

関節軟骨再生のための骨髄多機能幹細胞刺激装置の開発

Development of Trans-medullary Stimulator of Mesenchymal Stem Cell for the Treatment of Cartilage Injury

1081003

研究者代表 滋賀医科大学 リハビリテーション部 准教授 今井晋二

共同研究者 滋賀医科大学 整形外科 大学院生 西澤和也

[研究の目的]

人口の高齢化にともなう骨関節器官の障害に起因する寝たきり老人の増加は、今や医療・介護に関する国民的関心事となっている。しかし、関節軟骨の再生能力は乏しく、根本的な治療法は確立されていない。現在、軟骨下骨を穿破する事によって軟骨前駆細胞の誘導が試みられているが、残念ながら十分な細胞量を得るには至っていない。

我々は発想を転換し、あらかじめ骨髄内において骨髄多機能幹細胞の増殖を刺激する事によって十分量の軟骨前駆細胞を得る刺激装置の開発を目的とする。

[研究の内容、成果]

本研究では、日本白色家兎を用い、軟骨欠損の作成に先立ち、経骨髄的に軟骨欠損部の近傍にまでドリル孔を作成した(図1)。ドリル孔を作成しただけの実験群をITS群、更に線維芽細胞刺激因子(以下、bFGF)を骨髄内に投与した群をITS+bFGF群とした。また、陰性対照として骨髄内ドリル孔を作成していない群をnon-ITS群とした。

骨髄刺激の4日後に実験的軟骨欠損を作成した。軟骨欠損作成後、定期的に同部を採取した(図2)。組織学的検討としてはBrdUによる増殖細胞標識、I型およびII型コラーゲンによる免疫組織化学、とトルイジンブルーによるプロテオグリカン産生能評価を行った。また、アポトーシスの評価には

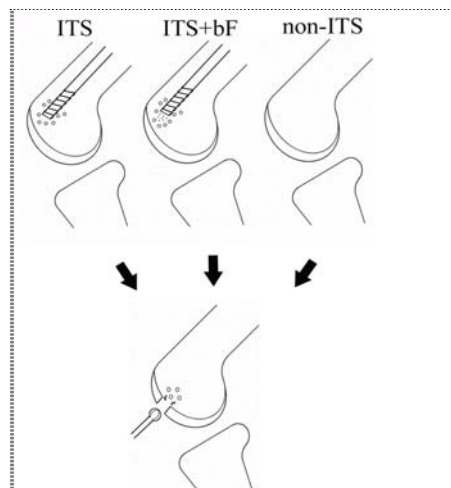


図1 実験の概略

ITS群：ドリル孔作成のみ

ITS+bFGF群：ドリル孔からbFGFを投与

non-ITS群：陰性対照群

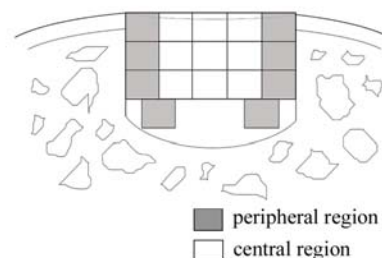


図2 軟骨欠損部の詳細な区別

Tunnel染色陽性細胞数の分布を評価した。軟骨欠損部における遺伝子発現についてはI型およびII型コラーゲン遺伝子の発現をRT-PCR法にて検討した。

軟骨欠損作成後の中心領域での増殖細胞数を調べた(図3)。陰性対照である non-ITS群では軟骨欠損作成後、3週目にピークがあった。ドリル孔を作成したITS群ではピーク時の細胞数は変わらなかったが、約2.5週でピークに達していた。bFGFを骨髄内に投与したITS+bF群では、ピークの位置がさらに早く、2週で達しており、細胞数も約2倍にまで増加していた。このことからnon-ITS群、ITS群、ITS+bF群の順でより多くの未分化間葉系細胞が、より早期に動員されたことが示された。辺縁領域でも中心領域と同様の傾向があった(図4)。ITS+bF群では2週目に大きなピークがあった。増殖細胞は骨髄より辺縁部を通過して中心部へ到達する。2週目では辺縁部よりも中心部により多くの増殖細胞が分布していたことより、骨髄から中心部に向けての活発な細胞動員のあったことが示唆された。

Tunnel染色でアポトーシス細胞の分布を検討したところ、non-ITS群、ITS群、ITS+bF群の順番でアポトーシス細胞数が減少していた(図5)。アポトーシス細胞の減少は、動員された未分化間葉系細胞がより効率的に軟骨細胞に分化したことを示唆する。

