

筑波大学

博士（医学）学位論文

DR
1468
1468
1468

家兔骨髓細胞由来
三次元軟骨様組織同種移植による
軟骨全層欠損修復の試みと
蛍光バイオイメージング技術を用いた
移植細胞の追跡

2009

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

吉岡 友和

寄贈
吉岡友和氏

10008746

目次

| | |
|--|---|
| 第1章 本研究の背景 | 1 |
| 1. 1. 関節軟骨とは | |
| 1. 2. 臨床的背景 | |
| 1. 3. 関節軟骨損傷に対する従来の治療法とその課題 | |
| 1. 3. 1. 骨髄刺激法 | |
| 1. 3. 2. 自家骨軟骨移植 | |
| 1. 3. 3. 自家培養軟骨細胞移植 | |
| 1. 3. 4. 自家培養骨髄間葉系細胞移植 | |
| 1. 4. 細胞移植を用いた再生医療における移植細胞追跡の意義と従来 の細胞標識法 | |
| 1. 4. 1. 蛍光色素 | |
| 1. 4. 2. 緑色蛍光蛋白質 | |
| 1. 4. 3. 鉄粒子 | |
| 1. 5. 共同研究者による先行研究 | |
| 1. 5. 1. 動的回旋培養システムを用いた骨髄細胞からの三次元軟骨様組 織構築法の確立 | |
| 1. 5. 2. 量子ドットを用いた蛍光バイオイメージング技術による骨髄細胞 の標識 | |
| 第2章 本研究の目的 | 8 |
| 第3章 対象と方法 | 9 |
| 3. 1. 実験群の設定 | |
| 3. 2. 骨髄からの細胞採取と三次元軟骨様組織の構築 | |
| 3. 3. 骨髄細胞の骨、脂肪分化能評価 | |
| 3. 4. 骨髄細胞内への量子ドット導入 | |
| 3. 5. 移植前段階における量子ドットの局在評価 | |
| 3. 6. 関節軟骨全層欠損モデルの作製と同種移植 | |
| 3. 7. 修復組織の肉眼的評価 | |
| 3. 8. 修復組織の組織学的評価 | |

- 3. 8. 1. サフラニン O ファストグリーン染色
- 3. 8. 2. 定量評価 (O'Driscoll スコア)
- 3. 8. 3. 免疫組織化学染色 (I および II 型コラーゲン)
- 3. 9. 修復組織の生化学的評価 (グリコサミノグリカン定量)
- 3. 10. 修復組織における量子ドットの局在評価

第4章 結果 18

- 4. 1. 単層培養で増殖した骨髄細胞
- 4. 2. 骨髄細胞の骨、脂肪分化能
- 4. 3. 構築された三次元軟骨様組織の特徴
- 4. 4. 移植前段階における量子ドットの局在
- 4. 5. 修復組織の肉眼的評価
 - 4. 5. 1. 量子ドット非導入群
 - 4. 5. 2. 量子ドット導入群
- 4. 6. 修復組織の組織学的評価
 - 4. 6. 1. サフラニン O ファストグリーン染色
 - 4. 6. 1. 1. 量子ドット非導入群
 - 4. 6. 1. 2. 量子ドット導入群
 - 4. 6. 2. 定量評価 (O'Driscoll スコア)
 - 4. 6. 3. 免疫組織化学染色 (I および II 型コラーゲン)
- 4. 7. 修復組織の生化学的評価 (グリコサミノグリカン定量)
- 4. 8. 修復組織における量子ドットの局在

第5章 考察 24

- 5. 1. 採取から移植までの各段階における細胞構成
- 5. 2. 同種移植モデルにおける移植免疫
- 5. 3. 量子ドットの局在
 - 5. 3. 1. 移植組織
 - 5. 3. 2. 修復組織
- 5. 4. 臨床応用への課題と今後の展望

第6章 結論 32

| | |
|------|----|
| 図、表 | 33 |
| 引用文献 | 49 |
| 発表論文 | 55 |
| 参考論文 | 56 |
| 謝辞 | 57 |

第 1 章 本研究の背景

1. 1. 関節軟骨とは

関節軟骨は豊富な細胞外基質とその中に点在する軟骨細胞（構成成分の 1-2%）より構成されている。血管やリンパ管、神経を欠く組織であり、主として関節液によって栄養されるため、軟骨は他の組織と比べて低酸素状態で代謝を行っている。細胞外基質の主成分は水分（65-80%）と軟骨細胞によって産生されるプロテオグリカン（4-7%）、Ⅱ型コラーゲン（10-20%）である^{1, 2}。無構造な細胞外基質が硝子のように見えることから組織学的には硝子軟骨と呼ばれる。成熟ヒト関節軟骨は、最大でも 5-6 mm 程度の厚さの組織であり、衝撃吸収能や潤滑能などの機能を有する。運動器の主要構成体である関節の機能は主にこの硝子軟骨によって維持されている。一方、同じく運動器の構成体である椎間板や半月板は線維軟骨と呼ばれるⅠ型コラーゲン優位の軟骨で、組織学的には線維性組織と硝子軟骨との中間に位置する。生力学的に圧迫強度は強いが、外圧の分散、吸収や滑動性では硝子軟骨に劣る。耳介、外耳道壁、喉頭蓋に存在する弾性軟骨はⅡ型コラーゲンのほかに弾性線維が豊富に含まれ、硝子軟骨よりも弾力性に富む³。

1. 2. 臨床的背景

関節軟骨の自己再生能力に限界があることが広く認識されたのは、今から 267 年

前である⁴。外傷などにより、一旦局所的な軟骨損傷が生じると変性は徐々に進行し、中・長期的経過で、広範囲な軟骨障害である変形性関節症へと至る。変形性関節症に伴う疼痛や可動域制限といった機能障害は日常生活の大きな障害となる。現在、変形性関節症に対する外科的治療法として一般的に行われている人工関節置換術は手術手技と人工関節そのものの発達により良好な治療成績が得られているが、人工関節と骨との間に生じる弛みや感染といった合併症発生の危険性や耐用年数の問題から青壮年期の患者にはその適応に慎重を要する。したがって、局所の軟骨損傷に対し適切に治療を行い変形性関節症への進行を防止することが重要であるが、現段階で軟骨損傷を確実に修復しうる治療法は存在せず、新たな方法論の開発が望まれている^{1,2}。

1. 3. 関節軟骨損傷に対する従来の治療法とその課題

すでに臨床応用され、その成績が報告されている軟骨損傷修復法の特徴と課題を以下に記述する。

1. 3. 1. 骨髄刺激法

硬化した軟骨下骨を切除あるいは穿孔し、骨髄内から出血を促す方法である^{5,6}。骨髄内の未分化間葉系細胞を軟骨欠損部に誘導して軟骨修復を促す⁷。鏡視下で比較的簡便に行うことが可能であり、臨床でも汎用されるが、本法による軟骨修復は硝子軟骨ではなく線維軟骨によるため、この線維軟骨が荷重により生じるストレスに、

長期間耐えることができるかは現時点で不明である。

1.3.2. 自家骨軟骨移植

膝関節大腿骨膝蓋骨滑車部辺縁の非荷重部位（正常関節軟骨）から採取した複数の円柱状骨軟骨片を軟骨欠損部にプレスフィットで移植する方法^{8,9,10}。完成された硝子軟骨と軟骨下骨とを一塊として移植できること、すなわち組織として関節軟骨をそのまま利用できる利点がある。しかしながら、ドナー部位の障害、平滑な関節面の獲得、周囲軟骨との結合性に課題を有する。

1.3.3. 自家培養軟骨細胞移植

膝関節の非荷重部位から正常軟骨を採取し約3週間の単層培養後、軟骨欠損部にその細胞懸濁液を注入する方法^{11,12}。注入した軟骨細胞が漏出しないように骨膜で欠損部を被覆する。1997年から欧米を中心に一般的な治療法として広まっている¹³。採取するドナー部位の障害が骨軟骨移植術に比べ少なく、大きな欠損にも応用できる利点を有するが、採取軟骨細胞数やその増殖能に限界があること、コストが高いこと、2回の手術を要し比較的侵襲が大きいこと、リハビリテーションに時間を要することなどの課題を有する。また現時点ではその長期成績が不明である。

1. 3. 4. 自家培養骨髄間葉系細胞移植

骨髄血中の有核細胞はそのほとんどが血球系の細胞であり培養すると浮遊する。しかしながら、ごく一部の細胞は接着、増殖しコロニーを形成する¹⁴。この接着細胞を継代培養すると紡錘型の細胞がほとんどを占めるようになり、骨髄間葉系細胞と呼ばれる。これらは不均一な細胞集団であるが、この中に骨髄間葉系幹細胞が 0.001 から 0.01%存在するとされる¹⁵。骨髄間葉系幹細胞は増殖能と間葉系組織（骨・軟骨・脂肪など）への分化能を有する¹⁵。臨床応用を考慮した場合、細胞源を骨髄に求めることは簡便かつ低侵襲な方法で、骨軟骨移植術のように正常組織を犠牲にせず、自己複製能と多分化能を有する細胞が採取できるという利点を有する。Wakitani ら¹⁶は家兎を用いた実験系で、骨髄間葉系細胞移植が関節軟骨欠損修復を促進したとする結果をもとに、この手法をヒトに応用した¹⁷。培養した骨髄間葉系細胞をコラーゲンゲルに包埋し、ヒト変形性膝関節症患者の軟骨欠損部に移植（下肢アライメント矯正骨切り術と併用）した術後成績で、臨床スコアと関節鏡評価は細胞移植群が骨切り術単独群と比較し良好であったが、組織学的には線維軟骨による修復であった。その理由として骨髄間葉系細胞に何も処置を加えずに移植したことから、移植部位での軟骨への分化が不十分であったためではないかと考察し、培養骨髄間葉系細胞移植の限界を示唆している¹⁸。

1. 4. 細胞移植を用いた再生医療における移植細胞追跡の意義と従来の細胞標識法

再生医療では様々な疾患に対する細胞移植治療が行われている。しかしながら移植に供した細胞がどれぐらいの割合で正確に移植され、生存し、生着するのか、そしてその後どのような経過をたどるのかは明らかでない。これらを明らかにするためには、バイオイメージング技術を用いて、移植細胞を追跡することが必要である。これまで報告された細胞標識法の特徴と課題を記述する。

1. 4. 1. 蛍光色素

細胞表面に蛍光色素を結合させて標識する古典的方法。骨髄間葉系細胞を標識し、軟骨欠損部への移植後、その移植細胞を追跡した報告では、蛍光の観察できた期間が移植後 2 週¹⁹もしくは 5 週²⁰と短期間である。これは細胞の分裂増殖に伴う蛍光強度の減弱や光安定性の低さなどによる。したがって長期間の安定した観察には課題を有する。

1. 4. 2. 緑色蛍光蛋白質

オワンクラゲから発見された発光物質であり、極大吸収波長 480 nm で励起され、極大発光波長 510 nm で蛍光を発する。他の蛋白質との融合蛋白質として機能を発揮することから蛋白質の細胞内局在を明らかにするのに極めて有用である²¹。しかし

ながら、遺伝子導入を要する点において侵襲的であり、長期間の使用において蛋白質の変性により蛍光強度が減弱する²²といった課題を有する。

1.4.3. 鉄粒子

ナノメートルサイズの鉄粒子を移植細胞に取り込ませ、移植された動物を生かしたまま移植細胞を追跡する。このナノ粒子自体は周囲組織の磁性との相違から核磁気共鳴画像法の T2 強調画像で低信号領域として描出される^{23, 24}。本法は核磁気共鳴画像法がすでに臨床で広く普及しており非侵襲的に撮影可能であるという利点を有する。しかしながら、鉄粒子自体の細胞毒性の可能性、標識されていない細胞塊を移植した場合でも画像上信号変化が認められる点、脊髄損傷などのように病態そのものが移植部に大きな信号変化を来たす状態では移植細胞の同定が不能といった課題を有する。

1.5. 共同研究者による先行研究

1.5.1. 動的回旋培養システムを用いた骨髄細胞からの三次元軟骨様組織構築法の確立

Ohyabu ら²⁵は動的回旋培養システム (図 1) を用いて担体を使用せずに、家兎骨髄細胞から、従来のペレット培養法²⁶と比較し、大型の三次元軟骨様組織を構築する方法を報告した。細胞は通常比重が 1 より重いいため培養容器の底に沈降するが、

動的回旋培養法では、この重力の影響を回避するために、円筒状の培養器が水平軸を中心に回転する。回転に伴う培養液の流れにより上昇しようとする力と重力により下降しようとする力がつりあった部分に三次元集合体が構築される²⁷。

1. 5. 2. 量子ドットを用いた蛍光バイオイメージング技術による骨髄細胞の標識

Wadhwa ら²⁸ は、マウスの癌細胞株からストレスシャペロンや細胞内輸送機能を有し、細胞増殖に関連する細胞表面蛋白質であるモーターリンをクローニングした。Kaul ら²⁹ は、このモーターリンに対する抗体と量子ドットとの複合物を細胞培養液に溶解し、ヒト骨肉腫細胞株と共培養することで生細胞表面のモーターリンに、この化合物が抗原抗体反応で結合し、エンドサイトーシスによって細胞内に量子ドットが導入されることを報告した。量子ドットは CdSe などの半導体の 15-20 nm のナノサイズの粒子を指し、蛍光色素としての使用が可能である^{30,31}。蛍光強度が強く、長時間の励起光照射に対しほとんど退色しない光安定性を有し、単一の励起波長に対し、量子ドットのサイズ特異的な広範囲の波長の蛍光を発することから、異なる蛍光波長を有する量子ドットを用いてマルチカラーイメージングも可能であるといった利点を有する³²。Ohyabu ら³³ は家兎骨髄細胞内にも量子ドットを導入することが可能であり、導入の有無に関わらず骨髄細胞は骨、軟骨、脂肪への分化能を有することを報告した。

