

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580465

研究課題名(和文) 犬の骨髄間質細胞を用いた軟骨再生医療の確立

研究課題名(英文) Establishment of cartilage regenerative medicine using canine bone marrow stromal cells

研究代表者

枝村 一弥 (EDAMURA, Kazuya)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：80366624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨髄間質細胞を用いた軟骨再生医療を行うことにより変形性関節症の根治を目指した研究を行った。犬の骨髄間質細胞は、軟骨分化誘導培地を用いて軟骨様組織へと分化することができた。また、無血清培地を用いて犬の骨髄間質細胞を増殖させ軟骨への分化誘導を試みたところ、従来の分化培地よりも増殖能は優れていたものの、軟骨分化能に関しては議論の余地が残った。軟骨細胞の定着に適した足場基材について検討したところ、犬の培養軟骨の素材として、メビオールジェルが最も有用である可能性が示唆された。最終的に、犬で軟骨再生医療を実現化するために、非侵襲的で最適な関節鏡視鏡手技を確立し、臨床応用の礎を築いた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to establish a radical therapy of osteoarthritis by the cartilage regeneration medicine using bone marrow stromal cells (BMSCs) in dogs. Canine BMSCs could differentiated into cartilage-like structure using chondrogenic differentiation medium. The proliferative capacity of canine BMSCs that were cultured with serum-free medium was superior to that with conventional medium. However, chondrogenic potency of canine BMSCs that were cultured with serum-free medium was controversial. In this study, the mebiol gel was most suitable scaffold for canine artificial cultured cartilage. Finally, minimum invasive and optimal arthroscopic procedures for cartilage regeneration medicine could be established. These all results can contribute to the clinical application of cartilage regeneration medicine in dogs.

研究分野：獣医外科学

キーワード：再生医療 犬 軟骨 骨髄間質細胞 変形性関節症 幹細胞 動物

1. 研究開始当初の背景

(1) 動物医療の発展に伴い動物の高齢化が進み、加齢に伴って生じる変形性関節症の症例数は年々増加している。変形性関節症は、犬で最も多く遭遇する整形外科疾患で、特に盲動犬や聴動犬として使用されているラブラドル・レトリバー犬では約4頭に1頭が発症しているということも指摘されており、社会問題になっている。変形性関節症の動物では、関節への衝撃を吸収する軟骨が傷ついて擦り減り、歩行時に慢性的な痛みを生じて、生活の質が著しく低下する。残念なことに、現在の医療技術を駆使しても損傷した関節軟骨の修復は困難であり、未だ変形性関節症の画期的な治療法は確立していないのが現状である。

(2) 成体哺乳類の軟骨は再生しないとされてきたが、最近では種々の実験系で軟骨の再生がヒト、ウサギ、マウスを中心に確認され始めている。1990年代から、軟骨を再生させる目的で、自己軟骨細胞、滑膜細胞、脂肪細胞、骨髄間質細胞、ES細胞およびiPS細胞を利用した研究が行われている。しかし、いずれの細胞を用いても正常軟骨である硝子軟骨の再生は困難で、未だ臨床応用されていないのが現状である。

(3) 犬のES細胞やiPS細胞は既に樹立されているが、移植後の奇形腫の制御、培養の費用が高価であるといった問題から臨床応用のツールとしては程遠い。自己軟骨細胞による再生が理想的であるが、採取できる細胞数に限りがあり、さらに健全な軟骨を傷つけないとはならないという問題点もある。

(4) このような背景から、研究代表者は採取および分離が容易な骨髄間質細胞が犬における最も現実的な軟骨再生のための細胞源であると考え、犬の骨髄間質細胞の培養法を確立してきた。さらに、犬の骨髄間質細胞の多分化能も確認しており、実際の脊髄損傷の犬に骨髄間質細胞を移植し、すでに同細胞の臨床応用を行っている。

(5) 研究代表者の所属する研究室は、国内外における犬の骨髄間質細胞の研究拠点のひとつとなっており、骨髄間質細胞を用いた軟骨再生医療の実現化を目指した研究体制が十分に整っている。これらの技術を利用し、変形性関節症に患った犬における関節軟骨再生医療の確立を目指した。

