



In Vitro Multipotentiality and Characterization of Human Unfractured Traumatic Hemarthrosis-Derived Progenitor Cells: A Potential Cell Source for Tissue Repair

李, 相亮

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2007-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3816

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003816>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 1 1 7 】

氏 名・（本 籍） 李 相 亮 （ 韓 国 ）

博士の専攻分野の名称 博士（医学）

学 位 記 番 号 博い第1815号

学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当

学位授与の 日 付 平成19年3月25日

【 学位論文題目 】

In Vitro Multipotentiality and Characterization of Human Unfractured
Traumatic Hemarthrosis-Derived Progenitor Cells: A Potential
Cell Source for Tissue Repair
(骨傷のない外傷性ヒト膝関節内血腫由来前駆細胞のin vitro
における多分化能の検討及び細胞表面抗原解析：再生医療
への新たな細胞資源の可能性)

審 査 委 員

主 査 教 授 杉村 和朗

教 授 黒田 嘉和

教 授 清野 進

【背景】骨髄由来間葉系幹細胞は、近年、再生医療の細胞源として大きな関心をもたれている。特に整形外科領域においては、骨髄由来間葉系幹細胞を用いた外傷・変性等による骨・軟骨欠損再生への臨床応用研究が進んでいる。近年、脂肪・滑膜・筋肉などの骨髄以外の組織中にも間葉系幹細胞が存在することが報告されているが、これらの細胞源を採取するには、しばしば全身麻酔などを要し、採取時の患者に与える侵襲が臨床上問題となる。

膝関節外傷は、近年の各世代でのスポーツ人口の増大に伴い、増加の一途をたどっている。膝関節内血腫は、前十字靭帯損傷や半月板損傷などの膝関節外傷によってしばしば引き起こされ、通常、急性期治療として疼痛軽減のため関節内穿刺により吸引され、得られた血腫は医療廃棄物として廃棄される。2006年に、我々はこれら血腫に着目し、血腫中に骨分化能を有する前駆細胞が存在することを報告した。本研究において、我々は、膝関節内血腫中には多分化能を有する前駆細胞が存在しており、これら血腫由来前駆細胞が、低侵襲に得られる、骨髄由来間葉系幹細胞に代わる再生医療への新たな細胞源になりうると仮説を立てた。

【方法】骨傷のない急性外傷性前十字靭帯損傷患者 24 例の膝関節より血腫を穿刺・吸引し、比重分離法にて単核球成分を分離し、コントロール培地 (α -MEM, 10%FBS) にて初代培養を行った。bone marrow stromal cell(BMSC)を対照とするため患者 12 例より骨髄を採取し同様に分離・培養を行った。また、 10^6 個の単核細胞を 10cm の dish に播種し、2 週間後に Giemsa 染色にて Colony (接着細胞 50 個以上) 数を評価した (Colony forming efficacy assay)。Confluent になった接着系初代培養細胞の表面抗原を FACS により解析した。第 1～3 継代細胞を、骨分化誘導培地・脂肪分化誘導培地・軟骨分化誘導培地 (pellet culture) にて 3 週間培養しそれぞれの分化能を検討した。

【結果】血腫由来単核球細胞の初代培養において、fibroblast 様の接着系細胞が

培養 5 日前後に colony を形成し始めた。これら colony は、BMSC に認められる colony-forming unit-fibroblasts(CFU-Fs)と類似していた。Colony は、徐々に増大し 3~4 週間には subconfluent となった。これら接着系細胞は、10 継代を経ても増殖能は失われなかった。

Colony forming efficacy assay では、血腫由来細胞は、培養 2 週後に (10^6 個の単核細胞あたり) 5.7 ± 1.3 個の colony が得られ、対照の BMSC では 23.3 ± 4.8 個の colony が得られた。

初代接着系細胞の細胞表面抗原は、FACS 解析により、CD29・44・105 で強陽性 (陽性率 68%以上)、CD166 で陽性 (20.7%)、CD34・14・45 では陰性 (1.8%以下) の結果が得られた。CD166 の場合を除き、BMSC のそれと類似していた。

骨分化能は、RT-PCR (アルカリフォスファターゼ・オステオカルシン・オステオポンチン・ボーンシアロプロテイン)・アリザリンレッド染色により確認された。脂肪分化能は、RT-PCR (PPAR- γ ・LPL)・オイルレッド染色により確認された。軟骨分化能は、RT-PCR (2 型コラーゲン・10 型コラーゲン・SOX9・アグリカン)・トルイジンブルー染色・2 型コラーゲン免疫染色により確認された。これら血腫由来細胞の分化能は、対照の BMSC と比し同等であった。

【考察】本研究により、骨傷のない外傷性膝関節血腫中には、BMSC に類似した多分化能を有する前駆細胞が存在することが判明した。また、細胞表面抗原解析にて、CD166 を除き、この血腫由来細胞は、BMSC に類似した性質を持つことが明らかにされた。一方、Colony forming efficacy assay により、血腫中の多分化能を有する前駆細胞数は、BMSC と比し 4 分の 1 程度であることが明らかになった。血腫からより多くの前駆細胞を得、より多くの細胞を増やすための適切な採取法・培養条件の検討が必要であると考えられた。