第 2 章 本研究の目的

Wakitani ら¹⁸ が示唆した培養骨髄間葉系細胞移植の限界と共同研究者による先行研究をふまえ、本研究の仮説は「家兎骨髄細胞由来三次元軟骨様組織を関節軟骨全層欠損に同種移植すると、移植した細胞によって、移植部の場の環境に応じた欠損修復が得られる」とした。

本研究の目的は以下の 2 つである。

1. 家兎骨髄細胞から三次元軟骨様組織を構築し関節軟骨全層欠損部に同種移植、欠損修復に対する本法の有用性を評価する。
2. 量子ドットを移植細胞内に導入し、修復組織における量子ドットの局在を観察することで、移植細胞を追跡する。

第3章 対象と方法

本研究は筑波大学動物実験取り扱い規定に従い、動物実験委員会の承認を得て行った。

3.1. 実験群の設定

本研究は以下の2つの実験系から構成される(図2)。

1. 細胞標識を行わずに、12日齢家兎骨髄細胞から三次元軟骨様組織を構築し10週齢家兎関節軟骨全層欠損に同種移植を行った実験系。さらにこれとは別に12日齢家兎1羽から骨髄細胞を採取し、骨・脂肪化能を試験管レベルで評価した。
2. 骨髄細胞内に量子ドットを導入した後に、1.と同様の手法で同種移植を行い修復組織内における量子ドットを観察した実験系。さらに1個の移植組織の一部を用いて移植前段階における量子ドットを観察した。

3.2. 骨髄からの細胞採取と三次元軟骨様組織の構築

12日齢日本白色家兎(東京実験動物、東京)雌6羽の大腿骨・脛骨骨髄腔より細胞を採取した。大腿骨・脛骨は無菌操作下に摘出、周囲軟部組織を除去し、phosphate-buffered saline(以下PBS)で3回洗浄した。両骨端部を切除した後に20mlのdulbecco's modified eagle's medium(以下DMEM; Sigma, St. Louis, MO, USA)で骨髄腔を洗浄、この細胞懸濁液をナイロンメッシュ(100 μm cell strainer;

BD Falcon, Bedford, MA, USA)で濾過し、75 cm² フラスコ (BD Falcon, San Jose, CA, USA) 36 個に播種、37°C、5%二酸化炭素の環境下で培養した。培養液は DMEM、10%牛胎児血清 (fetal bovine serum, 以下 FBS; Sigma)、1%抗生物質 (antibiotic-antimycotic; GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で構成され、各フラスコを 15 mlの培養液で満たし、1 週間に 2 もしくは 3 回の頻度で培地交換を行った。培養開始約 3 週間後、フラスコ底面に接着した紡錘型の細胞を 0.25% trypsin 1 mM EDTA (Sigma) を用いてフラスコ底面より剥離し、 $1.5\text{-}3.0 \times 10^7$ 個/10 ml の濃度で DMEM、50 µg/ml ascorbic acid 2-phosphate (Wako, Tokyo)、40 µg/ml L-proline (Sigma)、ITS culture supplement (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)、 10^{-7} M dexamethasone (Sigma-Aldrich)、10 ng/ml TGF- β_3 (Sigma) および抗生物質 (antibiotic-antimycotic; GIBCO, Invitrogen) を含む軟骨分化誘導培地に懸濁し、1 つの培養器あたり 10 ml の容量の動的回旋培養システム (RCCSTM-4D system; Synthecon, Houston, TX, USA) に播種、37°C、5%二酸化炭素の環境下で 1 週間培養した。軟骨分化誘導培養液の交換は 2 もしくは 3 日に 1 回行った。培養器の回転速度は細胞凝集塊が沈降したり、培養器の壁に当たらず一定の位置で浮遊するよう適宜調整した。

3. 3. 骨髓細胞の骨・脂肪分化能評価

3. 2. と同様の手法で12日齢日本白色家兔（東京実験動物）雌1羽から骨髓細胞を採取、単層培養14日間の後、細胞を剥離し継代した細胞群を使用した。6穴培養皿（Costar®; Corning, NY, USA）の各穴に 1×10^4 個/cm²の細胞密度で細胞を播種し、2日間の増殖培養の後、7日間の骨・脂肪分化誘導を行った。骨・脂肪分化誘導培地はDMEM（Sigma）、10% FBS（Sigma）、1% 抗生物質（antibiotic-antimycotic; GIBCO）を基本培地とし、骨分化サプリメントとして10 mM β -glycerophosphate（Sigma）、50 mg/ml ascorbic acid 2-phosphate（Wako）、10 nM dexamethasone（Sigma）を、脂肪分化サプリメントとして0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine（Wako）、10 μ M insulin（Sigma）、200 μ M indomethacin（Sigma）を使用した。骨分化能は骨芽細胞への分化過程で上昇するアルカリフォスファターゼ活性を評価するためにアルカリフォスファターゼ染色キット（Sigma）を、脂肪分化能は脂溶性色素であるオイルレッド O を染色液として脂肪滴を赤く染色するオイルレッド O 染色キット（Primary cell, Hokkaido）を用いて手順書に従い染色を行った。

3. 4. 骨髓細胞内への量子ドット導入

3. 2. と同様の手法で12日齢日本白色家兔（東京実験動物）雌2羽から骨髓細

胞を採取、培養開始 12 から 14 日後、接着細胞が占める面積がフラスコ底面全体の面積の約 80%に達した時点で、量子ドット (Qdot® 655 ナノクリスタル; Invitrogen) と抗体との複合体作製キット (Qdot® 655 antibody conjugation kit; Invitrogen) を用いて大きさ 655 nm の量子ドットとモーターリンモノクローナル抗体の複合体を作製した。この複合体を約 0.2 から 0.4 mg/ml の濃度で溶解した培養液で 24 時間、接着細胞を培養することで量子ドットを細胞内に導入した。

3. 5. 移植前段階における量子ドットの局在評価

量子ドットを導入した骨髄細胞から構築した三次元軟骨様組織の一部を用いて凍結薄切標本を作製し、蛍光顕微鏡下に量子ドットを観察した (3. 10.の方法に従い)。あわせて 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いて核染色を行った。

3. 6. 関節軟骨全層欠損モデルの作製と同種移植

体重 2.3 から 2.5 kg の 10 週齢日本白色家兎 (東京実験動物) 雌 36 羽を用いた。ペントバルビタールソジウムを耳介静脈から体重 1.0 kg あたり 0.6 ml 注射し、全身麻酔下に清潔操作で行った。左膝関節の内側傍膝蓋骨進入で膝蓋骨を外側に脱臼し、大腿骨滑車部に到達した。直径 5 mm のハンドドリルを用いて滑車部正中に深さ 4 mm の、自然修復されないとされる軟骨全層欠損を作製した³⁴。この欠損部に細胞標

識をしていない三次元軟骨様組織を移植する移植群 18 羽と欠損を放置したコントロール群 18 羽の 2 群を設定した。欠損部の被覆は両群とも行わなかった。膝蓋骨を整復し関節包、皮膚を 4-0 ナイロン糸で縫合し創閉鎖した。術後、外固定や運動制限は行わず 4、8、12 週で評価した。細胞標識した三次元軟骨様組織は上記方法と同様に 5 羽の 10 週齢日本白色家兎雌に移植した。移植後 4 週で 3 羽、8 週と 26 週で各 1 羽を評価した。ネガティブコントロールとして細胞標識を行わずに構築した三次元軟骨様組織を移植した 1 羽の 10 週齢日本白色家兎雌を 4 週で評価した。

3. 7. 修復組織の肉眼的評価

屍殺はペントバルビタールソジウムの致死量を静脈注射することで行った。その後、欠損修復組織の表面性状、色調、周囲組織との結合性に関して肉眼的評価を行った。

3. 8. 修復組織の組織学的評価

3. 8. 1. サフラニン O ファストグリーン染色

組織学的評価では硝子軟骨細胞外基質の構成要素である酸性粘液多糖に反応した部分が赤く染色されるサフラニン O ファストグリーン染色を行った。欠損部中心より近位半分を冠状断面で評価した。組織は 4%パラホルムアルデヒドと 1%グルタルア

ルデヒドを用いて 4 日間固定した。4 週間の脱灰操作の後、パラフィン包埋し、5 μm 厚の薄切標本を作製した。脱パラフィン操作の後、weigert の鉄ヘマトキシリン液に 5 分水洗の後、ファストグリーン液 3 分、1%酢酸で洗浄した後に 0.1%サフラニン O 液に 5 分浸した。脱水、透徹後、封入し光学顕微鏡 (IX70; Olympus, Tokyo) で観察した。

3. 8. 2. 定量評価 (O'Driscoll スコア)

関節軟骨の組織学的観察に精通する 2 名の整形外科専門医が各標本の詳細を知らされない状態で、サフラニン O ファストグリーン染色の組織標本を観察し、O'Driscoll ら³⁵の方法 (表 1) を用いて定量化した。この方法は修復部に占める硝子軟骨組織の割合や表面正常、組織統合性といった組織学的特徴、変性の程度を合計 0 から 24 で点数化し、点数が高いほど良好な修復であることを示す。各群間のスコアを、クラスカルワリス検定を用いて統計学的に評価し、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

3. 8. 3. 免疫組織化学染色 (I および II 型コラーゲン)

免疫組織化学染色は線維軟骨組織や骨組織に主に存在する I 型コラーゲンと硝子軟骨の構成要素で軟骨細胞分化の指標として重要な II 型コラーゲンを染色した。

シランコーティングスライドに 5 μm 厚の薄切標本を作製し、キシレンで脱パラフィンした後、エタノールで脱水し 0.3% 過酸化水素で 10 分間、proteinase K (Dako, Carpinteria, CA, USA) で 10 分間反応させ内因性のペルオキシダーゼ活性を阻害した。流水水洗の後、1 次抗体として I 型コラーゲンモノクローナル抗体 (clone M35; Developmental studies hybridoma bank, Iowa, IA, USA) を 500 倍、II 型コラーゲンモノクローナル抗体 (clone 4C11, Oncogene, Cambridge, MA, USA) を 1000 倍に希釈し滴下、1 時間反応させた。染色は高分子デキストランポリマーに 2 次抗体とペルオキシダーゼをあらかじめ多数結合させた試薬を 2 次抗体として用いる envision+ (Dako) を用いた。tris buffer saline (以下、TBS) で洗浄の後、envision+ 試薬を 30 分間反応させた。さらに TBS 洗浄の後、発色基質として DAB (3,3'-diaminobenzidine) solution (Dako) を使用し 5 分間反応させた。後染色はマイヤーのヘマトキシリン液で約 30 秒間行い、流水水洗の後、脱水、透徹後、封入し光学顕微鏡で観察した。

3. 9. 修復組織の生化学的評価 (グリコサミノグリカン定量)

修復組織内に含まれる、硝子軟骨特有の細胞外基質であるグリコサミノグリカン (glycosaminoglycan, 以下 GAG) の含有量と、その組織内に含まれる細胞量を推算するため DNA 含有量を測定した。修復組織の遠位半分をサンプルとして用いた。

酵素処理として 0.5 mg/ml proteinase K solution (Dako) 5 ml、proteinase K digest solution (Dako) 25 ml、0.01% SDS 5 ml を混合した溶液を各サンプルに 1 ml 加え、尖刃で細断し、60°C で一晩振倒し溶解した。GAG 濃度の測定は Blyscan™ sulfated glycosaminoglycan assay kit (Biocolor, Newtownabbey, Northern Ireland) を用いた dimethyl-methylene blue (DMMB) assay により行った。各サンプル 100 µl に blyscan dye reagent (1,9-dimethyl-methylene blue) を 1 ml 添加した後、4°C のメカニカルシェイカーで 30 分間浸透し GAG と dye の複合体を作製した。10 分間遠心後、上澄みを廃棄し、ペレットに 1 ml の dissociation reagent を加えて 1,9-dimethyl-methylene blue を溶解した後に 656 nm の波長の吸光度を測定した。キット付属の GAG standard より作成した標準曲線と対応させ各サンプルの GAG 濃度を算出した。吸光度の測定は microplate reader spectra max (Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA) を使用した。DNA 濃度の測定は proteinase K (Dako) で酵素処理を行った後に hoechst dye solution (Hoechst 33258; Sigma) 10 µl に 10× TNE buffer 10 ml を加え測定溶液を作製した。黒の 96 穴プレート上で各サンプル 5 µl に測定溶液 195 µl を加え 200 µl とし、352-461 nm の波長で吸光度を測定した。ヤギの胸腺 (DNA solution calf thymus DNA; Sigma) をコントロールとして作成した標準曲線をもとに各サンプルの DNA 濃度を測定した。各群間において GAG 濃度を DNA 濃度で除した値を、スチューデント t 検定を用いて統計学的に評価し、 $P <$