2. 研究の目的

本研究は、犬の骨髄間質細胞から完全な関節軟骨である硝子軟骨を再生し、変形性関節症の動物の根治を最終目標とした極めて臨床的で実際的な研究である。また、獣医学領域においては世界でも極めて貴重な自己の骨髄間質細胞を用いた軟骨再生医療の臨床

応用に向けた研究であり、本研究が実用化された際には関節疾患を患った多くの動物の生活の質を向上させることができるだけでなく、ヒトの二大関節疾患である変形性関節症と関節リウマチへの臨床応用に向けた基礎データとしても有用性が高い。

3. 研究の方法

(1) 临床上健康と認められた雄のビーグル犬を用いて、全身麻酔下にて上腕骨から約2mlの骨髄を採取した。それから、Histopaque-1077を用いて単核系細胞を分離、回収した。次いで、10%牛胎子血清(FBS)を含む α -MEM培地を用いて5%CO₂、37℃の条件下で25cm²培養フラスコに静置培養して骨髄間質細胞を純化した。骨髄間質細胞を3回継代後に、Dexamethazone、TGF- β 3、ascorbate-2-phosphate、L-proline、pyruvate、ITS-Premyxを含むhigh-Glucose DMEM培地を用いた軟骨分化誘導培地にてペレット培養した。培養3週後に、形成された細胞塊をホルマリン固定し、トルイジン青染色を行った。

(2) 全身麻酔下にてビーグル犬の上腕骨から骨髄を抜去し、当研究室で確立した方法に基づいて骨髄間質細胞を分離した。滑膜と膝蓋下脂肪体を、膝関節切開術にて採材した。滑膜をコラゲナーゼDで処理した後に濾過および洗浄を行い、静置培養を行うことで滑膜由来間質細胞を分離した。膝蓋下脂肪体をコラゲナーゼ型で処理した後に濾過および遠心し、その上清を天井培養することにより脱分化脂肪細胞を、沈渣を静置培養することにより脂肪組織間質細胞を分離した。これらの細胞を10%FBSを含む α -MEMを用いて10日間培養した。培養10日目に各々の細胞をTrypsin-EDTAにて回収し、細胞数を算出した。次いで、各々の細胞の軟骨分化能を検討する目的で、Dexamethazone、TGF- β 3、ascorbate-2-phosphate、L-proline、pyruvate、ITS-Premyxを含むhigh-Glucose DMEMを用いてペレット培養を行った。培養21日目に、形成された細胞塊をホルマリン固定し、トルイジン青染色にて組織学的に検討を行った。

(3) 全身麻酔下でビーグル犬の上腕骨から骨髄液を抜去し、比重遠心分離した後に単核球を分離した。この時に得られた単核球を、従来から使用されてきた10%FBS添加 α MEMで培養した群(従来群)と無血清培地を用いて培養した群(無血清群)の2群に分け検討を行った。無血清培地としては、初代培養時にSTK1[®](DSファーマ)、継代後の増殖培地にはSTK2[®](DSファーマ)を用いた。両群ともに、培養3、5、7、10、14日目に細胞の形態の観察および細胞数の計測を行った。犬骨髄間質細胞を継代後に1.0×10⁵/皿となるように播種し、初代培養時と同様の検討を行った。さらに、第3継代目の犬BMSCsをペレット培養にて軟骨へと分化誘導した。軟骨へ

の分化誘導には、Dexamethasone、L-Ascorbic acid 2-phosphate、Pyruvate、Linoleic acid、ITS-G、hTGF- β 3 を含む α MEM を用いた。軟骨へと分化誘導後、細胞塊の形態を経時的に観察し、分化誘導 28 日後に細胞塊の大きさを計測した。得られた細胞塊を病理組織学的検査に供し、トルイジン青染色を行って異調性を確認した。さらに、それらの細胞塊から total RNA を抽出し、軟骨マーカーである collagen、SOX9、aggrecan の mRNA 発現量を real time PCR 法にて計測した。

