Osaka University Knowledge Archive

Title	Preparation of Scaffold-free Tissue Engineered Constructs Derived from Human Synovial Mesenchymal Stem Cells under Low Oxygen Tension Enhances their Chondrogenic Differentiation Capacity
Author(s)	安井, 行彦
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/55732
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

[Format-P02]

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	安井　行彦
論文題名 Title	Preparation of Scaffold-free Tissue Engineered Constructs Derived from Human Synovial Mesenchymal Stem Cells under Low Oxygen Tension Enhances their Chondrogenic Differentiation Capacity （低酸素下で調製した滑膜間葉系幹細胞由来三次元人工組織の軟骨分化能の検討）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

関節軟骨は硝子軟骨で構成されており、自己修復能に乏しいため、既存の治療では十分な成績が得られていない。軟骨への再生医療の一法として、我々は滑膜間葉系幹細胞（MSC）とMSCが産生する細胞外マトリックスから構成されるtissue engineered construct（TEC）を開発してきた。TECはシート状の三次元組織で接着性と可塑性を有するため外因性のスキャフォールドを用いることなく軟骨欠損部に移植可能である。ブタ軟骨欠損モデルでTECの軟骨修復における有用性を報告し、現在は臨床研究を行っている。しかしTECによる修復軟骨は特に表層において線維組織が混入し正常の硝子軟骨での再生には至っていない。さらなる治療効率の向上にはTECの軟骨分化能を高める必要がある。低酸素刺激がMSCの細胞老化を抑制し、軟骨分化能を高めるという報告があるが組織工学の工程に応用した報告はない。関節内の酸素濃度は５％程度であるため、従来の培養法では生理的な酸素濃度より高い環境で細胞培養を行っており、非生理的な環境が細胞の機能・分化能を阻害している可能性が考えられる。本研究では低酸素下で作製したTECの軟骨分化能を評価した。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

ヒト滑膜(n=6)より単離したMSCを3回継代して増殖させ、基礎培地にアスコルビン酸を加えた培地で4×10^5cell/cm^2で2週間高密度培養し、TECを作製した。TEC作製までは20%酸素下(通常群)と5％酸素下(低酸素群)に分けて行った。通常群TECと低酸素群TECの軟骨分化能を評価する目的で軟骨分化誘導は両群とも関節内と同等の5%酸素下で行った。TECの軟骨分化誘導は、TECを再接着させた後に分化培地(DMEM, 200ng/ml BMP2, 1% ITS+Premix, 0.2mM Ascorbate-2P)を用いて行い、グリコサミノグリカン(GAG)測定、遺伝子発現、組織像を20％群と5%群で比較検討した。

通常酸素下で培養したMSCは継代数が増えると共に細胞老化の指標となる細胞形態の肥大化・平坦化を認め、増殖速度の低下を認めたが、低酸素群では紡錘形の形態を保ち、増殖速度の低下も抑制された。低酸素下で培養したMSCは細胞老化の指標となるP16の遺伝子発現とSA-βGAL染色陽性率が優位に低下した。低酸素下で作製したTECの重量・体積・コラーゲン含有量は通常群と有意差を認めず、低酸素下でも通常通りTECが形成された。低酸素群TECでは通常群TECと比較し、P16の遺伝子発現・SA-βGAL染色の染色性の低下を認め、低酸素培養が通常培養のみならず、高密度培養中の細胞老化も抑制することが分かった。TECの軟骨分化誘導後に硝子軟骨の細胞外基質であるGAGを定量すると低酸素群ではGAGの産生量が2.7倍($p<0.01$)、含有率が1.8倍($p<0.01$)上昇した。通常群と比較し、低酸素群では軟骨分化マーカー遺伝子であるSOX9が2.2倍($p=0.039$)、COL2A1が3.3倍($P<0.01$)、ACANが11倍($P=0.047$)発現上昇を認めた。組織学的評価では低酸素群はGAGを特異的に染色するSafranin O染色・Toluidine blue染色と硝子軟骨特有のⅡ型コラーゲンの免疫染色で染色性に優れていた。線維組織を検出するPicrosirius Red染色の偏光顕微鏡下での観察では通常酸素群では黄色く光る線維組織の混入が観察されたが、低酸素群では正常関節軟骨と同様に線維組織の混入が観察されず、硝子軟骨様組織を形成していることが分かった。低酸素群では軟骨関連遺伝子発現亢進、細胞老化抑制を認め、それらが軟骨分化能促進の分子基盤となることが示唆された。

〔総　括(Conclusion)〕

低酸素下での培養がMSC・TECの細胞老化を抑制し、軟骨分化能を高めた。低酸素培養は低コストで安全な修飾法であり、組織工学による軟骨再生の質的向上に寄与する可能性が示唆された。

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名） 安井　行彦

		（職）	氏　　名
論文審査担当者	主　査	大阪大学教授	吉川秀樹
	副　査	大阪大学教授	夢本一彦
	副　査	大阪大学教授	中田研

論文審査の結果の要旨

本論文は軟骨再生治療の一法である、Tissue Engineered Construct(TEC)の技術に低酸素培養を応用し、TECの軟骨分化能を高めたことを報告したものである。

TECは間葉系幹細胞（MSC）とMSCが産生する細胞外マトリックスから構成される人工組織である。軟骨再生における有用性を臨床研究で確認したが、TECによる修復軟骨は線維組織が混入し正常軟骨の再生には至っていない。更なる治療効率の向上にはTECの軟骨分化能を高める必要がある。低酸素刺激がMSCの軟骨分化能を高めるという報告があるが組織工学の工程に応用した報告はない。本研究では低酸素下で調整したTECの軟骨分化能を評価した。
低酸素群は線維組織混入のない正常軟骨様組織を産生し、軟骨基質の染色性も通常群より優れた。低酸素群では軟骨関連遺伝子発現亢進、細胞老化抑制を認め、軟骨分化能促進の分子基盤となることが示唆された。低酸素下で調整したTECは軟骨再生の質的向上に寄与する可能性が示唆された。

以上より、学位論文に値する。