


研石第 335 号

(別紙様式第 3 号)

論 文 要 旨

論 文 題 目

Repair of Osteochondral Defects in Rat Knees with  
Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells  
(ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いたラット膝骨軟骨欠損の修復)

氏名 林 かおり 

## 論文要旨

<	目	的	>	関	節	軟	骨	(	硝	子	軟	骨	)	に	全	層	欠	損	を
生	じ	る	と	完	全	な	修	復	は	期	待	で	き	ず	、	負	荷	に	よ
っ	て	痛	み	や	関	節	可	動	域	制	限	を	生	じ	生	活	に	支	障
を	き	た	す	。	本	研	究	の	目	的	は	軟	骨	の	全	層	欠	損	に
対	し	て	ヒ	ト	骨	髄	間	葉	系	幹	細	胞	か	ら	分	化	し	た	硝
子	様	軟	骨	を	含	む	ペ	レ	ット	を	移	植	し	、	そ	の	効	果	
を	明	ら	か	に	す	る	こ	と	で	あ	る	。	骨	髄	間	葉	系	幹	細
胞	は	多	分	化	能	を	も	つ	。	は	じ	め	に	硝	子	様	軟	骨	を
含	む	ペ	レ	ット	を	作	成	す	る	た	め	に	最	適	な	TGF-beta1			
濃	度	を	決	定	し	、	そ	の	条	件	で	分	化	し	た	ペ	レ	ット	
を	骨	軟	骨	欠	損	部	に	移	植	し	た	。							
<	材	料	と	方	法	>	ヒ	ト	の	骨	髄	か	ら	得	ら	れ	た	間	葉
系	幹	細	胞	を	異	な	る	濃	度	の	TGF-beta1	(	0	、	10	、	20		
ng/ml	)	と	FBS	の	有	無	に	よ	り	6	群	に	わ	け	2	週	間	培	
養	し	ペ	レ	ット	を	作	成	し	た	。	プ	ロ	テ	オ	グ	リ	カ	ン	
産	生	を	確	認	す	る	た	め	に	そ	れ	ぞ	れ	サ	フ	ラ	ニ	ン	0
染	色	を	行	っ	た	。	ペ	レ	ット	の	最	適	条	件	を	決	定	し	
た	上	で	ラ	ット	(	athymic	nude	rat	)	の	膝	に	全	層	の	骨	軟		
骨	欠	損	を	作	成	し	、	そ	こ	に	ペ	レ	ット	を	移	植	し	フ	
イ	ブ	リ	ン	糊	で	被	っ	た	群	(	ペ	レ	ット	群	)	と	ペ	レ	

(20×20)

\*要旨は3枚(1200字以内)にまとめること。

## 論文要旨

ラットは移植せず	に	フィブリン糊のみ	で	被った
群(対照群)	に	分けた。	術後	4、8、16、24
週	に	欠損部表層の肉眼所見の比較、トルイジンブルー染色とMankin's scoreによる組織学的評価		
を行い、	さらに	術後	2、8、16週	に移植した
ヒト細胞の染色体を	FISH	で	確認	した。
<結果>	TGF-beta1	濃度が	10ng/ml	でFBS無添加の培地で培養したペレットが組織学的に硝子様軟骨を呈し、形態とプロテオグリカン産生が最も良好であった。ラット膝の肉眼所見は、ペレット群では8週で表層も滑らかで周囲と一体化しており、24週でも光沢や硬度も周囲軟骨とほぼ同一であった。対照群では8週で表層は粗で周囲軟骨との境界も明瞭であり、また16、24週でも表層は不整のまま陥凹を呈していた。トルイジンブルー染色では、ペレット群は4週でペレットの厚みを保ったまま表層は軟骨細胞で被われ、8、16週では移植部の厚みはしだいに薄くなり軟骨下骨に置き換わっていた。24週でも表層は周囲の正常軟骨

(20×20)

