

機関番号：15401
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591758
 研究課題名 (和文) 変形性膝関節症に対する再生医療の確立—Wnt 刺激による軟骨再生の促進—
 研究課題名 (英文) Enhancement of cartilage differentiation of mesenchymal stem cells with Wnt protein stimulation
 研究代表者
 安達 伸生 (ADACHI NOBUO)
 広島大学・病院・准教授
 研究者番号：30294383

研究成果の概要 (和文)：運動器再生医療の移植細胞として骨髄間葉系幹細胞 (MSC) が注目されている。一方、Wnt 蛋白は軟骨分化に大きく関与していることが報告されている。本研究では MSC を三次元培養下に軟骨分化誘導する際に Wnt 蛋白を添加することにより、軟骨分化誘導が促進されるかどうか検討した。その結果、Wnt5a は MSC の軟骨分化を促進することが三次元培養系において確認された。

研究成果の概要 (英文)：Mesenchymal stem cells (MSC) have been considered as good candidate as cell source in regenerative medicine. On the other hand, it is reported that Wnt protein can affect cartilage differentiation of those cells. This study clearly demonstrated that supplementation of Wnt5a protein enhanced cartilage differentiation of MSC in three-dimensional culture system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：変形性関節症・再生医学・Wnt・関節軟骨

1. 研究開始当初の背景

変形性膝関節症は高齢者の生活の質を著しく低下させるとともに、健康寿命を短縮させる。進行した変形性関節症に対しては自家組織の温存は困難であり、人工関節置換術を施行するほか有効な手術法はない。人工膝関節のほとんどは海外からの輸入製品であり非常に高価であり、医療費増加の一因となっている。その解決のためには変形性関節症に対する自家組織を用いた軟骨再生法の確立することが急務である。

近年では、自己の細胞や組織を用いて、損傷された組織や臓器を再生させようとする再生医療の研究や臨床応用がすすんでいる。再生医療における組織構築の中心的な役割を担うのが組織工学である。組織工学の大きな三つの柱は、移植細胞、細胞増殖の足場および成長因子である。私達は移植細胞として自家軟骨細胞、細胞増殖の足場としてアテロコラーゲングエルを使用し組織工学的手法を用いた自家培養軟骨細胞移植による軟骨修復術を世界に先駆けて考案し、その臨床応用を行い、特に若年者の限局性関節軟骨損傷に対する良好な術後成績を報告してきた。

本法の大きな欠点の一つは①採取可能な自家軟骨細胞には限界があり治療可能な軟骨損傷の範囲に限界があること②高齢者の軟骨細胞の増殖能は若年者に比較し著しく低いため、高齢者に多く軟骨損傷が広範囲である変形性膝関節症に対する適応は非常に限られていることである。そこで新しい細胞源として骨髄間葉系幹細胞 (MSC) に注目した。

一方、近年、骨・軟骨の分化の制御に Wnt ファミリーが深く関与していることが注目されている。Wnt は 350~380 個のアミノ酸からなる分泌性糖タンパク質である。近年、Wnt

シグナルが幹細胞の自己複製に関与する可能性や前駆細胞から特定の細胞への分化を促進することも示唆されており、Wnt シグナルは幹細胞を用いた再生医療を確立するための大きな細胞増殖因子となる可能性がある。

2. 研究の目的

Wnt 蛋白のうち Wnt5a 蛋白に着目した。本研究の目的は MSC の三次元培養系において Wnt5a を添加することにより Wnt5a が MSC の軟骨分化に与える影響を検討することである。

3. 研究の方法

(1) MSC の採取と軟骨分化能の確認

全身麻酔下に 12 週齢日本白色家兎の大腿骨および脛骨骨髄より骨髄液 10ml を採取した。採取した骨髄液を 10%FBS および抗生物質を添加した DMEM 培地を用いて単層培養し、ディッシュに付着した細胞を骨髄間葉系幹細胞 (MSC) として回収した。