0.05 を有意差ありとした。

3. 10. 修復組織における量子ドットの局在評価

欠損部中心より近位半分を冠状断面で評価した。組織は 4%パラホルムアルデヒドを用いて 4 日間固定した。組織は 10、20、30%スクロースで各 1 時間、4°Cでリンスし 4%カルボキシメチルセルロースに包埋後、直ちに液体窒素で急速冷凍した。−70°C 環境下に 4 μm 厚で非脱灰凍結薄切標本を作製した (Leica CM3050S; Leica microsystems, Wetzlar, Germany)。径 655 nm の量子ドットに対する特異フィルター (XF305-1; excitation 425DF45, dichroic 475DCLP, emission 655DF20) を用いて 蛍光顕微鏡 (Biorevo imaging system BZ-9000; Keyence, Osaka) にて観察した。4、26 週群においては蛍光顕微鏡下での観察後、同一切片を 3. 8. 1. と同様の手法でサフラニン O ファストグリーンにて染色し、蛍光顕微鏡で観察された量子ドットの局在を照合した。

第4章 結果

4. 1. 単層培養で増殖した骨髄細胞

フラスコへの播種 24 時間後には接着性細胞が観察された。培地交換を経るごとに浮遊細胞が減少し、紡錘型の細胞 (図 3) が明らかに観察されるようになった。細胞群は約 2 週間でフラスコ底面を 100% 占め、その後の 1 週間は肉眼的な形状の変化なしに透明なゲル状の基質成分がフラスコ底面で増加した。

4. 2. 骨髄細胞の骨・脂肪分化能

6 穴プレート全ての細胞群において、アルカリフォスファターゼ染色 (図 4A) およびオイルレッド O 染色 (図 4B) 陽性所見を認めた。

4. 3. 構築された三次元軟骨様組織の特徴

量子ドット導入の有無に関わらず、色調は黄白色、形状は楕円から鎌状形、弾力性に富む組織塊であった (図 5A, B)。量子ドットを導入した組織の平均サイズは長径 7.1 ± 2.8 mm (SD)、短径 5.4 ± 2.5 mm (SD) であった。組織学的所見では、中心部においては細胞外基質がサフランin O ファストグリーン染色で赤染され、低密度に円型の細胞が存在していたが、周囲部分は青く染色され、高密度に小型の細胞が存在していた (図 5C)。

4. 4. 移植前段階における量子ドットの局在

赤色に蛍光される量子ドットが移植組織全体に観察された。蛍光強度は部位によって異なり、主に核の周囲に複数の蛍光ドットが観察された (図 6A-F)。

4. 5. 修復組織の肉眼的評価

4. 5. 1. 量子ドット非導入群

2羽の家兎が手術中に麻酔の影響で死亡し、屍殺時において1羽に創感染を認めため、この3羽を評価対象から除外した。

移植群、コントロール群とも関節内に明らかな滑膜増殖や遊離組織塊は認めなかった。移植群において修復組織の性状は4週の時点で白色かつ平滑で8、12週でもその性状を維持し隣接正常軟骨との境界は不明瞭であった(図7A-C)。コントロール群では術後4、8週において欠損修復組織は赤色の肉芽様組織を含み隣接正常軟骨から陥凹を認め、その境界は明らかであった (図7D, E)。12週では白色の軟骨様組織で覆われていたが、その表面性状は平滑でなく近位部で隣接正常軟骨の高さからの陥凹を認めた (図7F)。

4. 5. 2. 量子ドット導入群

関節内に明らかな滑膜増殖や遊離組織塊は認めなかった。移植後 4 週で欠損部

は白色かつ隣接正常軟骨と高さを同じくした平滑な軟骨様組織で被覆されていた (図 7G)。8 週では一部に赤色の肉芽様組織が存在したが (図 7H)、26 週においては 4 週と同様の軟骨様組織で欠損部は覆われていた (図 7I)。

4. 6. 修復組織の組織学的評価

4. 6. 1. サフラニン O ファストグリーン染色

4. 6. 1. 1. 量子ドット非導入群

移植群では 4 週の時点で GAG の存在を示唆する赤く染色された細胞外基質が存在し、隣接正常軟骨より厚みを有する硝子軟骨様組織で修復が得られていた (図 8A)。細胞密度は高く形態は円形で、骨髄側では肥大型軟骨細胞が観察され、関節面側へ向かって垂直な柱状構造を有していた (図 8B)。8、12 週でも同様の細胞形態と赤い染色性は保たれていたが、時間の経過とともに赤く染色される部分の厚みは隣接正常軟骨に近い部分から減少し (図 8C, D) 細胞密度も減少した (図 8E)。隣接する正常軟骨との境界には細胞密度の低下や細胞集族像を認めたが、線維組織や間隙の介在はなく、いずれの評価週においても不明瞭であった (図 8F)。8 週では軟骨下骨の骨梁構造が成熟し骨髄組織が再構築され、12 週では軟骨下骨が 8 週に比べ菲薄化した (図 8C, D)。12 週では軟骨表層での赤い染色性が一部低下していたが、細胞形態と細胞配列の柱状構造は保たれていた (図 8E)。コントロール群では

4 週において修復組織内に赤い染色性が一部に認められるものの、青く染色される線維性組織がその大部分を占めた (図 8G)。8 週においても 4 週と同様の修復組織像を示し (図 8H)、12 週では 4、8 週時と比較し軟骨層の統合性が認められたが、赤い染色性は低下していた (図 8I)。

4. 6. 1. 2. 量子ドット導入群

量子ドット非導入群と同様、4 週の時点で GAG の存在を示唆する赤く染色された細胞外基質が修復組織の関節面側に存在し、硝子軟骨様組織で修復が得られていた (図 9A)。細胞密度は高く円形で集簇し、軟骨層と軟骨下骨層との境界には細胞を豊富に含む間質が数多く存在した (図 9B)。8 週でも同様の細胞形態と赤い染色性は保たれていたが、軟骨と軟骨下骨境界に存在する、細胞を含む骨髄間質の数は低下した (図 9C)。軟骨下骨の深部に存在する骨髄間質には脂肪細胞や血球系細胞に由来する破骨細胞が存在した (図 9D)。26 週では軟骨下骨が菲薄化し、赤染性が軟骨層部で軽度低下したものの厚みは保たれていた (図 9E)。骨髄間質の細胞密度は低下していたが、骨梁壁には骨芽細胞様細胞が存在した (図 9F)。

4. 6. 2. 定量評価 (O'Driscoll スコア)

両群とも 4 から 8 週でその値は増加し、12 週でやや低下する傾向を示した。4、8

週ではコントロール群に比べ移植群で有意に高値を示した (図 10)。

4. 6. 3. 免疫組織化学染色 (I および II 型コラーゲン)

移植群では修復組織内のサフラニン O ファストグリーン染色で赤染される部分と一致して I 型コラーゲンが陰性かつ II 型コラーゲン陽性であり、サフラニン O ファストグリーン染色で青染される部分では I 型コラーゲンが陽性かつ II 型コラーゲン陰性であった (図 11)。

4. 7. 修復組織の生化学的評価 (グリコサミノグリカン定量)

組織学的スコアと同様 4 から 8 週で増加、12 週で低下する傾向を認めた。いずれの評価週においても移植群が高値を示したが、有意差は認めなかった (図 12)。

4. 8. 修復組織における量子ドットの局在

4 週において量子ドットの蛍光は欠損修復組織の正中で中間層から深層を中心に観察され、関節面側に向かうに従って蛍光強度は減弱した (図 13A)。同一の非脱灰凍結薄切標本で量子ドットの観察後にサフラニン O ファストグリーン染色を行ったサンプルでは修復組織深部の血管周囲に蛍光が観察された (図 13B-D)。8 週では修復組織全体に蛍光が観察された (図 13E)。蛍光が観察される領域は欠損修復組織の

深層から中間層、浅層にいくにしたがって減弱した。軟骨層と思われる関節面表層では、正中部ではなく隣接正常軟骨に近い部分で蛍光が観察された (図 13F)。26 週では骨梁壁の一部に蛍光が観察されたのみであった (図 13G-I)。ネガティブコントロールでは蛍光は観察されなかった。

第5章 考察

本研究では家兔関節軟骨全層欠損に骨髓細胞由来三次元軟骨様組織を同種移植した。欠損を放置した場合と比較し、移植群では肉眼的、組織学的に早期に良好な硝子軟骨様組織での欠損修復が得られた。また移植後 8、12 週の経過で軟骨層の厚みは隣接正常軟骨に近づき、軟骨下骨と骨髓組織が再構築された。細胞標識を行うために、量子ドットを導入した骨髓細胞から構築した三次元軟骨様組織を同種移植した実験においても、同様に硝子軟骨様組織での修復が得られた。1 羽のみの評価ではあるが、移植後 26 週の長期経過においても軟骨層部は骨化しておらず、その厚みが保たれており、本手法の有用性が示唆された。量子ドットを指標とした移植細胞の追跡では、主にその蛍光が欠損修復部深層から中間層で観察された。8 週までの経過では明らかであった蛍光シグナルは、26 週の評価においては減弱し骨梁壁にわずかに観察されるのみであった。以上の結果から移植された骨髓細胞は欠損修復に何らかの形で寄与していることが示唆された。

5. 1. 採取から移植までの各段階における細胞構成

本研究では、幼若家兔の長管骨骨髓腔を洗浄し細胞を採取した。骨髓腔内からの小骨片や血餅、脂肪組織は洗浄液を 100 μm のナイロンメッシュで濾過することで除去した。その後は密度勾配遠心法や細胞表面抗原マーカーなどでの選別を行わず

細胞懸濁液をフラスコに播種するため、初期段階では骨髄に存在する全ての細胞を培養していたと考えられる。単層培養開始後は培養液の交換を1週間に2から3回の頻度で行うため、その液中に浮遊している細胞はその都度除去された。初期段階では顕微鏡下に小型の血球が数多く観察されるが、その数は培地交換の回数とともに減少し、フラスコ底面に接着する紡錘型の細胞が徐々に明らかとなった。この接着性細胞は顕微鏡下には均質な細胞群に見えるが、細胞選別を行っていないことから骨髄中に存在する接着能を有する全ての細胞群、すなわち未分化な血球系幹細胞やそれを起源とする様々な血液前駆細胞、また骨髄内環境においてこれらを支持する役割を担う骨髄間質に存在する細胞群によって構成されていると考えられる。細胞増殖能は高く、単層培養開始10から14日後には75 cm²の面積を100%占め、その後は透明なジェル状の基質成分が増加し、培養開始3週間を経過するとフラスコの四隅から基質ごと細胞が剥がれはじめた。接着性細胞群とこの豊富な基質とを一塊としてシート状にフラスコ底面から剥離し三次元培養を開始することで、シートが折りたたまれながら担体を用いずに大型の三次元組織を構築した。三次元培養は無血清下に軟骨分化誘導を行うため、単層培養時とは異なり細胞増殖には強力な抑制がかかり、細胞は軟骨分化へと方向付けられる³⁶と考えられる。先行研究において、軟骨分化誘導開始4週間までの経過で、この三次元組織は組織学的には細胞密度が減少しその形態を徐々に軟骨細胞に変化させながら硝子軟骨特有の細胞外基質を

産生し、遺伝子レベルにおいても I 型コラーゲンに変わって II 型コラーゲンの発現量が増加し、硝子軟骨組織としての分化が進行することが明らかとなっている²⁵。したがって、雑多な細胞集団の中で軟骨分化誘導に反応する細胞群のみが選別され、その他の細胞はアポトーシスやネクローシスといった機序で除外されることによって三次元軟骨様組織が構築されたものと考えられる。よって、軟骨分化誘導を長期間行えば、組織を構成する細胞はより均質な細胞集団となることが予測される。骨髄間質細胞には軟骨や骨、脂肪組織への分化能を有する間葉系幹細胞^{15, 37}が存在するとされる。本研究では移植に用いた細胞とは別に、同様の手法で採取した細胞で骨、脂肪分化能を確認し、採取した細胞群の中でのその存在の可能性を回顧的に確認した。軟骨分化誘導に反応し三次元軟骨様組織を構成する細胞の由来はこの間葉系幹細胞であると考えられる。しかしながら、本研究では長期培養による幹細胞の形質転換³⁸や培地交換による細胞汚染の危険性を考慮し、軟骨分化誘導開始 1 週間後の組織を移植したため、細胞の均質性は長期に分化誘導を行ったものと比較し低いものと考えられる。組織を構成する細胞が径時的にどのように変化していくのか、どの程度まで軟骨分化誘導を行えば組織修復に十分なかを明らかにするにはさらなる詳細な検討を要する。

5. 2. 同種移植モデルにおける移植免疫

本研究は日本白色家兎を用いた骨髄細胞由来組織の同種移植実験である。同種移植とは同じ種に属する個体間での移植であり、免疫系が移植片上の同種抗原を異物として認識し、主に細胞性免疫によって移植片は拒絶される。本研究では免疫抑制剤を使用せずに同種移植を行った。移植群において膝関節の炎症所見や移植後の死亡例などは認めず、欠損修復部の組織学的所見でも明らかなリンパ球浸潤等は認めなかった。近年、間葉系幹細胞に免疫寛容が存在することが報告³⁹されているが、本実験では予見的に間葉系幹細胞を選別して移植しているわけではないため、雑多な細胞集団の中で間葉系幹細胞以外の細胞の免疫応答に関する影響は不明である。また軟骨の無血行で豊富な細胞外基質を有するという特殊な構造が移植免疫の影響を受けづらいとする報告⁴⁰もあるが、この点に関しては本研究における移植組織も豊富な細胞外基質を有するという同じ特徴を有する。しかしながら、日本白色家兎は近交系動物ではなくクローズドコロニーであることから組織抗原が完全一致しているわけではない。本実験で得られた結果のばらつきに対して、移植細胞やレシピエントの個体差のみならず、移植免疫による影響も考慮する必要がある、また長期成績においても慢性拒絶による反応との鑑別やその評価に慎重を要する。