(4) 当研究室において既に確立した方法で犬骨髄間質細胞を分離および培養した。軟骨への分化を目的に、犬骨髄間質細胞を遠心し、ペレット静置培養したものを対照群とした。さらに、低抗原性のアテロコラーゲンゲル(株式会社高研製:AC群)、生物由来材料を含まないメビオールジェル(メビオール株式会社製:MB群)、ゼラチンとMBを混合させたMB+RM-Gelatin100(ゼラリス株式会社製:M-G群)の3つのscaffoldを採用し、犬骨髄間質細胞をゲル内培養し軟骨への分化能を比較検討した。軟骨分化培地には、Dexamethasone、TGF- β 3、Ascorbic Acid、L-Proline、Pyruvate、ITS-Premyx を添加したHigh-DMEM培地を用いた。軟骨への分化は3週間行い、その期間中は形態の変化を肉眼的に観察し、さらに位相差顕微鏡にて細胞の定着を週2回確認した。培養終了後、全検体を10%緩衝ホルマリン液で固定し、組織の形態と軟骨の存在を確認する目的で、HE染色とトルイジン青染色を行った。

(5) 犬の変形性膝関節症モデルにおける軟骨再生能を関節鏡視下で評価する方法を検討した。関節鏡検査は、人医学領域ではよく行われる手法であるが、わが国の獣医学領域では未だ確立された方法とは言い難い。そのため、膝関節の軟骨全層欠損モデルを用い、理想的な関節内手術器具の操作用の孔の部位を検討した。

4. 研究成果

(1) 犬の骨髄間質細胞を軟骨分化誘導培地にてペレット培養したところ、培養3日以内には白色で球形の細胞塊が得られた。その大きさは、その後変化しなかった。得られた細胞塊の大きさは、 $262.8 \pm 61.0 \mu\text{m}$ であった。培養3週後に、形成された細胞塊をホルマリン固定し、トルイジン青染色を行ったところ、全ての細胞塊においてメタクロマジーを示した。これらの結果から、犬骨髄間質細胞が軟骨へと分化する能力を有している可能性が示唆された。

(2) 骨髄間質細胞群では、培養翌日から接着細胞が出現し始め、線維芽細胞様の形態を呈しながら比較的均一に増殖していった。滑膜由来間質細胞群と脂肪組織間質細胞群に

おいても、骨髄間質細胞群とほぼ同様の時期から接着細胞が出現し始め、線維芽細胞様の形態を呈しながら増殖していった。脱分化脂肪細胞群においては、培養翌日から浮遊していた球形細胞が培養フラスコの天井へと付着し、次第に球形から線維芽細胞様の形態へと変化していった。培養4日目の培養液交換時に培養フラスコを上下反転させ培養を行ったところ、他群と同様の形態を呈しながら増殖していった。培養10日後に得られた細胞数は、脂肪組織間質細胞群が最も多い傾向が認められた。これらの細胞をペレット培養にて軟骨へと分化誘導したところ、骨髄間質細胞群と滑膜由来間質細胞群の50%、脱分化脂肪細胞群と脂肪組織間質細胞群の83%で白色の球形細胞塊を形成した。これらの中で、脂肪組織間質細胞群の軟骨様細胞塊が最も大きい傾向が認められた。培養21日目に軟骨様細胞塊のトルイジン青染色したところ、これらの一部にて異染色性を示したが、本来の軟骨の染色性とは異なっていた。これらの結果から、犬の軟骨再生のための幹細胞として脂肪組織間質細胞が最も優れている可能性が示唆されたものの、検討の余地が残された。本研究は、The 21st ECVS Annual Scientific Meeting(第21回欧州獣医外科学会)で発表し、Best Poster Presentation Awardを獲得した。また、当検討の実績より、韓国・建国大学(Konkuk University)医生命科学研究院の李禎翼准教授と研究提携であるMOUを締結し、国際交流を進展させた。

