

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

「異種細胞移植による膝軟骨欠損の修復再生効果の検討」

学位申請者 滝澤 大智

キーワード：細胞シート 関節軟骨 軟骨再生 異種移植 前臨床試験

【背景】我々は、変形性膝関節症（膝 OA）の関節軟骨損傷の修復を目指し、非酵素的に細胞外マトリクスや軟骨細胞をシート状に採取できる温度応答性培養皿を用いて軟骨細胞シートを作製し動物モデルを用いて安全性と有効性を確認した。また臨床研究において膝 OA の患者に対して積層化軟骨細胞シートの自家移植を高位脛骨骨切り術や前十字靱帯再建術と併用した治療を行い、安全性および臨床症状の改善と硝子軟骨による修復再生を確認した。膝 OA のより大きな軟骨欠損を治療するために、そして多くの患者へ適用するために、多指症手術時の廃棄組織から作製した同種軟骨細胞シートによる関節軟骨治療の確立を目指している。同種軟骨細胞シートの細胞ソースを評価するためには、最終産物を直接評価可能な移植モデルが求められており、前臨床試験として動物実験による治療法の安全性と有効性の評価は極めて重要である。

【目的】本研究の目的は、ヒト由来の軟骨細胞シートによる修復再生効果を異種移植モデルで評価可能かを、免疫不全ラットの膝軟骨全層欠損モデルを用いた異種同所性移植により検討した。

【方法】膝 OA で人工膝関節置換術を行った患者（平均年齢 74 歳、71-78 歳、男性 4 名 女性 2 名）の術後廃棄組織から採取した軟骨細胞と滑膜細胞から温度応答性培養皿を用いて積層化軟骨細胞シート（LC sheet）を作製した。プロパティ評価のために LC sheet と共培養で用いた滑膜細胞シート（SY sheet）の Safranin O 染色、免疫組織染色を行い、Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction を用いて mRNA を測定した。また、それぞれの培養上清に分泌された液性因子を enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）を用いてタンパク発現量を測定した。免疫不全ラット（F344/Njcl-run/run）の膝関節に骨軟骨欠損（径 2mm、深さ 1mm）を作製し以下のように群分けし、移植を行った。A 群：骨軟骨欠損のみ（移植なし）群、B 群：LC sheet  $5.0 \times 10^5$  cells のみを移植、C 群：SY sheet  $5.0 \times 10^5$  cells のみを移植群、D 群：SY sheet  $5.0 \times 10^5$  cells を移植し、さらにその上から骨軟骨欠損を覆うように LC sheet  $5.0 \times 10^5$  cells を移植（各群 n=6、total 48 膝）。移植後より患肢重量配分比による疼痛評価を行い、術後 4 週、12 週で犠牲死させた。International Cartilage Repair Society（ICRS）gross morphology assessment scale による肉眼的評価を行い、組織切片を作製し Safranin O 染色と ICRS histological grading system による組織学的評価、免疫組織染色を行った。

## 【結果】

LC sheet、SY sheet は Safranin O では染色されず、免疫組織染色では Type I collagen (COL I)、Fibronectin の発現を認めたが、Type II collagen (COL II) では発現を認めず、この 2 つのシートに違いは認めなかった。mRNA 発現量は、LC sheet では SY sheet と比較して collagen, type II, alpha 1 (COL2A1)、SRY-Box 9 (SOX9)、matrix metalloproteinase 13 を有意に多かった。また LC sheet は培養上清中に transforming growth factor- $\beta$ -1 (TGF- $\beta$ 1)、melanoma inhibitory activity (MIA) を SY sheet と比較して有意に多く産生していた。疼痛評価では B 群、D 群は A 群よりも疼痛は緩和されていた。肉眼的評価では術後 4 週、12 週で B 群は A 群と比較して有意に改善を認め、組織学的評価でも術後 4 週では B 群は A 群と比較して有意に修復の改善を認め、術後 12 週では B 群は他群と比べて有意に改善を認めた。術後 4 週、12 週で移植した細胞であることを示す抗ヒト vimentin 抗体 (hVIM) の染色を認めたが、染色細胞数は 12 週で全体的に減少していた。

## 【考察】

本研究では異なる 2 つのヒト細胞シートである LC sheet、SY sheet のプロパティを in vitro で評価した。in vivo でプロパティの違いが軟骨再生に違いをもたらすか評価し、ヒト細胞シートを直接評価できる移植モデルであるか検討した。LC sheet は Safranin O や COL II で染色されず、老齢の手術時廃棄組織から採取した細胞を用いて作製していることが原因と考えられた。遺伝子発現分析では LC sheet は SY sheet より軟骨特異的のコラーゲンである COL2A1、軟骨分化の Key regulator とされる SOX9 が有意に高値であり、また ELISA 分析から軟骨修復に寄与する因子である TGF- $\beta$ 1 や MIA を有意に産生しており、本研究で用いた LC sheet は SY sheet より軟骨に特異的なフェノタイプを形成していた。B 群では、移植後 4 週また 12 週ともに軟骨は再生され、疼痛は緩和し、肉眼的スコア、組織学的スコアで改善を認めた。4 週、12 週の C 群、D 群では軟骨再生は認めず、骨欠損部は線維性組織で満たされた。我々の結果では SY sheet 単独または併用し移植しても関節軟骨修復は得られなかった。すべての移植群でヒト由来の細胞であることを示す hVIM で染色される細胞がみられたが術後 12 週では染色される細胞数の減少を認めた。12 週まで免疫不全ラットを用いてヒト軟骨細胞シートの評価は可能であった。In vitro でプロパティ評価を検証した後、軟骨特性を有したヒト軟骨細胞シートは in vivo で軟骨再生に寄与していた。

## 【結論】

免疫不全ラットの膝軟骨全層欠損モデルを用いて、異種同所性移植によるヒト軟骨細胞シートの修復再生効果は評価可能であった。今後臨床応用の前段階として、本モデルを用いて安全性と有効性を検証していく予定である。