5. 3. 量子ドットの局在

5. 3. 1. 移植組織

本研究では移植直前の組織の一部を用いて移植前段階でどの程度量子ドットが組織内に導入されているかを確認した。組織全体に量子ドットの蛍光が観察されたが、蛍光強度は不均一であった。導入効率が 100%ではないこと、導入後の単層培養期間における細胞分裂増殖に伴い、量子ドットが希釈された可能性が考えられる。Kaul²⁹は、ヒト癌細胞株を用いた実験で、約 80%の効率で量子ドットの細胞内導入が可能で、5 回の細胞分裂後も量子ドットが細胞内に観察可能であったとしている。細胞内に導入された量子ドットが、幼若家兎骨髄細胞が増殖分裂していく過程でどのように分布、局在していくのかの詳細は不明である。少なくとも移植の時点で、移植細胞に 100%標識がなされていなければ、移植後の修復組織を観察した時に、標識されていない部分がレシピエント由来の細胞であるとはいきれない。現在、導入効率改善のための研究を行っており、導入のタイミング、濃度を含めた至適条件を検討している。

5. 3. 2. 修復組織

本研究では移植した三次元軟骨様組織によって軟骨修復が得られるという仮説のもとに細胞標識実験を行った。移植後 4 週において欠損修復は硝子軟骨様組織で得

られたものの蛍光は同部では観察されず、主に欠損部正中の中間層から深層に観察された。移植後8週では修復組織全体に蛍光が観察され、関節面表層の修復軟骨に相当する部分にも蛍光が存在したが、その多くは4週と同様に骨髄間質部で観察された。26週では蛍光はほとんど観察されず、骨梁壁にわずかに観察されたのみであった。これらの結果から移植細胞は軟骨修復のみならず、骨、骨髄組織の修復³⁹、⁴¹に対して中心に寄与している可能性、移植細胞が直接的に間葉系組織に分化するのみならず栄養因子^{39,41}として間接的にレシピエント細胞に作用することで修復に寄与している可能性が示唆された。しかしながら、先に述べたように現在の量子ドットの導入効率を考慮すると、全ての移植細胞を観察できているとはいえず、初期の修復組織における旺盛な細胞分裂像から軟骨、骨細胞ともその細胞代謝速度は早いと考えられ^{41,42}、量子ドットが希釈されて観察されなくなった可能性も考えられる⁴⁵。一方、骨髄間質内や骨梁壁に量子ドットが観察されたことは骨髄を起源とする移植細胞の一部が自身にとって至適な微小環境を形成し静止状態にあることを示唆している可能性^{39,42,44}や量子ドットが細網内皮系に取り込まれる⁴⁵過程を観察している可能性がある。本実験では評価したサンプル数が少ないため、今後は数を増やして詳細な検討を行う必要がある。

5. 4. 臨床応用への課題と今後の展望

本研究では幼若家兔の長管骨を犠牲にし、骨髓から効率良く、増殖能と軟骨分化能を有する細胞を採取し大型の三次元軟骨様組織を構築した。一方、予備実験で行った成熟家兔の骨盤から骨髓穿刺針によって採取した骨髓細胞では、幼若家兔と比べその増殖能、軟骨分化能において再現性が低く、単層培養過程での基質産生能も低かったことから大型の三次元軟骨様組織を構築することは困難であった。また Sakai ら⁴⁶は、ヒト大腿骨頭壊死症患者の骨盤から採取した骨髓細胞を密度勾配遠心法で単核細胞に分離し、軟骨分化誘導を行った実験で、完全な硝子軟骨組織を構築するのは困難であったと報告し、その原因は、骨髓穿刺による細胞採取法であるため、軟骨分化能を有する細胞を効率的に採取することが困難であることや、加齢に伴う幹細胞の増殖能、分化能の低下にあると示唆した。本手法は骨髓細胞からの軟骨分化の生物分子学的機序や細胞移植による組織修復機序を明らかにする実験モデルとしては再現性の優れた良い方法であると考えられるが、臨床応用のためには、自家細胞を用いた実験系での本手法の有用性を明らかにする必要がある。そのためにはいかに効率良く間葉系幹細胞を採取し、予見的に軟骨分化能の高い幹細胞を選別し、単層培養過程でいかに豊富な細胞外基質を得るかが大型の三次元軟骨様組織を構築するために重要である。さらに現在、臨床応用されている培養骨髓間葉系細胞移植を対照群として実験を行うことで、軟骨分化誘導後の軟骨様組織を移植

する本手法の真の有用性が明らかになるものとする。

第6章 結論

家兔骨髓細胞由来三次元軟骨様組織の関節軟骨全層欠損に対する同種移植は、欠損を放置した場合と比較して、硝子軟骨様組織による欠損修復を促進する。同種移植に伴う免疫反応は短期的には明らかでなく、細胞内に導入した量子ドットが修復組織内に観察されることから、その欠損修復にはレシピエント由来細胞のみならずドナー由来細胞も寄与していることが示唆される。今後は、さらなる修復機序解明のためにより詳細な検討と自家移植実験系において本手法の有用性を明らかにする必要がある。

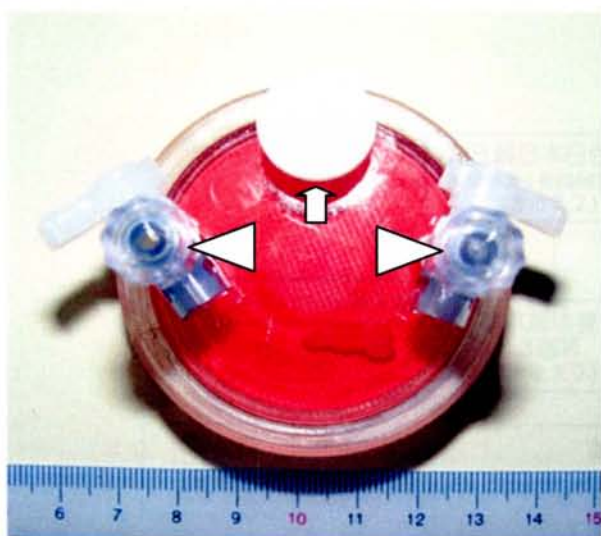


図 1. 動的回旋培養システム (培養容器正面像)

矢印の部分から細胞懸濁液を播種し、矢頭の部分で培養液の交換を行う。内容量は 10 ml で、後面にガス交換膜を備える。

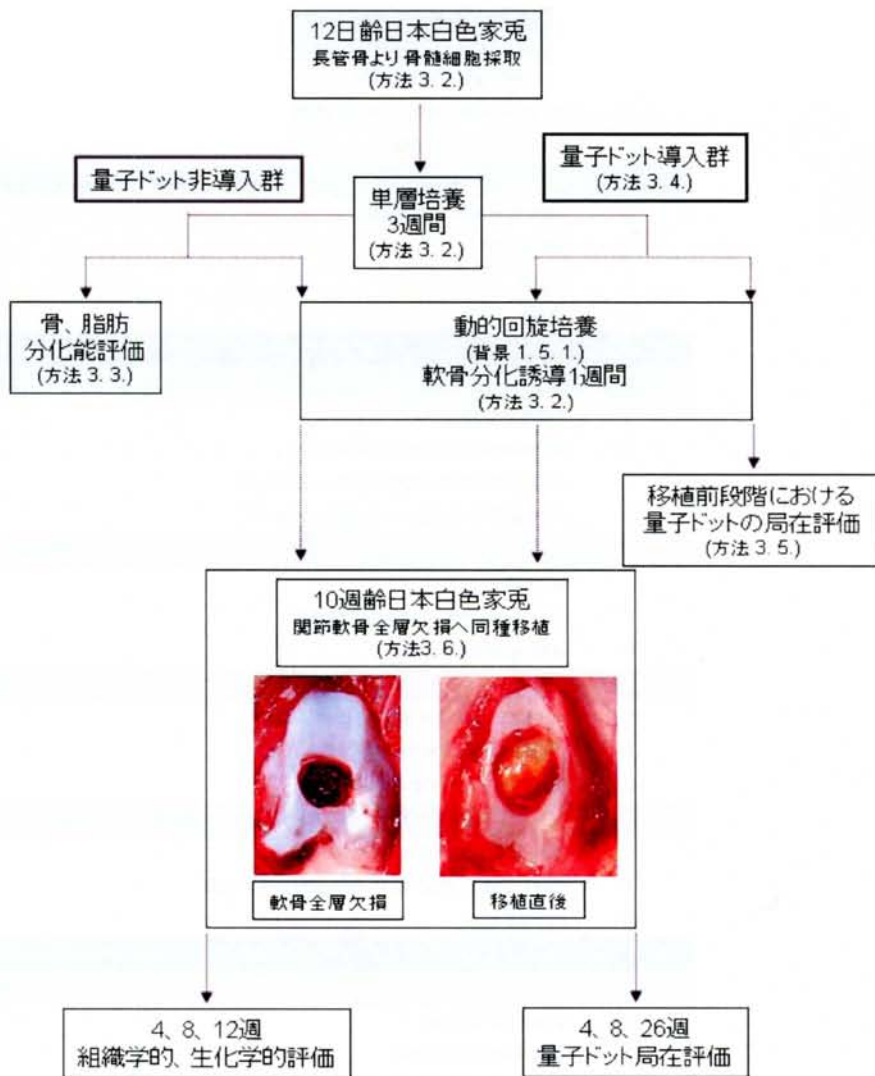


図 2. 実験群の設定と全体の流れ

表 1. O'Driscoll スコアの詳細

| | | Score |
|--|--|-----------|
| Nature of the predominant tissue | | |
| Cellular morphology | | |
| | Hyaline articular cartilage | 4 |
| | Incompletely differentiated mesenchyme | 2 |
| | Fibrous tissue or bone | 0 |
| Safranin-O staining of the matrix | | |
| | Normal or nearly normal | 3 |
| | Moderate | 2 |
| | Slight | 1 |
| | None | 0 |
| Structural characteristics | | |
| Surface regularity | | |
| | Smooth and intact | 3 |
| | Superficial horizontal lamination | 2 |
| | Fissures — 25 to 100% of the thickness | 1 |
| | Severe disruption, including fibrillation | 0 |
| Structural integrity | | |
| | Normal | 2 |
| | Slight disruption, including cysts | 1 |
| | Severe disintegration | 0 |
| Thickness | | |
| | 100% of normal adjacent cartilage | 2 |
| | 50-100% of normal cartilage | 1 |
| | 0-50% of normal cartilage | 0 |
| Bonding to the adjacent cartilage | | |
| | Bonded at both ends of graft | 2 |
| | Bonded at one end, or partially at both ends | 1 |
| | Not bonded | 0 |
| Freedom from cellular changes of degeneration | | |
| Hypocellularity | | |
| | Normal cellularity | 3 |
| | Slight hypocellularity | 2 |
| | Moderate hypocellularity | 1 |
| | Severe hypocellularity | 0 |
| Chondrocyte clustering | | |
| | No clusters | 2 |
| | <25% of the cells | 1 |
| | 25-100% of the cells | 0 |
| Freedom from degerative changes in adjacent cartilage | | |
| | Normal cellularity, no clusters, normal staining | 3 |
| | Normal cellularity, mild clusters, moderate staining | 2 |
| | Mild or moderate hypocellularity, slight staining | 1 |
| | Severe hypocellularity, poor or no staining | 0 |
| Total | | 24 |

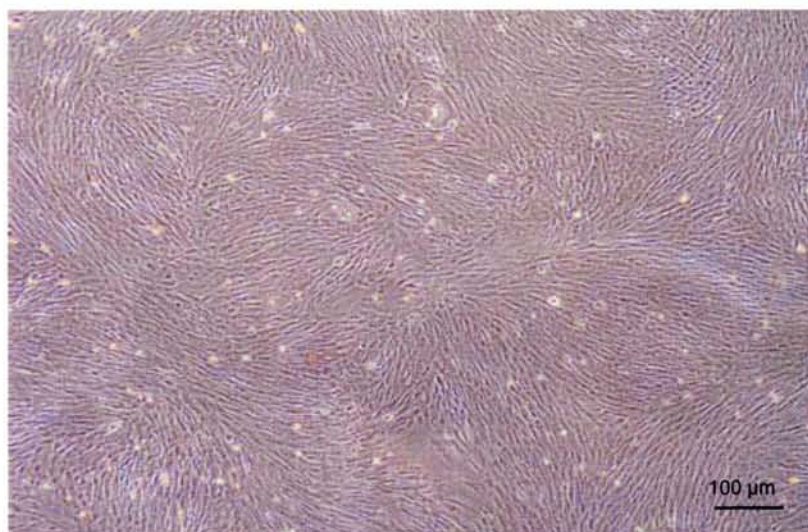


図 3. フラスコ底面に接着した家兎骨髄細胞 (単層培養開始 1 週間)