回収した MSC を引き続き単層培養にて継代したのち軟骨分化誘導を行った。具体的には、MSC 2×10^5 個を Extracel™ に包埋し、軟骨分化培地にて 37°C, 5%CO₂ インキュベーター内で 3 週間培養した。培養終了後サフラニン O 染色を行い軟骨基質の産生を確認するとともに、PCR により II 型コラーゲン、アグリカンの発現を確認した。

(2) Wnt 添加による軟骨分化能

上記三次元培養条件に Wnt5a 0.5 μ l または 1.0 μ l (0.03 μ g/ μ l) を添加し、軟骨分化能を検討した。サフラニン O 染色を行い、組織学

的に比較検討を行うとともに、Real time PCR法にて II 型コラーゲン、アグリカンの発現を解析した。

4. 研究成果

(1) MSC の採取と軟骨分化能の確認

サフラニン O 染色では、ゲル内に良好な軟骨基質を認めた。また、PCR により II 型コラーゲン、アグリカンの発現を確認し、採取した MSC は良好な軟骨分化能があることを確認した。

(2) Wnt 添加による軟骨分化能

サフラニン O 染色による組織学的検討では Wnt5a を添加した群では Wnt5a を添加しなかった群と比較して良好な軟骨基質形成を認めた (図 1)。

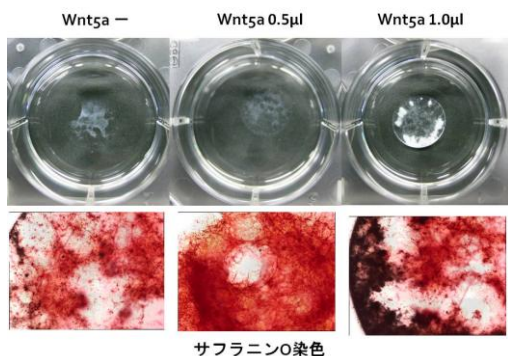
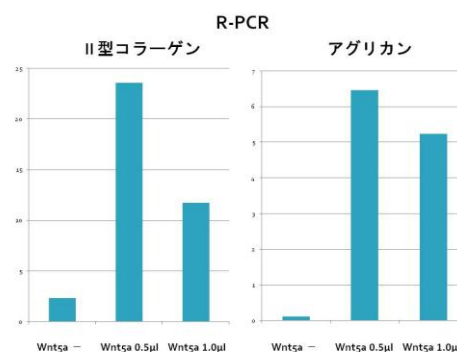


図 1

Real time PCR法における II 型コラーゲン、アグリカンの発現は Wnt5a を添加した群は、添加しなかった群と比較して約 2.0 倍の発現を認めた。しかし、Wnt5a の添加量での比較においては有意な差は認めなかった (図 2)。

図 2



本研究成果により Wnt5a は MSC の三次元培養系において軟骨分化を促進することが確認された。

MSC は①骨髄穿刺液から容易に分離・培養することができる、②自己細胞を用いるため免疫拒絶反応を避けることができる、③胚性幹 (ES) 細胞のように生殖細胞を扱わないため倫理的問題が少ない、④増殖が盛んで大量の細胞を得ることが可能であり、遺伝子操作もしやすい、などの利点を有する。組織の再生の細胞源として非常に有用であり、現在のところ最も臨床応用に近い幹細胞と考えられる。

この MSC と MSC の軟骨分化促進作用を有する Wnt 蛋白を組み合わせることにより、より良好な軟骨再生を獲得することが可能であり、変形性関節症等の難治疾患に対する再生医療応用が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安達 伸生 (ADACHI NOBUO)

広島大学・病院・准教授

研究者番号：30294383

(2) 研究分担者

越智 光夫 (OCHI MITSUO)

広島大学・病院・教授

研究者番号：70177244

(3) 連携研究者

()

研究者番号：