(3) 骨髄から得られた単核細胞を培養し倒立顕微鏡で観察したところ、従来群においては線維芽細胞様の形態を呈しながら比較的均一に増殖していった。一方で、無血清群では従来群と比べて細胞は小さく球形を帯び、コロニー状の形態を呈しながら増殖していった。無血清群において、STK1[®]を用いて初代培養を行ったところ、犬骨髄間質細胞はより早期に接着する傾向があり、培養3日目には従来群よりも多い細胞数が得られた。また、無血清群は従来群に比べて増殖能が優れており、培養14日目には従来群の約3倍の細胞数が得られた。この傾向は、STK2[®]を用いた第1継代細胞の培養時にも同様の傾向が認められた。犬骨髄間質細胞をペレット培養して軟骨へと分化誘導したところ、両群ともに分化誘導4日目には白色で球形の細胞塊を形成した。無血清群における分化誘導28日後に得られた細胞塊の大きさは $741.0 \pm 132.5 \mu\text{m}$ であった。得られた細胞塊をトルイジン青染色したところ、一部において異調性を示した。本研究では、得られた細胞塊において、collagen、SOX9、aggrecanといった軟骨マーカーのmRNAの一部で発現が認められた。本研究では、無血清培地であるSTK1[®]とSTK2[®]を用いて検討したところ、犬骨髄間質細胞の培養は可能で、さらに従来培地に比べて増殖能も優れていた。過去の研究では、

培養液に血清が 5%以下しか含まれない場合には犬骨髄間質細胞の培養が困難であったことから、本検討で用いた無血清培地は犬骨髄間質細胞の初代培養および増殖に有用であることが示された。無血清培地で培養した犬骨髄間質細胞を軟骨へと分化誘導したところ、白い球形の細胞塊を形成し、トルイジン青染色で異調性を示した。しかし、軟骨マーカーの mRNA 発現は一部しか認められなかったことから、硝子軟骨を置換する再生医療に応用するためには、さらなる検討が必要であることが示唆された。本検討は、株式会社ツーセルや帝京大学整形外科とも共同で行った。

(4) 対照群では、全例で沈殿した骨髄間質細胞が球形の白色の細胞塊になった。細胞塊の形態は、経時的にやや縮小しながら楕円形へとなっていった。AC 群では、ゲルが白色化し、ドーム状で円滑な形態で固形化された。MB 群では、ゲルがやや白色化した。完全に固形化されず一部流動的であった。M-G 群では、培養 4 日目までに白色のゲルが確認できたが、その後は経時的に崩壊していった。MB 群と M-G 群のみで、位相差顕微鏡にて細胞を含む微小形態の観察が可能で、培養期間を通じ細胞の定着が確認された。培養終了時に得られた軟骨様物質は AC 群が最も大きく、次いで MB 群、対照群、M-G 群であった。対照群では、得られた細胞塊は HE 染色において細胞が確認され、トルイジン青染色にて異染性が認められた。AC 群では、トルイジン青染色で一部染色されたが、残念ながら HE 染色では細胞を確認することができなかった。MB 群では、HE 染色において細胞を確認し、トルイジン青染色で一部異染性を認めた。MB 群が最も本来の軟骨組織に近い形態であった。M-G 群では、組織学的検索は困難であった。対照群と MB 群では、細胞の生存が確認され、トルイジン青染色で異染性を示したことから、犬骨髄間質細胞が軟骨へと再生した可能性が示唆された。MB 群は、組織学的に最も軟骨に近い形態を得ることができたことから、最も軟骨再生に適した scaffold である可能性が示された。しかし、肉眼的な形状や硬さは本来の軟骨に程遠く、臨床応用するにはいくつかの点を改良する必要性が感じられた。AC 群では、人で臨床応用されている 3%にゲル濃度を設定したが、残念なことに犬では骨髄間質細胞の生存に適していなかった。今後は、さらに長期間培養するなど各種 scaffold の検討を重ねることで、犬においても軟骨再生医療は現実的な選択肢になりえると確信した。