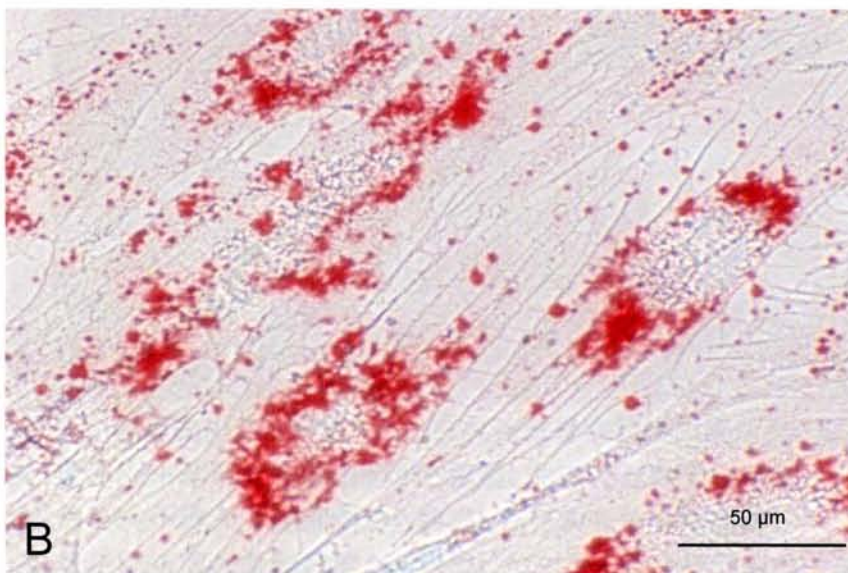
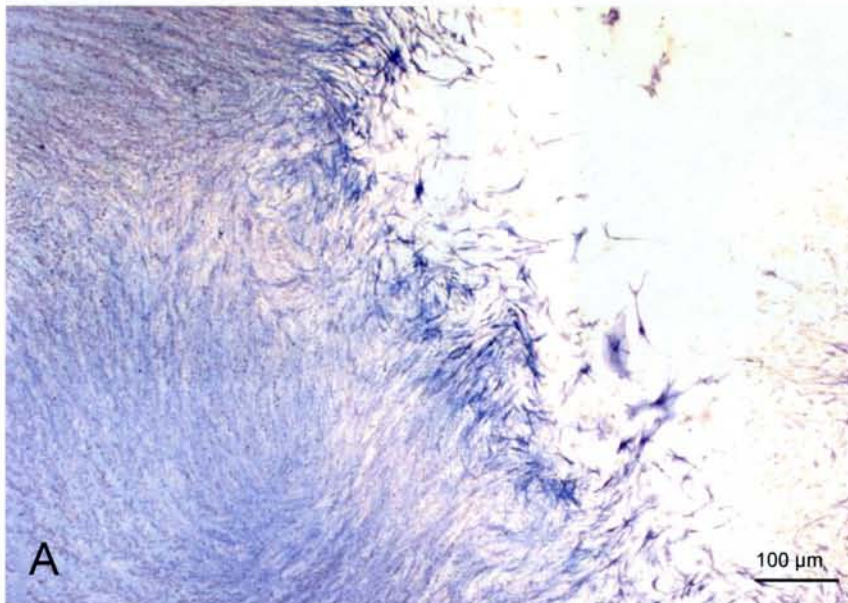


図 4. 骨、脂肪分化能評価

A; 青染部分がアルカリフォスファターゼ染色陽性所見

B; 赤染部分がオイルレッド O 染色陽性所見

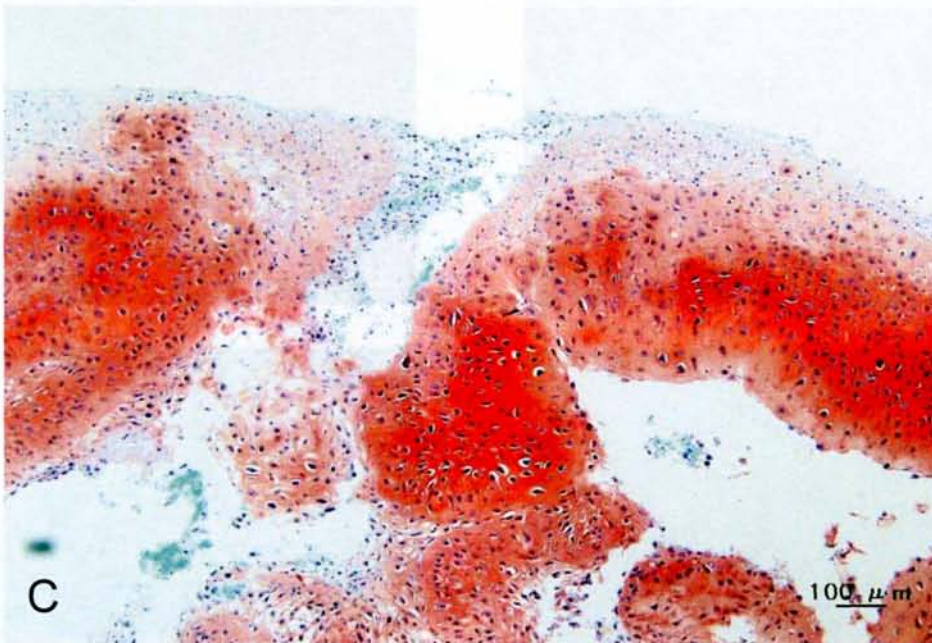
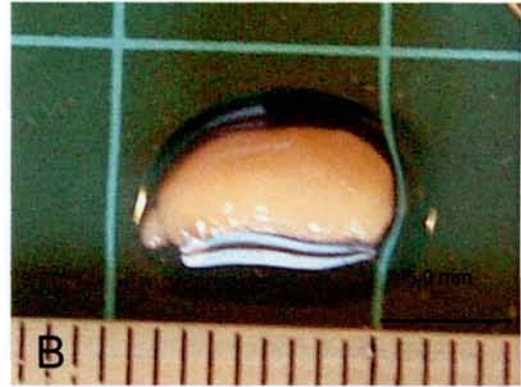


図 5. 骨髄細胞から構築された三次元軟骨様組織肉眼所見と組織像
A; 量子ドット非導入骨髄細胞から構築した三次元軟骨様組織
B; 量子ドット導入骨髄細胞から構築した三次元軟骨様組織
C; 量子ドット導入骨髄細胞から構築した三次元軟骨様組織の一部をサフランin O
ファストグリーン染色した組織像、中心の赤染部分は硝子軟骨特有の細胞外基質
の存在を示唆する。その基質の中に存在するやや大型の円形細胞が軟骨細胞で
ある。周囲は赤染性が弱く、小さい細胞が高密度で存在する。

