

学 位 論 文 要 旨

論文題名 Bone regeneration in a massive rat femur defect through endochondral ossification achieved with chondrogenically differentiated MSCs in a degradable scaffold
間葉系幹細胞由来軟骨細胞によるラット大腿骨骨再生に関する研究

著 者 原田 紀子

専 攻 帝京大学大学院医学研究科博士課程 第二臨床医学専攻

所 属 整形外科科学講座

掲載雑誌名 Biomaterials

掲載巻号数 第35巻27号 7800-7810頁

掲 載 年 2014年

はじめに

骨の発生には、二つの骨化様式が存在する。骨芽細胞による直接的な骨形成である膜生骨化と、先に形成された軟骨による鋳型が、後に新生血管から侵入してきた骨芽細胞によって骨に置換されるという、軟骨内骨化である。間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells; 以下MSCs) を用いた従来の骨再生研究では、前者の骨化様式の再現を目的とした、未分化MSCsの移植が行われていた。移植したMSCsが骨芽細胞に分化し、骨形成を行うことを期待したものである。現在までに多くの研究報告があるが、その骨再生効果は、必ずしも十分とは言えないものだった。そこで我々は、後者の骨化様式を再現すべく、軟骨へ分化させた骨髄由来間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell-Derived Chondrocytes; 以下 MSC-DCs) を含む移植体を作成し、これによりラット長管骨全周性骨欠損が再生可能であるかを検討した。

方 法

4週齢の同系ラットの骨髄から採取したMSCsを終濃度3 ng/ml FGFとなるように添加した培養液(α MEM、10% FBS (Sigma)、100 U/ml ペニシリンG、100 μ g/ml ストレプトマイシン)で増殖させ、PLGA scaffold (Poly (DL-lactic-co-glycolic acid)、乳酸グリコール酸共重合体)に播種した。その後、軟骨分化培地(α MEM、グルコース4.5mg/ml、 10^{-7} M デキサメサゾン、50 μ g/ml アスコルビン酸2リン酸、6.25 μ g/ml インスリン、6.25 μ g/ml トランスフェリン、6.25 ng/ml セレン酸、5.33 μ g/ml リノレイン酸、1.25 mg/ml ウシ血清アルブミン、100 μ g/ml ビルビン酸、10 ng/ml TGF- β 3 (R&D社)、500 ng/ml BMP-2 (オステオファーマ社)で3週間の分化誘導を行い、 $3 \times 3 \times (5/15)$ mmの3次元培養MSC-DCs移植体を作成した。軟骨分化培地は2~3日に一度交換した。10週齢のF344ラット大腿骨に5mm/15mmの骨幹部骨欠損を作成し、創外固定器で固定し(n=46/35)、作成したMSC-DC移植体を移植した。新生骨の形成量や形態評価を目的として、経時的に肉眼的所見の観察、軟X線撮影、 μ CT撮影および組織学的検査を行った。新生骨の強度は、移植後4週と8週に三点曲げ試験を行い、健側8週の大腿骨を比較対象として評価した。また、新生骨の由来を確認するためDiI (1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate)で標識したMSC-DC移植体を作成し、移植後の標識細胞の量的経時的变化を観察した。

結 果

5mm/15mm 骨欠損モデルともに、軟X線像で2週から移植体の石灰化が見られ、全例が4週で骨性に架橋し、骨癒合と判定した。組織学的評価では、2週で最外層に骨性架橋が見られ、それらは4週で皮質骨化した。 μ CTでも、移植後4週には皮質骨による完全な架橋が見られ、移植後16週には、新生骨内部に骨梁構造が形成されたことが確認できた。三点曲げ試験では、5mm 骨欠損モデルは4週でコントロールの約40%、8週で約85%の強度を示した。15mm 骨欠損モデルは、4週でコントロールの約25%、8週で約75%の強度を示した。また、免疫染色および標識細胞移植の結果により、新生骨は宿主由来の組織であることが分かった。

考 察

本検討により、15 mm という作成し得る最大の骨欠損長でも、MSC-DCs 移植で治療可能であることが確認できた。骨の再生様式も5 mm の場合と同様であると考えられ、移植体外層は骨膜の石灰化を経て皮質骨へ、内部は軟骨内骨化により海綿骨へと変化していた。移植したMSC-DCs つまり軟骨は、宿主側の細胞によって骨組織に置換されており、軟骨内骨化が再現されたと考える。骨再生速度は骨欠損長によらず非常に速く、また、再現性は100%だった。以上のことから、本治療法は、巨大骨欠損を早期に修復できる、これまでの常識を覆す全く新しい骨再生治療法として有望であると期待される。

結 論

ラット長管骨全周性骨欠損は、その骨欠損長によらず、MSC-DCs 移植により十分な強度をもって再生可能である。