

崎村幸一郎 論文内容の要旨

主論文

Effects of insulin-like growth factor I on transforming growth factor beta 1 induced chondrogenesis of synovium-derived mesenchymal stem cells cultured in a polyglycolic acid scaffold.

PGA-scaffold を用いたヒト滑膜由来細胞の *in vitro* での軟骨分化における IGF-I と TGF- β 1 の影響

崎村幸一郎 松本智子 宮本力 尾崎誠 進藤裕幸

Cells Tissues Organs • 183 巻 2 号 55-61 2006 年

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 構造病態整形外科 専攻

主任指導教員: 進藤裕幸教授

【緒言】関節軟骨はその特徴的な構造により自己修復能が極めて低く、ひとたび損傷されると自然修復されないと考えられている。軟骨欠損が放置されると経時的に欠損部が広がり、最終的には変形性関節症へと進行し、その結果、疼痛や可動域制限などを招き関節機能は低下する。

今まで関節軟骨修復法として骨軟骨移植や骨膜移植、軟骨細胞移植などが行われてきたが、本来の硝子軟骨で確実に修復できる確立した方法はない。

近年、組織工学的手法を用いた関節軟骨再生の基礎的研究およびその臨床応用が進められており、細胞供給源として骨髄由来幹細胞が注目されている。しかしながら骨髄由来幹細胞はその獲得できる細胞数が少なく、関節軟骨再生の細胞源として利用するには問題がある。

滑膜組織には骨髄と同様、多分化能を有する細胞が存在することが報告されており、滑膜由来細胞が関節軟骨再生に有用な細胞源となりうる可能性がある。

トランスフォーミング成長因子(TGF)- β 1 は未分化間葉系細胞の軟骨への分化に必要であることが知られているが、インシュリン様成長因子(IGF) -I の作用機序についてはまだ不明なことが多い。そこで本研究では、生体内分解性で安全性の高いポリグリコール酸(PGA)-scaffold を用いて滑膜由来細胞から軟骨様組織を形成し、さらに軟骨分化におよぼす IGF-I の影響について明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】術前に同意を得た関節リウマチ(RA)および変形性膝関節症(OA)患者の滑膜を人工膝関節置

換術時に採取した。得られた滑膜片を細片し、トリプシンおよびパパイニンで酵素処理することにより滑膜細胞を分離した後に、単層培養系で増殖させた。4代継代した滑膜細胞をスピナーフラスコの中で浮遊培養し、直径5mm、厚さ2mmのPGA-scaffoldに取り込んだ後、アガロースを薄くコーティングした培養皿に移し8週間三次元培養を行った。軟骨分化基礎培地にTGF- β 1とIGF-Iを単独、または同時に添加して培養後、作成した組織について、サフラニンO染色による組織学的評価、ジメチレンブルー(DMB)法によるグリコサミノグリカン(GAG)量の定量、ヘキスト蛍光染色液を用いたDNAの定量、さらに総RNAを抽出後、RT-PCR法によるII型コラーゲンおよびアグリカンのmRNA発現について比較検討した。

【結果】4週間三次元培養を行った時点でTGF- β 1は単独でも軟骨様組織を形成したが、IGF-I単独ではその作用は少なかった。組織学的にはTGF- β 1あるいはTGF- β 1にIGF-Iを同時に添加したものがサフラニンO染色で赤染し、豊富な軟骨基質の存在が明らかになった。さらに、8週まで三次元培養を行うことでサフラニンOの染色性が増加した。

GAGの合成量は4週間の三次元培養でTGF- β 1あるいはTGF- β 1にIGF-Iを同時に添加したもので増し、8週間三次元培養を行った時点ではTGF- β 1にIGF-Iを同時に添加したもので最も増加した。一方、DNA量は長期間培養しても増加することはなかった。

RT-PCR法による解析では作成したすべての軟骨様組織で軟骨基質の成分であるII型コラーゲンおよびアグリカンのmRNA発現が確認できた。なかでもTGF- β 1にIGF-Iを同時に添加したものでは他と比べてアグリカンのmRNA発現が強かった。

【考察】滑膜由来細胞は骨髄、骨膜、骨格筋、脂肪由来の細胞よりも高い軟骨分化能を有し、末期のOA患者より採取された滑膜由来細胞にも骨・軟骨分化能があることが報告されており、軟骨再生において有用な細胞と考えられる。本研究では末期のOA、RA患者より採取した滑膜由来細胞を大きな再生組織を得るためにPGA-scaffoldを用いて三次元培養し、軟骨様組織を作成した。細胞源がOA、RA由来の滑膜細胞に関わらず、軟骨分化は軟骨分化基礎培地にTGF- β 1添加することにより劇的に促進されたが、IGF-I単独では軟骨の分化を促進させる作用は弱いと考えられた。また、TGF- β 1とIGF-Iを組み合わせることで長期にわたってGAG産生量が増加したことより、IGF-Iには軟骨分化後の軟骨基質の合成を増加させる作用があることを示した。滑膜由来細胞はPGA-scaffoldの中で三次元培養することにより、その形質を維持したまま増殖可能であり、軟骨特有の細胞外基質を産生可能である。今後、滑膜組織は軟骨再生の細胞源として臨床的にも有用であることが期待される。