

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：磁性化骨髄間葉系細胞の磁気ターゲティングによる骨・軟骨再生
2. 研究開発代表者：越智光夫（広島大学）
3. 研究開発の成果

①ヒト骨髄間葉系幹細胞の軟骨修復に関与する液性因子の同定および品質基準の策定

5 種類のロットの骨髄間葉系幹細胞において細胞増殖能（細胞増殖速度およびコロニー形成能）と軟骨分化能は正の相関を示す一方、細胞増殖能とサイトカイン・増殖因子の分泌能は負の相関を示すことが明らかとなった。骨髄間葉系幹細胞のサイトカイン・増殖因子およびマイクロ RNA に関する網羅的発現解析を行い、細胞増殖能や細胞外マトリクス（collagen type II）産生能と関連を示すものを探索した。これらについて統計学的に有意な相関を示したものは TIMP I、TIMP2、VEGF、MCP1 であった。またその他にも SYPL2、SHC2、miR-944 などが弱い相関を示した。

②広範囲な軟骨欠損への対応

未治療群に比べて、Distraction Arthroplasty を単独で行った群および間葉系幹細胞の移植のみを行った群では軟骨下骨が良好に修復されたが、軟骨欠損部の大部分がサフラニン 0 染色に陰性の線維軟骨で覆われており、Distraction Arthroplasty と間葉系幹細胞移植を併用した群ではサフラニン 0 染色に陽性となる領域が拡大するものの、関節軟骨修復が十分とは言えなかった。Distraction Arthroplasty を行った群と行っていない群の組織を比較すると、Distraction Arthroplasty を行った群における骨組織において骨量密度が低下していることに着目し、長期間の非荷重が骨密度を低下させ、それが軟骨修復にも悪影響を与えている可能性を考え、新しく Distraction Arthroplasty の期間を 12 週間から 4 週間に短縮させる群を作製した。Distraction Arthroplasty 単独では期間を短縮させても軟骨修復に著明な影響を与えなかったが、Distraction Arthroplasty 細胞移植を併用した群では、Distraction Arthroplasty の期間を短縮することで、組織学的にはほぼ正常に近いところまで良好な軟骨修復が得られた。間葉系幹細胞移植後の軟骨修復には初期には免荷が必要であるが、軟骨組織の成熟には適切な時期からの機械的刺激も必要なことが考えられた。

③フェルカルボトランの体内動態評価

まず、細胞を投与していない状態でラビットの膝関節の MRI を撮影したところ、非常に解像度が悪く、特にヒトの場合と違い脂肪組織の信号を低下させることが困難であることが明らかとなった。そこで、撮影条件を変えながら、繰り返し MRI 撮影を行い、ラビット膝関節の適正な撮影条件検討を行った。さらにラビット膝関節の骨軟骨欠損モデルや軟骨部分欠損モデルを作製し、MRI による欠損部描出のための撮影条件検討を行い、関節軟骨を良好に描出可能な撮影条件を確立した。

④間葉系幹細胞の同種移植の検討

日本白色家兎を用いて、骨髄間葉系幹細胞の膝関節内への自家移植を行う群と、ダッチラビットから採取・樹立した骨髄間葉系幹細胞を日本白色家兎の膝関節内へ移植する群を作製し、移植から 12 週後に脾細胞を用いて CFSE-MLR アッセイによって獲得免疫の有無について評価を行った。CFSE-MLR アッセイではこれらの群のドナーとレシピエントの脾細胞を用いたアッセイの他にドナーとは別（第 3 者）のダッチラビットの脾細胞を用いたアッセイも行った。FACS を用いて CD4 もしくは CD8 陽性 T 細胞の増殖について評価を行った。自家移植、同種移植および第 3 者とのアッセイのいずれにおいても有意な T 細胞の増殖反応の増加は認められず、骨髄間葉系幹細胞の同種移植による免疫拒絶反応は起こりにくいことが示唆された。