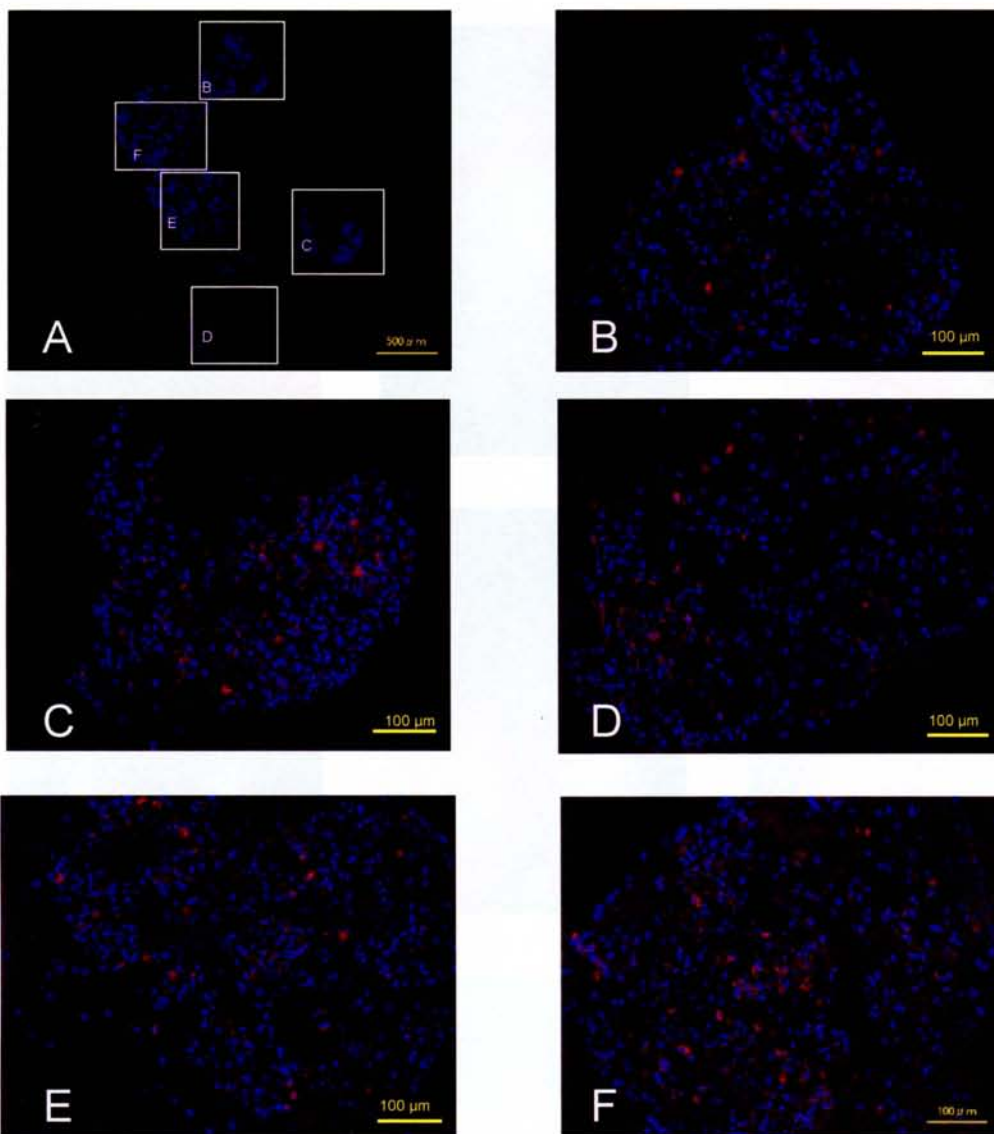


図 6. 移植前段階における量子ドットの局在
 A; 組織全体像
 B-F; 各部位の拡大像
 赤が量子ドット、青が核の蛍光を示す。

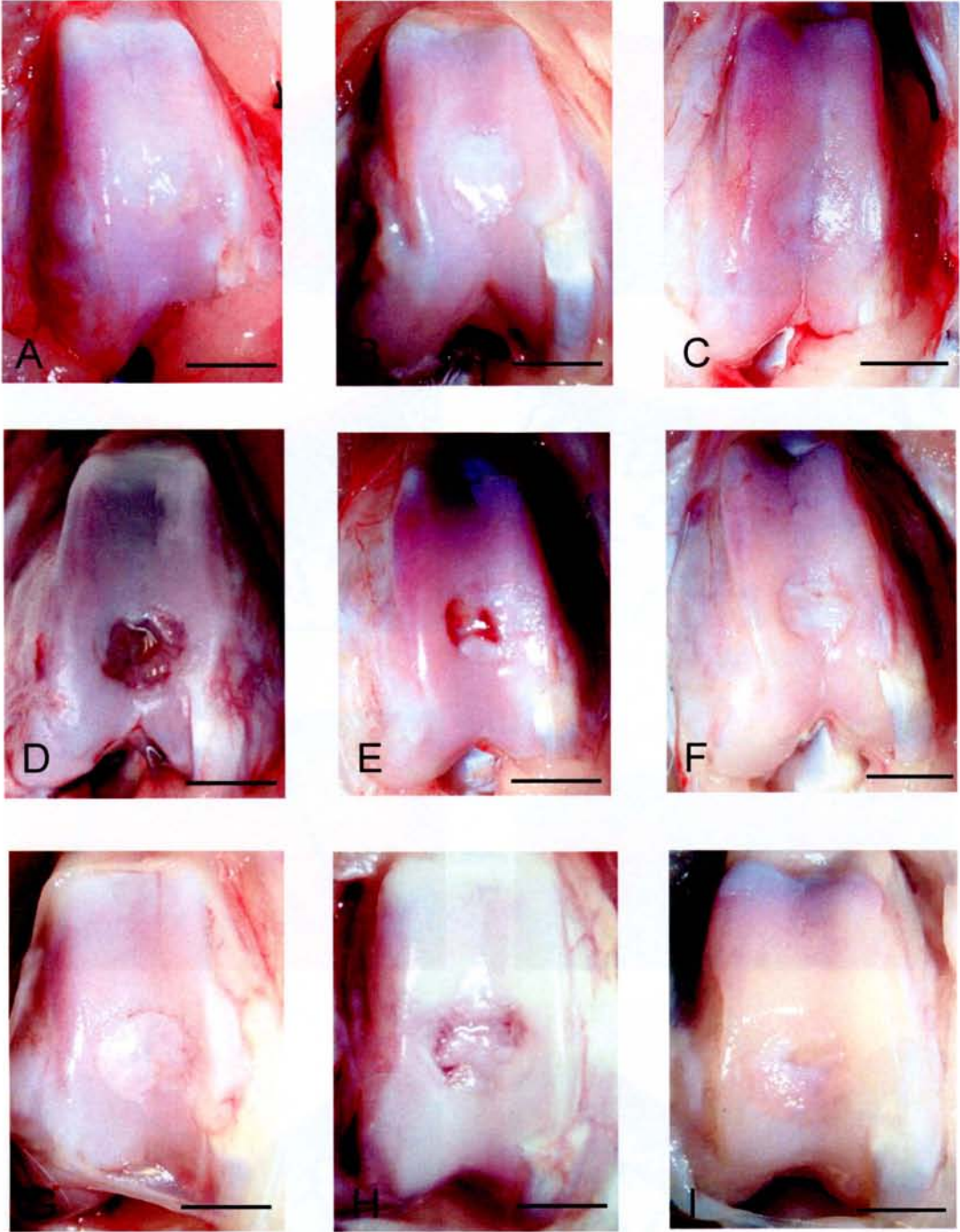


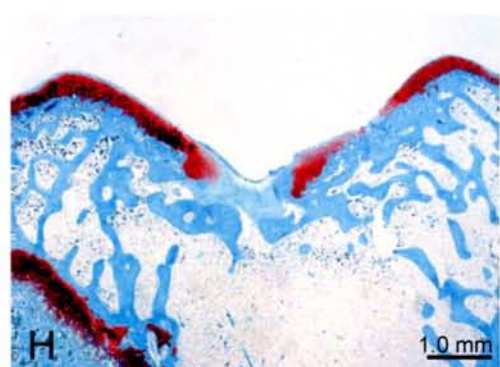
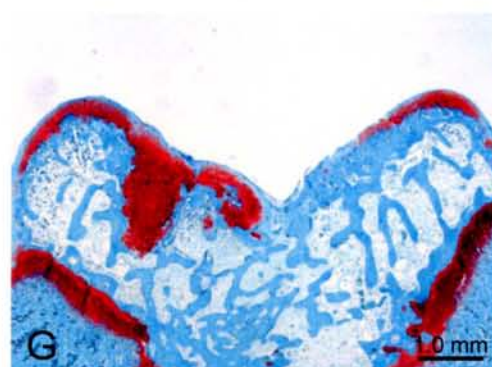
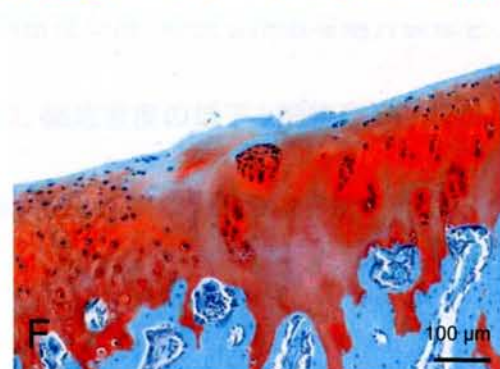
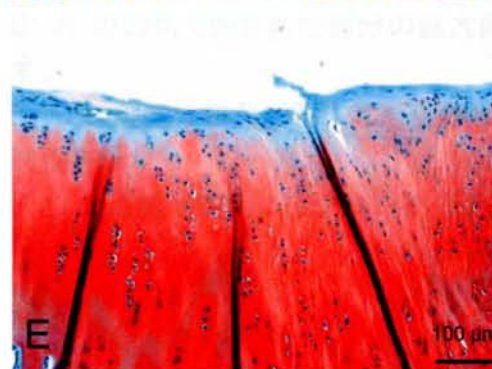
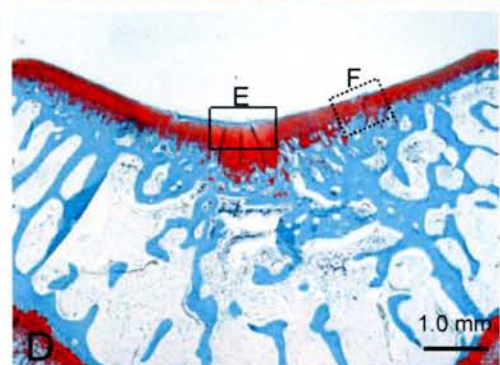
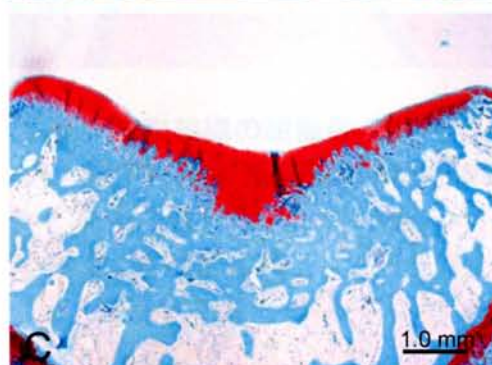
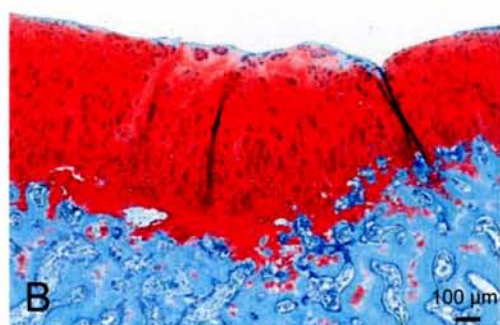
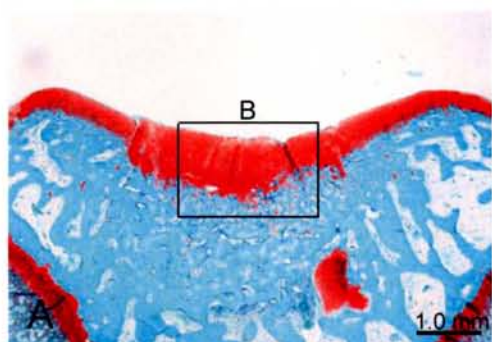
図 7. 修復組織の肉眼所見

A-C; 量子ドット非導入三次元軟骨様組織移植群 D-F; コントロール群

G-I; 量子ドット導入三次元軟骨様組織移植群

A, D, G; 術後 4 週 B, E, H; 術後 8 週 C, F; 術後 12 週 I; 術後 26 週

scale bar = 5.0 mm



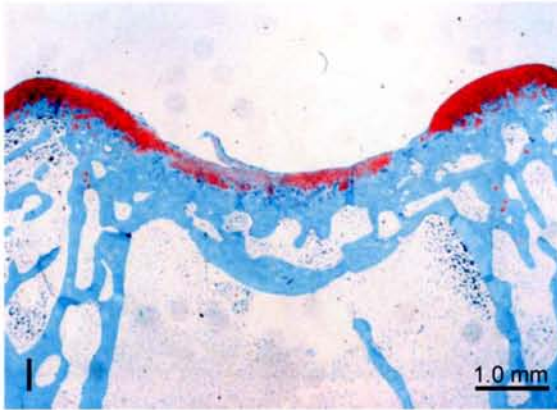


図 8. 修復組織の組織像 (サフラニン O ファストグリーン染色)

A-F; 量子ドット非導入三次元軟骨様組織移植群

G-I; 欠損放置(コントロール)群

A, B, G; 移植後 4 週

C, H; 移植後 8 週

D-F, I; 移植後 12 週

B; A の四角で囲まれた部分の拡大像、細胞密度が高く旺盛な細胞増殖分裂像を示す。

E; D の実線で四角に囲まれた部分の拡大像、細胞密度の低下と細胞表層一部の亀裂像を示す。

F; D の点線で四角に囲まれた部分の拡大像、隣接正常軟骨との境界部を示す。

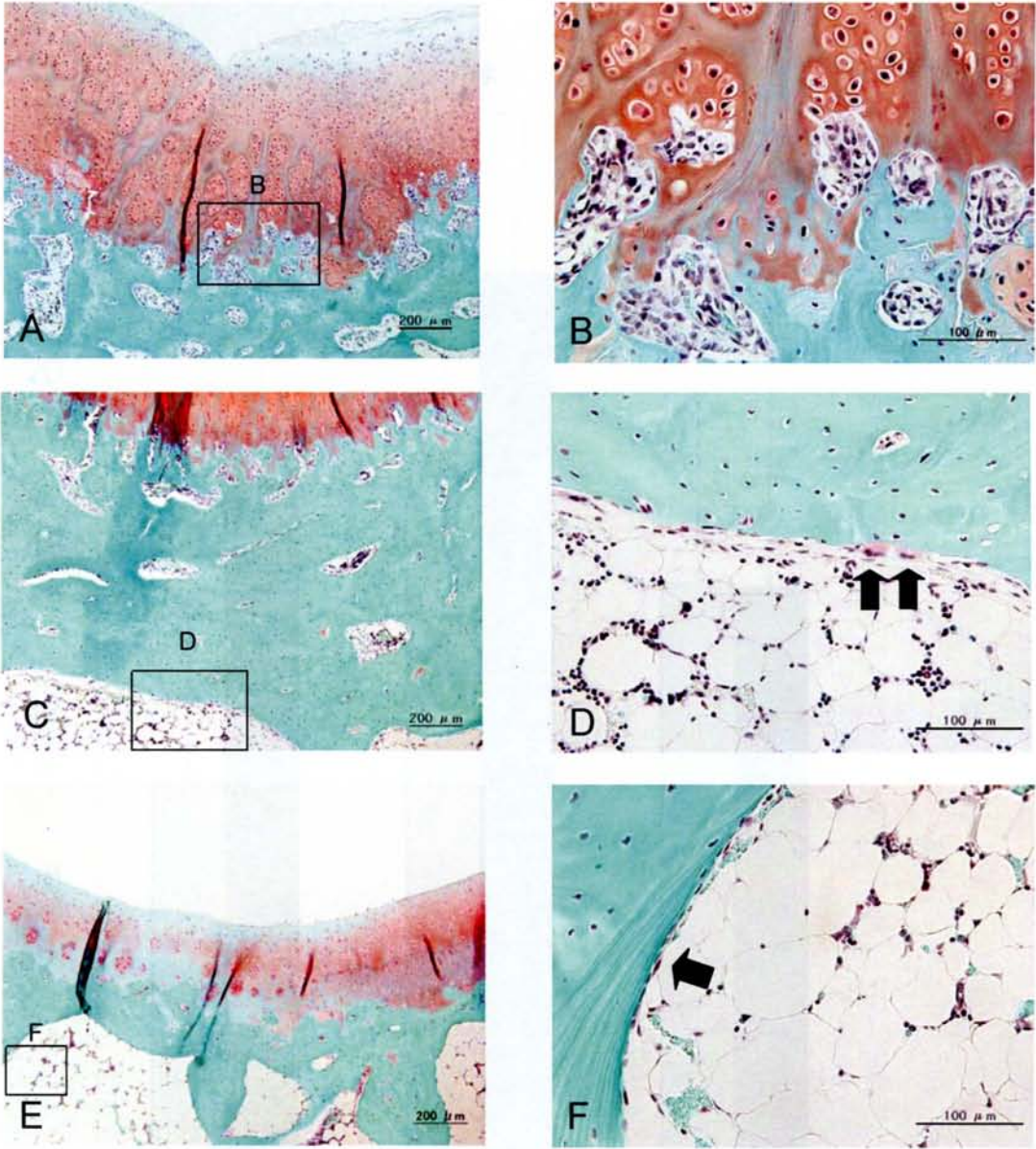


図 9. 量子ドット導入三次元軟骨様組織移植後の修復組織像
(サフラニン O ファストグリーン染色)

A, B; 移植後 4 週 C, D; 移植後 8 週 E, F; 移植後 26 週

B; A の四角で囲まれた部分の拡大像、軟骨層と軟骨下骨層の境界部には多数の間質が存在し、その内部には細胞集簇像が認められる。

D; C の四角で囲まれた部分の拡大像、軟骨下骨深層の骨梁壁には単球系由来の破骨細胞を認める (矢印)。

F; E の四角で囲まれた部分の拡大像、骨梁壁に接する骨芽細胞様細胞を認める(矢印)。

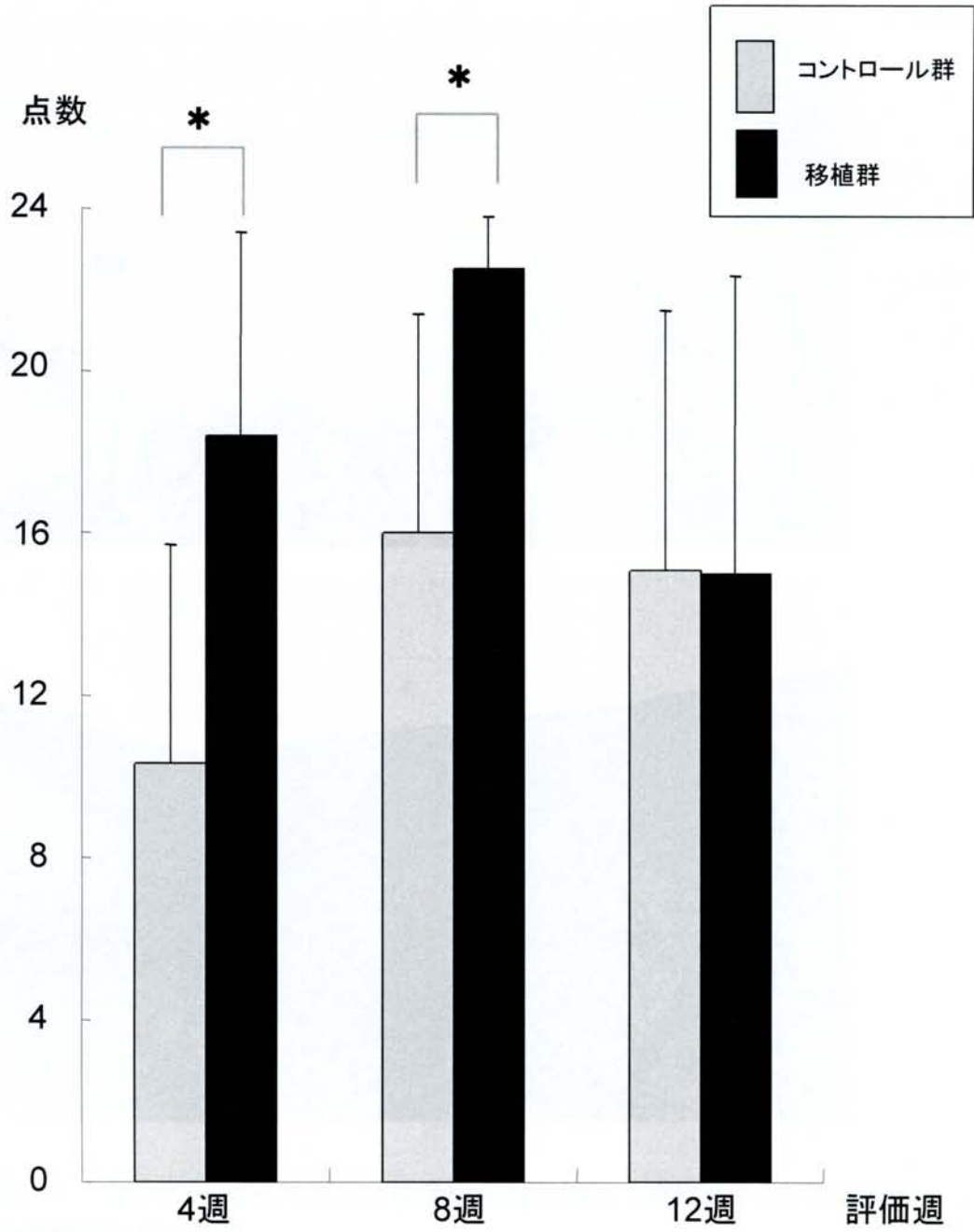


図 10. 量子ドット非導入三次元軟骨様組織移植群とコントロール群における修復組織のスコアリング評価 (O' Driscoll スコア) * $P < 0.05$