(5) 全身麻酔下で膝関節の関節鏡検査を行い、理想的な軟骨欠損の作成部位や操作孔の作成部位、そして記録方法を確立した。さらに、超音波検査や MRI 検査 (T1WI、T2、T2WI、STIR) も同時に行い、これらの撮像条件の検討

も行うことで、より良い臨床的な再生軟骨の評価法を確立した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Rei Nakano, Kazuya Edamura, Tomohiro Nakayama, Kenji Teshima, Kazushi Asano, Takanori Narita, Ken Okabayashi, Hiroshi Sugiyama. Differentiation of canine bone marrow stromal cells into voltage- and glutamate-responsive neuron-like cells by basic fibroblast growth factor. *J. Vet. Med. Sci.* 査読有, 77(1), 2015, pp. 27-35. DOI: 10.1292/jvms.14-0284.

Kazuya Edamura, Rei Nakano, Kyohei Fujimoto, Kenji Teshima, Kazushi Asano, Shigeo Tanaka. Effects of Cryopreservation on the Cell Viability, Proliferative Capacity, and Neuronal Differentiation Potential of Canine Bone Marrow Stromal Cells. *J. Vet. Med. Sci.* 査読有, 76(4), 2014, pp. 573-577. DOI: 10.1292/jvms.13-0296.

Rei NAKANO, Kazuya EDAMURA, Hiroshi SUGIYA, Takanori NARITA, Ken OKABAYASHI, Tadaaki MORITOMO, Kenji TESHIMA, Kazushi ASANO, Tomohiro NAKAYAMA, Evaluation of mRNA expression levels and electrophysiological function of neuron-like cells derived from canine bone marrow stromal cells, *American Journal of Veterinary Research*, 査読有, 74(10), 2013, pp. 1311-1320. DOI: 10.2460/ajvr.74.10.1311.

[学会発表] (計 20 件)

枝村一弥, 獣医領域における再生医療および細胞療法のガイドライン策定について, 日本獣医再生医療学会第 10 回記念年次大会 (2015/3/21-22, 国際ファッションセンタービル, 墨田区, 東京)

Kazuya Edamura, Strategy for spinal regenerative therapy in dogs with severe spinal injury, The 4th Asian Meeting of Veterinary Surgery (2014/12/6-7, 大阪国際交流センター, 大阪市, 大阪)

枝村一弥, 関節鏡ガイドライン - 総論・肩関節 -, 第 16 回日本臨床獣医学フォーラム年次大会 2014 (2014/9/26-28, ホテルニューオータニ, 千代田区, 東京)

枝村一弥, 日本獣医再生・細胞療法学会 - ガイドライン策定について -, 日本獣医再生・細胞療法学会 (2014/9/11, 北海道大学, 札幌市, 北海道)

中野令、枝村一弥、中山智宏、北中卓、手島健次、浅野和之、岡林堅、成田貴則、杉谷博士、FGFR-2/PI-3 キナーゼ/Akt/GSK3β/カテニン経路のイヌ骨髄間質細胞におけるニューロン分化への関与、第 157 回日本獣医学会(2014/9/9-12、北海道大学、札幌市、北海道)

中野令、枝村一弥、中山智宏、北中卓、岡林堅、成田貴則、杉谷博士、イヌ皮膚線維芽細胞におけるプラジキニンによる Ca²⁺非依存性 nPKC/MEK/ERK シグナリング経路を介した COX-2 の発現、第 52 回日本大学獣医学会(2014/6/29、日本大学生物資源科学部、藤沢市、神奈川県)

Rei NAKANO, Kazuya EDAMURA, Taku Kitanaka, Takanori NARITA, Ken Okabayashi, Hiroshi SUGIYA, Involvement of FGFR-2/PI3-kinase/GSK3-beta signaling pathway in basic fibroblast growth factor-induced neuronal differentiation of canine bone marrow stromal cells, The International Society for Stem Cell Research 12th Annual Meeting for 2014(2014/6/18-22, Vancouver convention center, Vancouver, Canada)

