

WS3-02

由来組織の異なる間葉幹細胞の軟骨分化過程

市野瀬 志津子¹, 田上 幹樹²¹東京医科歯科大学機器分析センター, ²三楽病院内科

【目的】近年、骨髄由来間葉幹細胞を用いた軟骨組織の再生が試みられている。しかし骨髄からの幹細胞の採取は患者への負担が大きいことは否めない。患者やドナーの負担を軽くする意味でも、体の他の組織からの間葉幹細胞の代替や、少量の間葉幹細胞を効率よく利用する方法の確立が急務である。本研究は、由来組織の異なる間葉幹細胞の軟骨分化能および軟骨再生能の違いを調べ、さまざまな組織由来間葉幹細胞の再生医療への道を探ることを目的としている。

【材料と方法】ヒト骨髄由来、滑膜由来および軟骨由来の間葉幹細胞を採取、増殖させ、トリプシン溶液により遊離し、10 ng/ml TGFβ3 および 500 ng/ml の BMP2 を含む軟骨分化培地中で 0～21 日間高密度培養を行った。由来組織の異なる間葉幹細胞の軟骨分化能および軟骨再生能の違いについては、培養 0 日、1 日、7 日、14 日、21 日の軟骨分化過程を顕微鏡および顕微鏡で観察し、collagen type I、II、X および proteoglycan を認識する抗体を用いた免疫組織化学により検討した。

【結果】培養 1 日で幹細胞は凝集し、凝集塊を形成した。凝集能は骨髄由来幹細胞で最も高く、滑膜由来、軟骨由来幹細胞の順であった。培養 7 日で凝集塊の表層部は線維芽細胞様細胞層で被われ、凝集塊内部は軟骨細胞様細胞層に分化した。線維芽細胞様細胞層の厚さに由来組織による違いがみられ、滑膜由来幹細胞で最も厚く、軟骨由来幹細胞でわずかであった。培養 21 日で凝集塊内部の軟骨細胞様細胞は collagen type II と proteoglycan から成る軟骨マトリックスを生成したが、生成領域および生成量に由来組織による違いが認められた。滑膜由来間葉幹細胞は軟骨マトリックスの生成量も豊富で優れた軟骨分化能を有し、臨床応用が期待される。

WS3-03

メカニカルストレスと成長因子が 3 次元培養下関節軟骨細胞に及ぼす影響

安藤 厚生, 今井 晋二, 三村 朋大, 松末 吉隆

滋賀医科大学整形外科科学講座

【目的】メカニカルストレスや成長因子による刺激により関節軟骨細胞の基質産生が促進されることは既によく知られている。今回我々は、脱分化した関節軟骨細胞を効率よく再分化させるためにメカニカルストレスと成長因子を併用した 3 次元培養を行い、その細胞分化能の経時的変化について調べた。

【方法】ラットの関節軟骨細胞を単層培養後、コラーゲンゲル内に包埋してメカニカルストレスと成長因子を加えて 3 次元培養を行った。培養期間は 1～5 日間の 5 群に分けた。成長因子は basic fibroblast growth factor (bFGF) 100 ng/ml を使用した。メカニカルストレスは各培養期間中 1 日 1 回負荷し、その条件は、周期性圧縮、周期 0.33 Hz、圧縮率 5%、1 回負荷あたり 60 分間とした。メカニカルストレス無負荷を対照群とした。評価はリアルタイム PCR にて行い、追跡遺伝子は Type II collagen, Aggrecan, 内部標準は GAPDH を使用した。

【結果】Aggrecan 発現量は、対照群に対して 60 分/日群の方が有意に高かったが、両者とも培養 2 日目から急激な低下を認めた。Type II collagen 発現量は、メカニカルストレスの有無に関わらず、培養 3 日目から有意に急激な低下を認めた。

【考察】臨床応用に耐え得る関節軟骨組織へと再生するには、その形質を維持しつつ十分な細胞数を確保する必要がある。単層培養で脱分化した関節軟骨細胞を、コラーゲンゲルを用いた 3 次元培養に成長因子とメカニカルストレスによる刺激を加えることで、ある程度の再分化を果たした。一旦脱分化した細胞を基質産生段階まで再分化させる有用な細胞刺激方法であったが、臨床応用を目指すには今後更なる至適条件の追求が必要である。