証することである。

### 【方法】

同意取得後、ヒト骨髄を採取し、塩基性線維芽細胞増殖因子（以下 FGF-2）を添加して細胞増殖培地 3 条件①5%Fetal Bovine Serum（以下 FBS）、②10%FBS、③5%FBS+FGF-2（10ng/ml）で細胞培養、ペレットにて軟骨分化誘導を観察し、至適培養条件を確認した。さらにシートを軟骨分化誘導時の 2 条件（軟骨分化誘導培地 血清あり、なし）で作製し、シートの形状を確認した。上記の予備実験で最良と判断した細胞増殖培地③、軟骨分化誘導培地血清ありの条件下で作製したシートを関節軟骨欠損部への移植実験に使用した。ヌードラット両側膝に軟骨欠損を作製し、片側に細胞シートを移植して移植群、他側をコントロール群とし、2、4、12 週後にトルイジンブルー染色、Col I、II、X、ヒト特異的抗ビメンチン抗体の免疫染色で組織学的評価を行った。

### 【結果】

12 週経過観察時点で、移植群の肉眼像は軟骨様組織での修復像を認め、組織像的にもトルイジンブルー染色で異染性が確認できた。同時に、免疫染色の結果では Col I 陰性、Col II 陽性、Col X 陰性であった。Wakitani score による評価では、シート移植群で軟骨構造の有意な改善を認めた。またヒト特異的抗ビメンチン抗体免疫染色では、陽性細胞は週ごとに減少し移植母床周囲の宿主組織からの置換が考えられた。

### 【結論】

hBMSCs 増殖期に FGF-2 を添加することで、低濃度の FBS でも hBMSCs の増殖速度、分化能は促進され、さらに血清添加軟骨分化誘導培地で scaffold free 軟骨様細胞シートが作製可能であった。当該シートの移植は、軟骨欠損部の軟骨修復に有効であることが判明した。

## 論文審査の結果の要旨

関節軟骨は欠損を生じると正常な硝子軟骨への修復は困難で、この現象が変形性関節症発生の一機序となる。本研究の目的は骨髄由来間葉系幹細胞（以下 hBMSCs）を利用した scaffold - free 軟骨様細胞シートを作製し、ヌードラット膝関節軟骨欠損モデルに対する有効性を検証することである。

同意取得後、ヒト骨髄を上後腸骨棘より採取し、細胞増殖培地を以下の 3 条件①5%Fetal Bovine Serum（ウシ胎児血清；以下 FBS）、②10%FBS、③5%FBS+ Fibroblast Growth Factors（塩基性線維芽細胞増殖因子；以下 FGF-2）10ng/ml で単層培養し、ペレットカルチャー法を用いて軟骨分化誘導を観察した。さらに細胞シートを以下の 2 条件（軟骨分化誘導培地 血清あり、なし）で作製し、シ

ートの形状を確認した。上記の予備実験で最良と判断した細胞増殖培地③、軟骨分化誘導培地血清ありの条件下で作製したシートを、関節軟骨欠損部への移植実験に使用した。ヌードラット両側膝に直径 2.0 mm 深さ 1.0 mm の骨軟骨欠損を作製し、片側に細胞シートを移植して移植群、他側をコントロール群とし、2、4、12 週後に肉眼所見及びトルイジンブルー染色、Col I、II、X、ヒト特異的抗ビメンチン抗体の免疫染色で組織学的評価を行った。

12 週経過時点で、移植群の肉眼像は軟骨様組織での修復を認め、組織学的にもトルイジンブルー染色における異染性が確認できた。同時に、免疫染色の結果では Col I 陰性、Col II 陽性で硝子様軟骨であることが確認された。Col X は陰性であり肥大軟骨化は生じていなかった。Wakitani score による評価では、シート移植群で score の有意な改善を認めた。またヒト特異的抗ビメンチン抗体免疫染色では、陽性細胞は継時的に減少し、移植部は宿主組織から徐々に置換されていることが確認された。

以上の実験結果から hBMSCs に FGF-2 を添加することで、低濃度の FBS でも hBMSCs の増殖速度、分化能は促進され、さらに血清添加した軟骨分化誘導培地で scaffold-free 軟骨様細胞シートが作製可能であった。当該シートの軟骨欠損部への移植は、軟骨修復に有効であることが判明した。本研究は臨床的によくみられる関節軟骨損傷に対し、至適な条件下で作製した scaffold-free 軟骨様細胞シート移植が有効であることを示した重要な基礎的研究である。よって本研究は博士（医学）の学位を授与されるに値するものと判定された。