中野令、枝村一弥、中山智宏、成田貴則、杉谷博士、塩基性線維芽細胞成長因子による犬骨髄間質細胞のニューロン分化、第 91 回日本生理学大会(2014/3/16-18、鹿児島大学、鹿児島市、鹿児島県)

枝村一弥、犬や猫の運動器疾患における再生医療の可能性、第 13 回日本再生医療学会(2014/3/4-6、京都国際会議場、京都市、京都)

枝村一弥、動物医療における再生医療の現状～神経疾患における再生医療を中心に～、獣医神経病学会症例検討会ショートレクチャー(2013/12/22、キャンパスプラザ、京都市、京都)

中野令、枝村一弥、中山智宏、手島健次、浅野和之、成田貴則、杉谷博士、犬骨髄間質細胞の機能を有するニューロンへの分化、第 15 回日本獣医臨床フォーラム(2013/9/27-29、赤坂ホテルニューオータニ、千代田区、東京)

中野令、枝村一弥、中山智宏、北中卓、岡林堅、成田貴則、杉谷博士、塩基性線維芽細胞成長因子による FGFR/PI3 キナーゼ/Akt 経路を介した犬骨髄間質細胞のニューロン分化メカニズム、第 156 回日本獣医学会学術集会(2013/9/20-22、岐阜大学、岐阜市、岐阜県)

中野令、枝村一弥、手島健次、浅野和之、中山智宏、岡林堅、成田貴則、杉谷博士、塩基性線維芽細胞成長因子により犬骨髄間質細胞から分化誘導されたニューロン様細胞と機能、第 156 回日本獣医学会学術集会(2013/9/20-22、岐阜大学、岐阜市、岐阜県)

中野令、枝村一弥、手島健次、浅野和之、中山智宏、岡林堅、成田貴則、杉谷博士、塩基性線維芽細胞成長因子による FGFR2/PI3 キナーゼ/Akt 経路を介した犬骨髄間質細胞からのニューロン様細胞の分化誘導、第 51 回日本大学獣医学会(2013/6/30、日本大学生物資源科学部、藤沢市、神奈川県)

枝村一弥、犬の骨髄間質細胞を用いた脊髄再生医療の現状と将来展望、第 51 回日本大学獣医学会(2013/6/30、日本大学生物資源科学部、藤沢市、神奈川県)

枝村一弥、動物医療における再生医療の現状～脊髄再生医療を中心に～、日本大学生物資源科学部藤沢市民公開講座(2013/6/29、日本大学生物資源科学部、藤沢市、神奈川県)

Rei NAKANO, Kazuya EDAMURA, Tomohiro NAKAYAMA, Takanori NARITA, Hiroshi SUGIYA. Basic fibroblast growth factor induces neuronal differentiation of canine bone marrow stromal cells via PI3-kinase. 第 65 回日本細胞生物学会(2013/6/19-21、ウインク愛知、名古屋市、愛知県)

Rei NAKANO, Kazuya EDAMURA, Kenji TESHIMA, Kazushi ASANO, Tomohiro NAKAYAMA, Takanori NARITA, Ken Okabayashi, Hiroshi SUGIYA. Basic fibroblast growth factor-induced functional neuronal differentiation of canine bone marrow stromal cells, The International Society for Stem Cell Research 11th Annual Meeting for 2013(2013/6/12-15, Boston Convention and Exhibition Center, Boston, USA)

枝村一弥、動物医療における再生医療の現状、日本学術振興会 二国間交流事業 共同研究 第 1 回 再生医療研究セミナー(2013/2/28、横浜市立大学、横浜市、神奈川県)

Kazuya Edamura, Mami Kitagawa, Rei Nakano, Kenji Teshima, Kazushi Asano. Comparison of proliferative potential and chondrogenic differentiation potency of stem

cells isolated from bone marrow, synovium,
and infrapatellar fat pad in dogs. The 21st
European College of Veterinary Surgeons
Annual Scientific Meeting. (2012/7/5-7,
Palau de Congressos de Catalunya, Barcelona,
Spain).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

枝村 一弥 (EDAMURA Kazuya)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：80366624