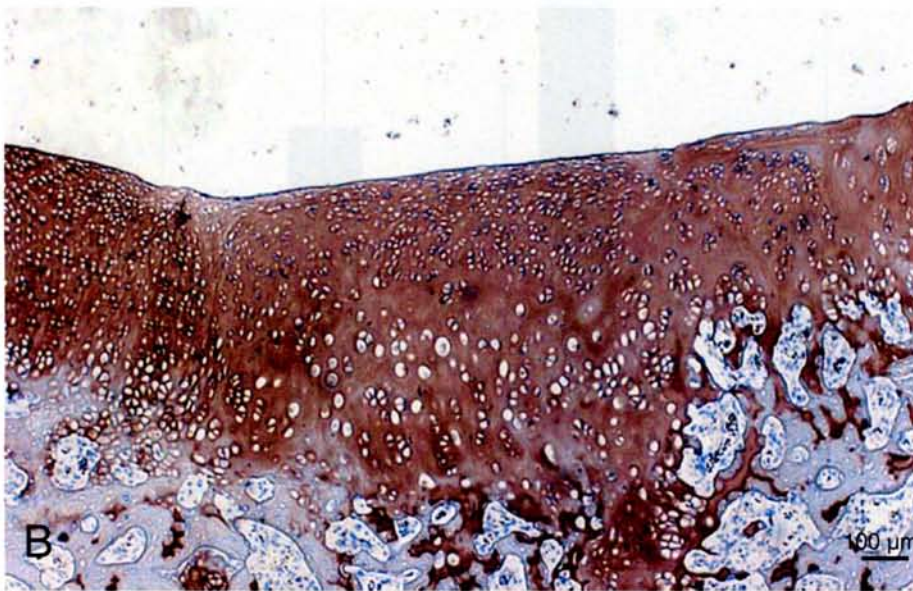
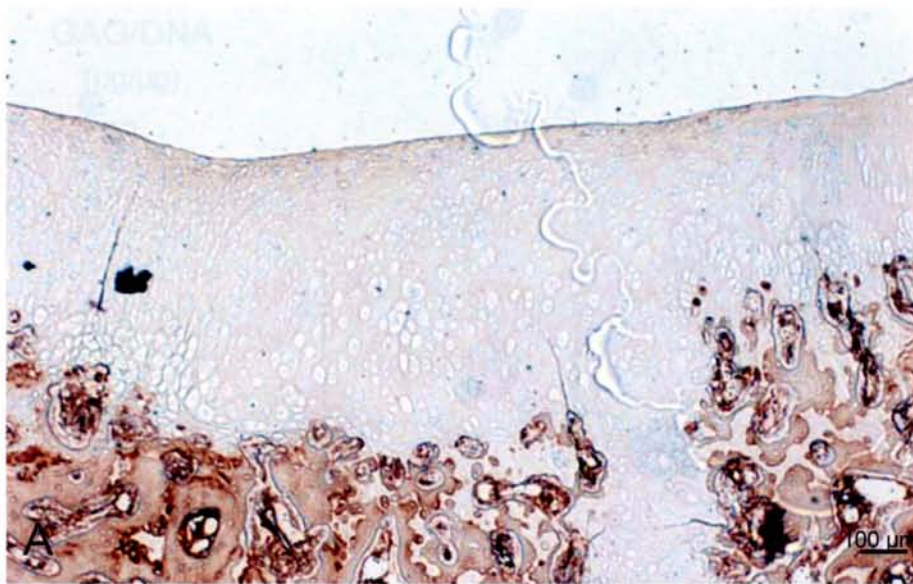


図 11. 量子ドット非導入三次元軟骨様組織移植後 4 週における修復組織の免疫組織化学染色像

A; 修復された軟骨層部は I 型コラーゲン染色陰性

B; 修復された軟骨層部は II 型コラーゲン染色陽性

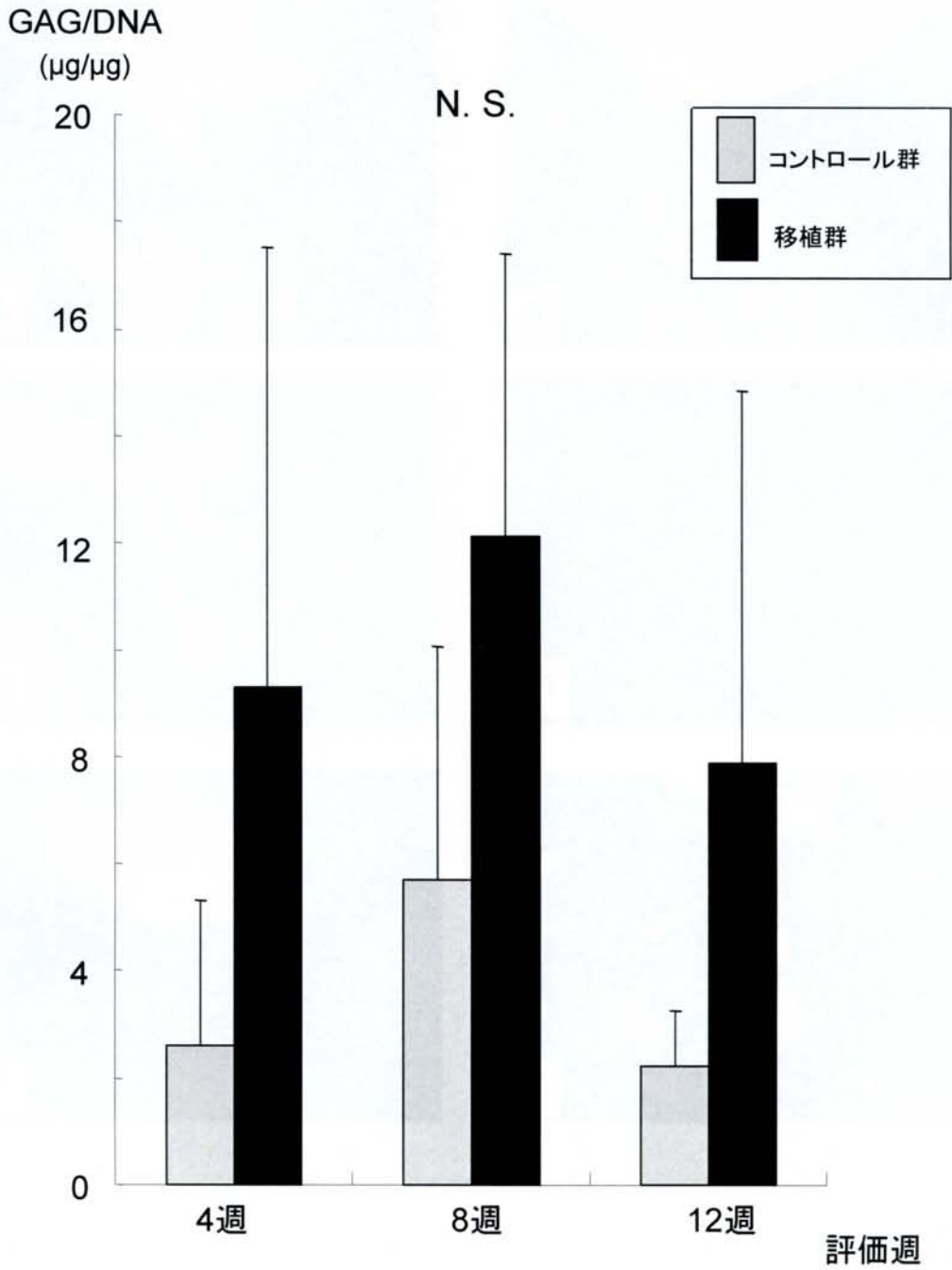
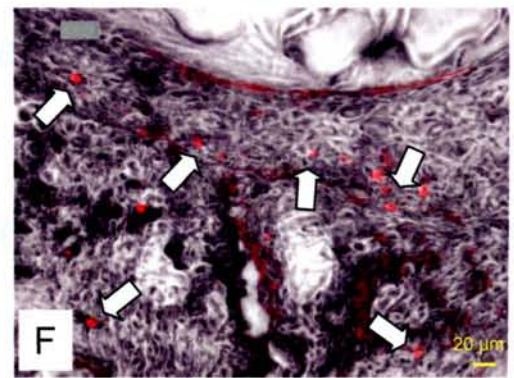
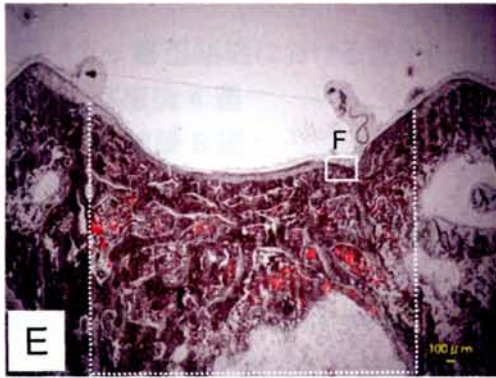
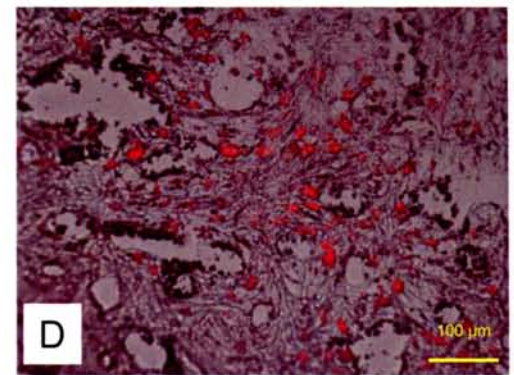
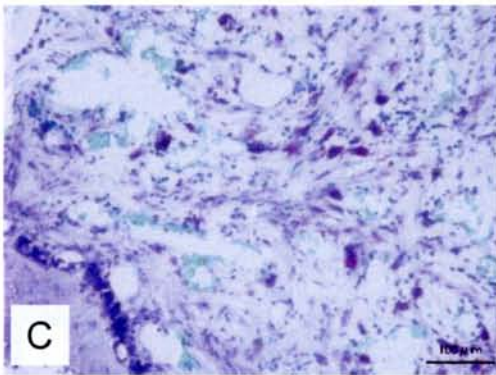
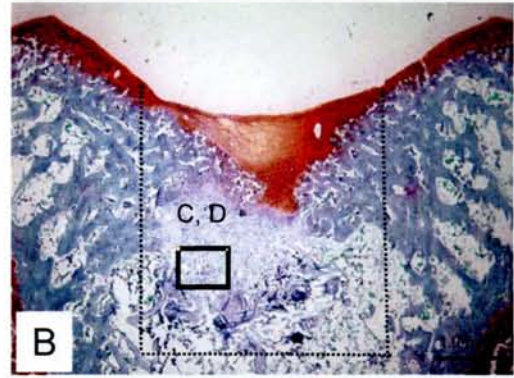


図 12. 量子ドット非導入三次元軟骨様組織移植群とコントロール群における修復組織内グリコサミノグリカン含有量 (GAG/DNA)



