

Title	Intervertebral disc regeneration with an adipose mesenchymal stem cell-derived tissue-engineered construct in a rat nucleotomy model
Author(s)	石黒, 博之
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72545
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 石黒 博之									
論文審査担当者	<table border="1"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">(職)</th> <th style="text-align: center;">氏 名</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>主 査 大阪大学教授</td> <td style="text-align: center;">吉川 秀樹</td> </tr> <tr> <td>副 査 大阪大学寄附講座教授</td> <td style="text-align: center;">菊本 一厚</td> </tr> <tr> <td>副 査 大阪大学教授</td> <td style="text-align: center;">中田 石利</td> </tr> </tbody> </table>	(職)	氏 名	主 査 大阪大学教授	吉川 秀樹	副 査 大阪大学寄附講座教授	菊本 一厚	副 査 大阪大学教授	中田 石利
(職)	氏 名								
主 査 大阪大学教授	吉川 秀樹								
副 査 大阪大学寄附講座教授	菊本 一厚								
副 査 大阪大学教授	中田 石利								
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>申請者らは新規細胞治療システムとしてtissue engineered construct (TEC)を開発し、椎間板再生に応用した。TECは間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells: MSC) およびMSC自身が産生する細胞外マトリックスによって構成されるスキャフォールドフリーの三次元人工組織である。本研究では、臨床応用に有利な脂肪由来間葉系幹細胞 (adipose-derived mesenchymal stem cells: ADSC) より作成したTEC (ADSC-TEC) を椎間板内に移植することで構造的・機能的な椎間板再生能を検討した。ADSC-TECの椎間板移植は、ADSCが発揮する栄養作用による周囲組織の活性化とADSC-TEC中の細胞外マトリックスによる衝撃緩衝作用により、椎間板機能に大きく影響する椎間板高、線維輪および終板構造の温存効果を示した。それだけでなく、移植により機能的に再生された椎間板は正常椎間板と類似した力学特性を示し、加齢変化を抑制した。本研究の応用により、椎間板機能・構造の破綻に伴う種々の疾患に対する新規治療となる可能性が示された。本研究の椎間板再生医療への貢献は大きく、学位の授与に値すると考えられる。</p>									

論 文 内 容 の 要 旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	石黒 博之
論文題名 Title	Intervertebral disc regeneration with an adipose mesenchymal stem cell-derived tissue-engineered construct in a rat nucleotomy model (ラット髄核摘出モデルを用いた脂肪由来間葉系幹細胞由来の三次元人工組織による椎間板再生)
論文内容の要旨	
<p>〔目的(Purpose)〕</p> <p>我々は新規細胞治療システムとしてtissue-engineered construct (TEC)を開発した。TECは間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells: MSC) およびMSC自身が産生する細胞外マトリックスによって構成されるスキャフォールドフリー三次元人工組織であり、アスコルビン酸を添加した培養液にてMSCを高密度培養することで作成される。これまでに、滑膜由来MSCより作成したTECによる関節軟骨や膝半月板などの修復効果が報告されてきた。本研究の目的は、より臨床応用に有利と考えられる脂肪由来MSC (adipose-derived MSC: ADSC) より作成したTEC (ADSC-TEC) の椎間板再生能を検討することである。</p> <p>〔方法(Methods)〕</p> <p>6週齢GFP導入SDラットよりADSCを単離し、骨・軟骨・脂肪への3系統分化能および表面マーカーを確認後、ADSC-TECを作製した。ADSC-TEC培養上清を添加した培養液にてSDラット尾椎椎間板線維輪細胞を培養し、細胞増殖および細胞外マトリックス関連遺伝子 (COL1A1, COL2A1, Aggrecan) 発現への影響を評価した。10週齢SDラットの尾椎椎間板に対し、sham群 (n=15), 髄核摘出群 (n=15), 摘出髄核再移植群 (n=16), ADSC-TEC移植群 (n=27) の4群に分け介入を行った。術後6週で、軟X線によるdisc height index (DHI)の評価、μCTによる終板変性スコアの評価を実施し、組織学的評価 (H&E, Safranin O), 抗GFP抗体免疫染色による移植細胞の生存評価を行った。また、正弦波形振動負荷装置を用いた力学試験による動的粘弾性評価を行った。ADSC-TEC移植の長期的有効性を評価するため、ADSC-TEC移植群のうち11匹は術後6カ月で同様の評価を行い、同等週齢 (8カ月齢) の正常SDラット尾椎椎間板と比較した。</p> <p>〔成績(Results)〕</p> <p>ADSC-TEC培養上清の添加により、線維輪細胞の増殖能は有意に上昇し ($p < 0.05$), COL1A1, Aggrecanの発現も有意に上昇した ($p < 0.05$)。手術後6週では、DHIは髄核摘出群 (0.0 ± 0.0), 再移植群 (1.0 ± 1.8), TEC群 (5.1 ± 2.0), sham群 (7.7 ± 1.5) であり、TEC群において髄核摘出群および再移植群より有意に高値であった ($p < 0.0083$)。 μCTによる終板変性スコアは髄核摘出群 (0.0 ± 0.0), 再移植群 (0.6 ± 1.1), TEC群 (2.0 ± 0.4), sham群 (3.0 ± 0.0) であり、TEC群において髄核摘出群および再移植群より有意に終板変性が抑制された ($p < 0.0083$)。組織学的評価ではTEC群で外側線維輪の層状構造の温存と内側線維輪の増殖、細胞外マトリックスによる椎間板高の保持、終板形態の温存を確認した。免疫化学染色ではGFP発現細胞は認められなかった。力学試験では、TEC群は髄核摘出群および髄核再移植群と比較し、Sham群に類似した粘弾性特性を示した。一方、手術後6カ月のTEC群ではDHIおよび終板変性スコアはそれぞれ 4.7 ± 0.9 および 1.9 ± 0.7 であり、術後6週のTEC群と比較し有意差を認めなかった。組織学的評価では、線維輪構造や終板形態は温存されていた。力学試験では、移植後の椎間板は6カ月の間粘弾性特性を維持し、8カ月齢の正常ラット椎間板に認める加齢変性に伴う機能低下を抑制した。</p> <p>〔総括(Conclusion)〕</p> <p>ADSC-TECの椎間板移植は、栄養作用による周囲組織の活性化と細胞外マトリックスによる衝撃緩衝作用により、椎間板機能に大きく影響する椎間板高、線維輪および終板構造の温存効果を示した。移植により機能的に再生された椎間板は正常椎間板と類似した力学特性を示し、加齢変化を抑制した。本研究の応用により、椎間板機能・構造の破綻に伴う種々の疾患に対する新規治療となる可能性が示された。</p>	