\*要旨は3枚(1200字以内)にまとめること。

## 論文要旨

と	同	じ	厚	み	を	保	っ	た	硝	子	様	軟	骨	で	被	わ	れ	て	い
た	。	対	照	群	で	は	4	、	8	週	で	表	層	は	線	維	組	織	で
被	わ	れ	軟	骨	細	胞	を	認	め	な	か	っ	た	。	16	、	24	週	で
は	表	層	は	線	維	組	織	で	被	わ	れ	、	深	層	に	の	み	軟	骨
細	胞	が	見	ら	れ	る	よ	う	に	な	っ	た	。	Mankin's score	を	用			
い	た	組	織	学	的	評	価	で	は	、	週	ご	と	の	明	ら	か	な	差
は	認	め	ら	れ	な	か	っ	た	が	、	24	週	に	お	い	て	は	ペ	レ
ット	群	の	組	織	形	態	は	有	意	に	良	好	で	あ	っ	た	。		
FISH	で	は	移	植	し	た	ヒ	ト	細	胞	は	経	過	と	共	に	減	少	
し	た	が	、	8	週	目	ま	で	ラ	ット	膝	の	欠	損	部	に	残	存	
し	て	い	た	。															
<	考	察	>	ヒ	ト	間	葉	系	幹	細	胞	か	ら	分	化	し	た	軟	骨
細	胞	を	含	む	ペ	レ	ット	を	全	層	の	骨	軟	骨	欠	損	部	に	
移	植	す	る	と	、	肉	眼	所	見	で	欠	損	部	の	表	層	は	正	常
に	近	い	状	態	に	ま	で	回	復	し	、	組	織	学	的	に	も	表	層
に	軟	骨	細	胞	を	認	め	軟	骨	構	造	が	維	持	さ	れ	て	い	た
こ	と	か	ら	、	間	葉	系	幹	細	胞	か	ら	分	化	し	た	軟	骨	細
胞	は	骨	軟	骨	欠	損	の	修	復	に	有	用	と	考	え	ら	れ	た	。
移	植	軟	骨	細	胞	が	消	失	し	て	も	軟	骨	構	造	が	維	持	さ
れ	た	過	程	に	つ	い	て	今	後	検	討	が	必	要	で	あ	る	。	

(20×20)

\*要旨は3枚(1200字以内)にまとめること。

平成21年3月9日

(別紙様式第7号)

論文審査結果の要旨

報告番号	* 課程博 論文博	第335号	氏名	林 かおり
論文審査委員	審査日	平成 21年 3月 9日		
	主査教授	高山 千利 (印)		
	副査教授	竹川 元 (印)		
	副査教授	國吉 幸男 (印)		

(論文題目)

Repair of Osteochondral Defects in Rat Knees with  
Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells

(骨髄間葉系幹細胞を用いたラット膝の骨軟骨欠損部の修復)

(論文審査結果の要旨)

上記論文に関して、研究に至る背景と目的、研究内容、研究成果の意義と  
学術的水準について慎重かつ公正に検討し、以下の審査結果を得た。

1. 研究に至る背景と目的

スポーツなどの外傷によって関節軟骨（硝子軟骨）に全層欠損を生じると完全な  
修復は期待できず、荷重や運動により痛みや関節可動域制限を生じ、日常生活に支  
障をきたす。本研究の目的は、ヌードラット膝軟骨に作成した骨軟骨欠損部に、多  
分化能をもつヒト骨髄間葉系幹細胞から分化させた硝子様軟骨を含むペレットを移  
植し、その効果を明らかにすることである。

2. 研究内容

・ヒト間葉系幹細胞を硝子様軟骨に分化させる至適条件：ヒト骨髄から得られた間  
葉系幹細胞を異なる濃度の TGF- $\beta$  1 (0, 10, 20 ng/ml) と FBS の有無で 6 群にわけて  
ペレット培養し、TGF- $\beta$  1 (10 ng/ml) で FBS 無添加の培地で培養したペレットが組  
織学的に硝子様軟骨を呈し、形態とプロテオグリカン産生が最も良好であった。

・ペレット移植：ヌードラット膝に直径 1.5 mmの骨軟骨欠損部を作成し、ペレット移植をせずフィブリン糊で被った群（コントロール群）と至適条件で培養したペレットを移植しフィブリン糊で被った群（ペレット群）に分けた。術後 4、8、16、24 週に、欠損部表層の肉眼所見を比較し、トルイジンブルー染色、Mankin スコアによる組織学的評価を行い、さらに術後 2、8、16 週に移植したヒト細胞の染色体を FISH(fluorescence in situ hybridization)で確認した。ラット膝の肉眼所見は、ペレット群では 8 週で表層も滑らかで周囲と一体化しており、24 週で光沢や硬度も周囲軟骨とほぼ同一であった。コントロール群では 8 週で表層は粗で周囲軟骨との境界も明瞭であり、16、24 週で表層は不整のまま陥凹を呈していた。組織学的所見ではペレット群は 4 週でペレットの厚みを保ったまま表層は軟骨細胞で被われ、8、16 週で移植部の厚みはしだいに薄くなり軟骨下骨に置き換わり、24 週でも表層は周囲の正常軟骨と同じ厚みを保った硝子様軟骨で被われていた。コントロール群では 4、8 週で表層は線維組織で被われ軟骨細胞を認めなかった。16、24 週でも表層は線維組織で深層にのみ軟骨細胞が見られた。Mankin スコアでは、24 週でペレット群の組織形態はコントロール群に比べて有意に良好であった。FISH では移植したヒト細胞は 8 週目までラット膝の欠損部に残存していた。

### 3. 研究成果の意義と学術的水準

本研究はヒト間葉系幹細胞を用いた研究であり、間葉系幹細胞から分化した硝子様軟骨が骨軟骨欠損の修復に有用であることが示唆されたことは、軟骨再生医療における重要な基礎的研究であり、その学術的意義は高いと考えられる。

以上より、本論文は学位授与に十分に値すると判断した。

備考 1 用紙の規格は、A4とし縦にして左横書きとすること。

2 要旨は800字～1200字以内にまとめること。

3 \*印は記入しないこと。