骨軟骨形成に関与する遺伝子の発現を調べたところ、軟骨欠損作成後、2週目でのII型コラーゲン遺伝子の発現は、non-ITS群、ITS群、ITS+bF群の順番で増加していた。この事はnon-ITS群、ITS群、ITS+bF群の順番で機能的な軟骨前駆細胞がより多く分化した事を示唆した(図6)。また、I型コラーゲン遺伝子の発現も、non-ITS群、ITS群、ITS+bF群の順番で増加していた。遺伝子発現の検体は将来軟骨に分化する部位より採取したので、I型コラーゲン遺伝子は骨・軟骨共通の前駆細胞により発現されていたと考えられる。non-ITS群、ITS群、

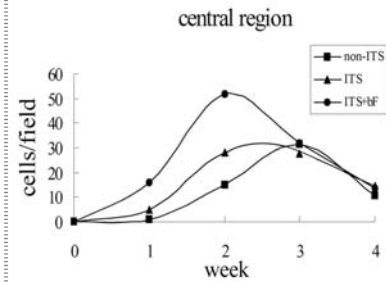


図3 軟骨欠損後の中心領域での増殖細胞数

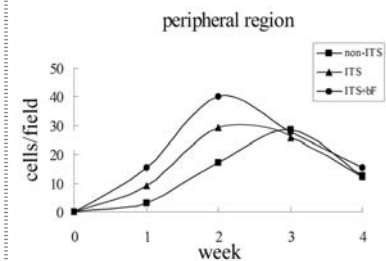


図4 軟骨欠損後の辺縁領域の増殖細胞数

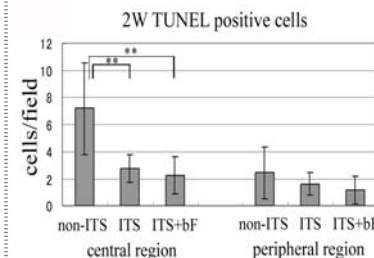


図5 アポトーシス細胞の分布

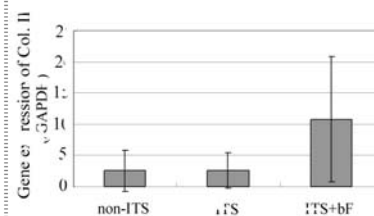


図6 II型コラーゲン遺伝子の発現

ITS+bF群の順番でより多くの骨・軟骨共通の前駆細胞が分化していたと考えられた（図7）。

軟骨欠損作成後8週目の修復状況を光学顕微鏡にて観察すると、II型コラーゲンが non-ITS群、ITS群、ITS+bF群の順番でより濃密に分布することが認められた（図8）。軟骨欠損作成後2週目のRT-PCRではI型コラーゲン遺伝子の発現もnon-ITS群、ITS群、ITS+bF群の順番で強くなっていた。I型コラーゲン遺伝子は軟骨欠損作成後2週目で骨・軟骨共通の前駆細胞により発現されていた（図7）。しかし、軟骨欠損作成後8週目の組織標本でタンパクレベルでみるとI型コラーゲンの発現はnon-ITS群、ITS群、ITS+bF群の順番で抑制されており（図8）、骨芽細胞の分化は同様の順番で抑制されていたと考えられた。

最後にnon-ITS群、ITS群、ITS+bF群の各群の修復軟骨の状態をWakitani分類を用いて組織学的に評価した。軟骨欠損作成後4週目と8週目で評価したところ、8週目において優位差を持ってITS+bF群における修復軟骨のスコアが高かった。

これらの結果は以下のようにまとめることができる。ITS+bF群で行われた骨髄多機能幹細胞刺激手技により、（1）より多くの骨髄増殖細胞が軟骨欠損周辺の骨髄から軟骨欠損中心部に動員された（図3、4）。（2）軟骨欠損中心部ではアポトーシスの発現が抑制されていた（図5）。（3）軟骨修復早期ではI型およびII型コラーゲン遺伝子の発現が強く、骨・軟骨共通の前駆細胞が動員されていた（図6、7）。（4）軟骨修復後期では軟骨特異的なII型コラーゲンの発現のみが上昇しており、軟骨の修復に寄与していた（図8）。（5）上記1から5の機序を反映して軟骨欠損作成後8週目の