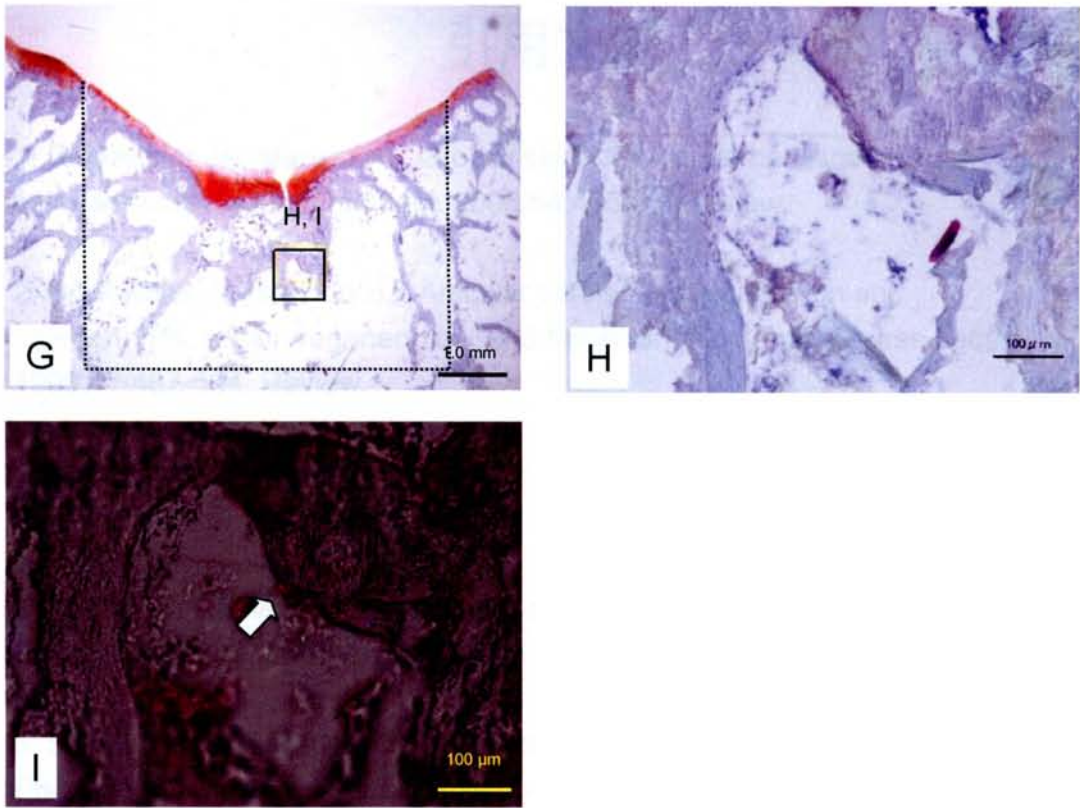


図 13. 修復組織における量子ドットの局在評価

A-D; 移植後 4 週

E, F; 移植後 8 週

G-I; 移植後 26 週

A, D, E, F, I; 明視野と蛍光観察像との複合画像、赤のドットが量子ドットの蛍光像を示す。

B, C, G, I; サフラニン O ファストグリーン染色

C, D; B の四角で囲まれた部分の拡大像

F; E の四角で囲まれた部分の拡大像

H, I; G の四角で囲まれた部分の拡大像

A, B, E, G; 欠損作製部位を点線で示す。

白矢印は量子ドットが観察された部位を示す。

引用文献

- 1: Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ. Articular cartilage and osteoarthritis. Instr Course Lect. 2005;54:465-80. Review.
- 2: Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. Instr Course Lect. 1998;47:487-504. Review.
- 3: Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage repair and transplantation. Arthritis Rheum. 1998 Aug;41(8):1331-42. Review.
- 4: Hunter W. Of the structure and disease of articulating cartilages. 1743. Clin Orthop Relat Res. 1995 Aug;(317):3-6.
- 5: Schmidt H, Schulze KJ, Cyffka R. Results of treatment of cartilage damage by Pridie drilling of the knee joint. Beitr Orthop Traumatol. 1988 Mar;35(3):117-22.
- 6: Steadman JR, Rodkey WG, Briggs KK, Rodrigo JJ. The microfracture technic in the management of complete cartilage defects in the knee joint. Orthopade. 1999 Jan;28(1):26-32.
- 7: Mitchell N, Shepard N. The resurfacing of adult rabbit articular cartilage by multiple perforations through the subchondral bone. J Bone Joint Surg Am. 1976 Mar;58(2):230-3.
- 8: Yamashita F, Sakakida K, Suzu F, Takai S. The transplantation of an autogeneic osteochondral fragment for osteochondritis dissecans of the knee. Clin Orthop Relat Res. 1985 Dec;(201):43-50.
- 9: Matsusue Y, Yamamuro T, Hama H. Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. Arthroscopy. 1993;9(3):318-21.
- 10: Hangody L, Kish G, Kárpáti Z, Szerb I, Udvarhelyi I. Arthroscopic

autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. A preliminary report. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 1997;5(4):262-7.

11: Grande DA, Singh IJ, Pugh J. Healing of experimentally produced lesions in articular cartilage following chondrocyte transplantation. *Anat Rec.* 1987 Jun;218(2):142-8.

12: Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med.* 1994 Oct 6;331(14):889-95.

13: Peterson L, Minas T, Brittberg M, Lindahl A. Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A Suppl 2:17-24.

14: Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, Ruadkow IA. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol.* 1974;2(2):83-92.

15: Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2;284(5411):143-7.

16: Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1994 Apr;76(4):579-92.

17: Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage.* 2002 Mar;10(3):199-206.

18: Wakitani S, Kawaguchi A, Tokuhara Y, Takaoka K. Present status of and future direction for articular cartilage repair. *J Bone Miner Metab.*

2008;26(2):115-22.

19: Quintavalla J, Uziel-Fusi S, Yin J, Boehnlein E, Pastor G, Blancuzzi V, Singh HN, Kraus KH, O'Byrne E, Pellas TC. Fluorescently labeled mesenchymal stem cells (MSCs) maintain multilineage potential and can be detected following implantation into articular cartilage defects. *Biomaterials*. 2002 Jan;23(1):109-19.

20: Shao XX, Hutmacher DW, Ho ST, Goh JC, Lee EH. Evaluation of a hybrid scaffold/cell construct in repair of high-load-bearing osteochondral defects in rabbits. *Biomaterials*. 2006 Mar;27(7):1071-80.

21: Oshima Y, Watanabe N, Matsuda K, Takai S, Kawata M, Kubo T. Behavior of transplanted bone marrow-derived GFP mesenchymal cells in osteochondral defect as a simulation of autologous transplantation. *J Histochem Cytochem*. 2005 Feb;53(2):207-16.

22: Hiyama A, Mochida J, Iwashina T, Omi H, Watanabe T, Serigano K, Tamura F, Sakai D. Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model. *J Orthop Res*. 2008 May;26(5):589-600.

23: Jing XH, Yang L, Duan XJ, Xie B, Chen W, Li Z, Tan HB. In vivo MR imaging tracking of magnetic iron oxide nanoparticle labeled, engineered, autologous bone marrow mesenchymal stem cells following intra-articular injection. *Joint Bone Spine*. 2008 Jul;75(4):432-8.

24: Farrell E, Wielopolski P, Pavljasevic P, van Tiel S, Jahr H, Verhaar J, Weinans H, Krestin G, O'Brien FJ, van Osch G, Bernsen M. Effects of iron oxide incorporation for long term cell tracking on MSC differentiation in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 May 16;369(4):1076-81.

25: Ohyabu Y, Kida N, Kojima H, Taguchi T, Tanaka J, Uemura T. Cartilaginous tissue formation from bone marrow cells using rotating wall vessel (RWV) bioreactor. *Biotechnol Bioeng*. 2006 Dec 5;95(5):1003-8.

26: Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro

chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res.* 1998 Jan 10;238(1):265-72.

27: Schwarz RP, Goodwin TJ, Wolf DA. Cell culture for three-dimensional modeling in rotating-wall vessels: an application of simulated microgravity. *J Tissue Cult Methods.* 1992;14(2):51-7.

28: Wadhwa R, Kaul SC, Ikawa Y, Sugimoto Y. Identification of a novel member of mouse hsp70 family. Its association with cellular mortal phenotype. *J Biol Chem.* 1993 Mar 25;268(9):6615-21.

29: Kaul Z, Yaguchi T, Harada JI, Ikeda Y, Hirano T, Chiura HX, Kaul SC, Wadhwa R. An antibody-conjugated internalizing quantum dot suitable for long-term live imaging of cells. *Biochem Cell Biol.* 2007 Feb;85(1):133-40.

30: Medintz IL, Mattoussi H, Clapp AR. Potential clinical applications of quantum dots. *Int J Nanomedicine.* 2008;3(2):151-67.

31: Ballou B, Lagerholm BC, Ernst LA, Bruchez MP, Waggoner AS. Noninvasive imaging of quantum dots in mice. *Bioconjug Chem.* 2004 Jan-Feb;15(1):79-86.

32: Kobayashi H, Hama Y, Koyama Y, Barrett T, Regino CA, Urano Y, Choyke PL. Simultaneous multicolor imaging of five different lymphatic basins using quantum dots. *Nano Lett.* 2007 Jun;7(6):1711-6.

33: Ohyabu Y, Kaul Z, Yoshioka T, Inoue K, Sakai S, Mishima H, Uemura T, Kaul SC, Wadhwa R. Stable and nondisruptive in vitro/in vivo labeling of mesenchymal stem cells by internalizing quantum dots. *Hum Gene Ther.* 2009 Mar;20(3):217-24.

34: Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1993 Apr;75(4):532-53.

35: O'Driscoll SW, Keeley FW, Salter RB. Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in major full-thickness

defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. A follow-up report at one year. *J Bone Joint Surg Am.* 1988 Apr;70(4):595-606.

36: Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum.* 2005 Aug;52(8):2521-9.

37: Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991 Sep;9(5):641-50.

38: Røslund GV, Svendsen A, Torsvik A, Sobala E, McCormack E, Immervoll H, Mysliwicz J, Tonn JC, Goldbrunner R, Lønning PE, Bjerkvig R, Schichor C. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res.* 2009 Jul 1;69(13):5331-9.

39: Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol.* 2009 Jan;217(2):318-24. Review.

40: Toolan BC, Frenkel SR, Pereira DS, Alexander H. Development of a novel osteochondral graft for cartilage repair. *J Biomed Mater Res.* 1998 Aug;41(2):244-50.

41: Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem.* 2006 Aug 1;98(5):1076-84. Review.

42: Quesenberry PJ, Aliotta JM. The paradoxical dynamism of marrow stem cells: considerations of stem cells, niches, and microvesicles. *Stem Cell Rev.* 2008 Sep;4(3):137-47.

43: Seleverstov O, Zibirnyk O, Zscharnack M, Bulavina L, Nowicki M, Heinrich JM, Yezhelyev M, Emmrich F, O'Regan R, Bader A. Quantum dots for human mesenchymal stem cells labeling. A size-dependent autophagy activation. *Nano Lett.* 2006 Dec;6(12):2826-32.

44: Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell.* 2004 Mar 19;116(6):769-78. Review.

45: Rosen AB, Kelly DJ, Schuldt AJ, Lu J, Potapova IA, Doronin SV, Robichaud KJ, Robinson RB, Rosen MR, Brink PR, Gaudette GR, Cohen IS. Finding fluorescent needles in the cardiac haystack: tracking human mesenchymal stem cells labeled with quantum dots for quantitative in vivo three-dimensional fluorescence analysis. *Stem Cells*. 2007 Aug;25(8):2128-38.

46: Sakai S, Mishima H, Ishii T, Akaogi H, Yoshioka T, Ohyabu Y, Chang F, Ochiai N, Uemura T. Rotating three-dimensional dynamic culture of adult human bone marrow-derived cells for tissue engineering of hyaline cartilage. *J Orthop Res*. 2009 Apr;27(4):517-21.

発表論文

1. Yoshioka T, Mishima H, Ohyabu Y, Sakai S, Akaogi H, Ishii T, Kojima H, Tanaka J, Ochiai N, Uemura T.

Repair of large osteochondral defects with allogeneic cartilaginous aggregates formed from bone marrow-derived cells using RWV bioreactor.

Journal of Orthopaedic Research. 2007 October;25(10):1291-8.

参考論文

1. Yoshioka T, Mishima H, Ohyabu Y, Sakai S, Akaogi H, Ishii T, Kojima H, Tanaka J, Ochiai N, Uemura T.
Repair of large osteochondral defects with allogeneic cartilaginous aggregates formed from bone marrow-derived cells using RWV bioreactor.
Journal of Orthopaedic Research. 2007 October;25(10):1291-8.
2. Ohyabu Y, Kaul Z, Yoshioka T, Inoue K, Sakai S, Mishima H, Uemura T, Kaul SC, Wadhwa R.
Stable and nondisruptive in vitro/in vivo labeling of mesenchymal stem cells by internalizing quantum dots.
Human Gene Therapy. 2009 March;20(3):217-24.
3. Sakai S, Mishima H, Ishii T, Akaogi H, Yoshioka T, Ohyabu Y, Chang F, Ochiai N, Uemura T.
Rotating three-dimensional dynamic culture of adult human bone marrow-derived cells for tissue engineering of hyaline cartilage.
Journal of Orthopaedic Research. 2009 April;27(4):517-21.

謝辞

本論文の作成にあたり、御指導、御校閲を賜りました落合直之教授に心から感謝いたします。また先端応用医学専攻運動器制御医学分野の三島初講師および産業技術総合研究所ナノテクノロジー部門 植村寿公研究グループ長の御指導、御助言、御協力に対してあらためて深謝いたします。さらに実験にあたり多大なる御協力と御助言を頂いた産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門 Wadhwa Renu 研究グループ長、Kaul Sunil 研究員、いちほら病院整形外科 酒井晋介博士、産業技術総合研究所 大藪淑美博士、Kaul Zeenia 博士に厚く御礼申し上げます。