血腫由来細胞は、間葉系幹細胞が存在すると報告されている骨髄・脂肪・筋肉などの従来の細胞源と異なり、関節穿刺という治療上必要かつ低侵襲な手技で採取可能である。従来、医療廃棄物と考えられていた血腫は、保存的治療や手術での治療が困難と考えられている断裂した靱帯・半月板・関節軟骨欠損に対する、将来の組織再生治療の新たな細胞源となりうることを示唆された。しかしながら、本結果は *in vitro* によるものであり、将来の臨床応用に向け *in vivo* での検討が必要であると考えられる。

また、この多分化能を有した血腫由来前駆細胞の由来としては以下の二つが可能性として挙げられる。一つは、外傷によって骨髄などから動員され血行を通じ関節内に到達した末梢血中の間葉系幹細胞すなわち”Circulating mesenchymal progenitor cells(MPCs)”由来、もう一つは、関節内の滑膜・脂肪などの組織から関節内血腫中に遊走した間葉系幹細胞すなわち”Niche MPCs”由来である。しかし、これらを同定するには更なる研究を要する。

[結論]本研究により、骨傷のない膝関節内血腫中には、多分化能を有する BMSC 類似の前駆細胞が存在することが初めて明らかにされた。関節内血腫由来細胞を用いた、将来の膝外傷後の Tissue engineering・細胞治療への臨床応用が期待される。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1829 号	氏 名	李 相亮
論文題目 Title of Dissertation	In vitro multipotentiality and characterization of human unfractured traumatic hemarthrosis-derived progenitor cells: A potential cell source for tissue repair 骨傷のない外傷性ヒト膝関節内血腫由来前駆細胞の <i>in vitro</i> に おける多分化能の検討及び細胞表面抗原解析： 再生医療への新たな細胞資源の可能性		
審査委員 Examiner	主 査 杉 村 和 朗 Chief Examiner 副 査 清 野 進 Vice-examiner 副 査 黒 田 嘉 和 Vice-examiner		
審査終了日	平成 19 年 2 月 21 日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

骨髄由来間葉系幹細胞は、近年、再生医療の細胞源として大きな関心が注がれ、特に整形外科領域においては間葉系幹細胞を用いた外傷・変性等による骨・軟骨欠損再生への臨床応用研究が進んでいる。これまでに脂肪・筋肉・滑膜など骨髄以外の組織中にも間葉系幹細胞が存在することが報告されている。しかし、これらの細胞源は、採取の際に患者に与える侵襲の大きさが問題となる。本研究では、低侵襲な手技で得られる再生医療への新たな細胞源として、外傷による膝関節内血腫に注目し、多分化能を有する前駆細胞が血腫中に存在するか検討を行った。

対象は受傷 48 時間以内に受診した、急性外傷性膝前十字靭帯損傷患者 24 例である。膝関節より血腫を穿刺し、比重分離法にて単核球成分を分離し、初代培養を行った。subconfluent になった接着系初代培養細胞の表面抗原を FACS により解析した。また、継代細胞を、骨分化誘導培地・脂肪分化誘導培地・軟骨分化誘導培地 (pellet culture) にて 3 週間培養し、それぞれの分化能を検討した。

血腫由来単核球細胞の初代培養において、fibroblast 様の接着系細胞が培養 5 日前後に colony を形成し始めた。Colony は、徐々に増大し 3~4 週後には subconfluent となった。これら接着系細胞は、10 継代を経ても増殖能は失われなかった。初代接着系細胞の細胞表面抗原は、FACS 解析により、CD29・44・105 で強陽性、CD166 で陽性、CD34・14・45 では陰性の結果が得られた。

骨分化能は、RT-PCR (アルカリフォスファターゼ・オステオカルシン・オステオポンチン・ボーンシアロプロテイン)・アリザリンレッド染色により確認された。脂肪分化能は、RT-PCR (PPAR- γ ・LPL)・オイルレッド染色により確認された。軟骨分化能は、RT-PCR (2 型コラーゲン・10 型コラーゲン・SOX9・アグリカン)・トルイジンブルー染色・2 型コラーゲン免疫染色により確認された。

従来、膝外傷による関節血腫は治療上、穿刺され廃棄されるものであった。本研究の結果から、膝関節血腫中には骨髄由来間葉系幹細胞に類似した多分化能を有する前駆細胞が存在することが判明した。この新たな細胞源は従来の治療の延長線上で、新たな侵襲を加えることなく得られるという大きなメリットがあり、前十字靭帯損傷・半月板損傷・軟骨損傷などの膝外傷に対する cell-based therapy・tissue engineering への細胞源としての応用が期待できると考えられた。

本研究は、膝関節血腫中に含まれる多分化能を有する前駆細胞について研究したものであるが、将来臨床応用が期待される膝外傷に対する再生医療の新たな細胞源の一つを提示し、その有用性を証明した点において、重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士 (医学) の学位を得る資格があるものと認める。