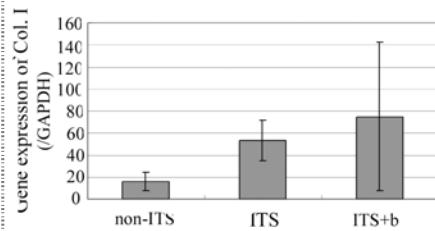


図7 I型コラーゲン遺伝子の発現

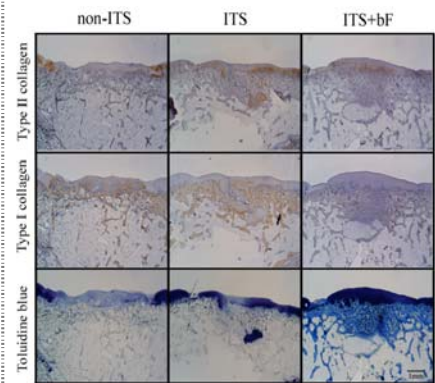


図8 軟骨修復の組織化学的所見

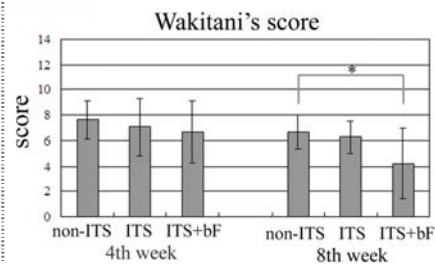


図9 軟骨修復の組織的評価

組織学的評価ではITS+bF群では質のより良い軟骨での修復が可能になっていた。

〔今後の研究の方向、課題〕

これまでの研究でITS+bF群で行われた骨髄多機能幹細胞の刺激は軟骨の修復を促進する為に、非常に有効であることが示された。今後、人体での適応の可能性を調べるためにより大きな動物で同様の実験を行う必要がある。まず、カンクイザルを用いて同様の実験を計画している。

〔学会発表〕（国際学会11件、国内38件）

Mimura T, Imai S, Nishizawa K, Okumura N, Ando K, Kubo M, Matsusue Y. Combination of collagen scaffold and timely release of bone morphogenetic protein-2 enhances the repair of full-thickness defect of articular cartilage. OARSI World Congress on Osteoarthritis 2008. 2008-09-19, Rome, Italy.

Okumura N, Toyota F, Isoya E, Imai S, Matsusue Y. The role of the volume-sensitive Cl^- current in the process of regulatory volume decrease (RVD) in freshly isolated articular chondrocytes. OARSI World Congress on Osteoarthritis 2008. 2008-09-19, Rome, Italy.

Uenaka K, Imai S, Andou K, Matsusue Y. The effect of low-intensity pulsed ultrasound for formation of scaffold-free cartilage. OARSI World Congress on Osteoarthritis 2008. 2008-09-19, Rome, Italy.

Nishizawa K, Imai S, Mimura T, Kubo M, Matsusue Y. In-advance transmedullary stimulation of mesenchymal stem cells enhances spontaneous repair of full-thickness articular cartilage defect. OARSI World Congress on Osteoarthritis 2008. 2008-09-19, Rome, Italy.

Mimura T, Imai S, Kubo M, Isoya E, Okumura N, Ando K, Matsusue Y. A novel concentration-gradient collagen scaffold augments due. OARSI World Congress on Osteoarthritis 2007. 2007-12-07, Fort Lauderdale, Florida, USA

他 4 4 件

〔雑誌論文〕（計6件） -

Imai S, Kodama N, Matsusue Y. Intrasyneovial lipoma causing trigger wrist and carpal tunnel syndrome. Scand J Plastic Recons. 42: 328-330, 2008.

Imai S, Andou K, Kodama N, Isoya E, Okabe H, Matsusue Y. Closed rupture of a flexor tendon of unknown aetiology. J Hand Surg. 33B: 90-91. 2008.

Mimura T, Imai S, Kubo M, Isoya E, Ando K, Matsusue Y. A novel exogenous concentration-gradient collagen scaffold augments full-thickness articular cartilage repair. Osteoarthritis Cartilage. 16: 1083-1091, 2008.

Imai S, Isoya E, Kubo M, Kodama N, Matsusue Y. Congenial unilateral upper limb muscular hypertrophy associated with contracture of the extrinsic extensor tendon. J Hand Surg. 32B: 308-310. 2007.

Kubo M, Imai S, Fujimiya M, Isoya E, Ando K, Matsusue Y. Exogenous Collagen Augments Repair of Full-thickness Cartilage Defect by Facilitating Mesenchymal Cell Recruitment.-Detailed Cellular Events during Cartilage Repair- Acta Orthop78: 845-55, 2007

他 1 件