

博 士 学 位 論 文

論 文 内 容 の 要 旨

お よ び

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

東 邦 大 学

山田 学より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 778 号

学位申請者 : やま だ まなぶ
山 田 学

学位論文 : Cell proliferation, chondrogenic differentiation, and cartilaginous tissue formation in recombinant silk fibroin with basic fibroblast growth factor binding peptide

(塩基性線維芽細胞成長因子結合ペプチドを組み込んだ遺伝子組み換え絹フィブロインにおける細胞増殖、軟骨分化、軟骨組織形成)

著 者 : Manabu Yamada, Arata Nakajima, Kayo Sakurai, Yasushi Tamada, Koichi Nakagawa

公 表 誌 : Journal of Functional Biomaterials 15(8): 230, 2024
DOI: 10.3390/jfb15080230

論文内容の要旨 :

背景・目的: 絹フィブロインスポンジ (fibroin sponge: FS) は、関節軟骨に適した力学的特性を持つ足場材として報告されている。以前、我々は日本白色ウサギから軟骨細胞を採取し FS を用いて細胞を培養し、FS の中で明瞭な軟骨組織が産生されること、ウサギの膝蓋骨の骨軟骨欠損において軟骨細胞を含む FS で包み硝子様の軟骨を作り出すことに成功し、これらは軟骨細胞などの培養細胞で覆われた FS が、大きな骨軟骨欠損の修復をサポートする可能性があることを示唆している。ヒト細胞は一般に増殖能が限られているため、FS で培養する細胞数を増やすことが非常に重要である。塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor: bFGF) には強力な増殖促進作用がある。我々は bFGF 結合ペプチドと組み合わせられた遺伝子組み換え FS を開発した。このアプローチは絹フィブロイン・マトリックスに bFGF を適切な量とタイミングで結合させることが可能で、組織欠損部や創傷部に適用することで患者自身の bFGF を利用し、迅速な組織構築や創傷治癒につなげることができる。この FS を用いて、自家軟骨細胞を採取せずに、骨髓由来のヒト間葉系細胞を増殖させ、軟骨形成を試みた。

対象・方法：FS はカイコの繭を臭化リチウムに溶解し、純水に対して透析を行い絹フィブロインの水溶液を調製し、1% v/v のジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide: DMSO) と混合し、-20 °C で凍結して解凍し DMSO 除去後、オートクレーブ滅菌しこのスポンジを野生型 FS とした。野生型 FS に加え、bFGF 結合ペプチドを持つ組換え絹フィブロインを調製し、P7FS と命名した。FS は Φ6 mm、厚さ 1.5 mm のディスク状に成形した。骨髓由来のヒト間葉系細胞株 UE6E7-16 (RCB2163) を用いて、細胞を POWEREDBY10 で 1 日培養し、0.5% Fetal Bovine Serum (FBS) 含有 Dulbecco's Modified Eagle's Medium 中の FS (1.0×10⁶ 細胞/スポンジ) に播種し、bFGF の存在下または非存在下で細胞をさらに 3 日間培養した後に、細胞カウントキット (CCK-8) を用いた増殖アッセイを行った。細胞は DNA 抽出キットを用いてゲノム DNA の定量を行い、各実験条件で 3~4 個のスポンジをテストした。10ng/mL の Transforming Growth Factor-β (TGF-β) を添加した軟骨分化培地で培養し 28 日目に、FS は組織学的分析にかけた。切片を SRY (sex determining region Y)-box9 (Sox9) に対するウサギモノクローナル抗体と反応させ、各切片で Sox9 陽性細胞の数と全細胞数を数え、Sox9 陽性細胞の割合を算出した。野生型および P7FS について、3~4 個のスポンジを評価した。軟骨組織の形成を評価するため切片をアルシアンブルー染色し、FS の青く染まった部分を軟骨組織と定義した。

結果：野生型 FS では、bFGF を 3ng/mL と 30ng/mL にすると、無刺激の細胞に比べて細胞増殖が有意に上昇し、3ng/mL と 30ng/mL の間にも有意差があった ($p < 0.01$)。P7FS では、無刺激の細胞と比較して、3ng/mL および 30ng/mL の bFGF で細胞増殖が有意に上昇した ($p < 0.005$) が、3ng/mL と 30ng/mL の間には有意差は認められなかった。培養 3 日後に野生型 FS と P7FS を比較すると、P7FS は野生型 FS より有意に高い細胞数を示した ($p < 0.05$)。3ng/mL の bFGF で刺激した後、P7FS は野生型 FS より有意に高い細胞増殖を示した ($p < 0.005$)。FS に播種した細胞のゲノム DNA 含量を測定し、野生型 FS では、全 DNA 含量は bFGF 刺激の有無にかかわらず同程度で、P7FS では無刺激のものに比べ bFGF 刺激で有意に上昇した ($p < 0.001$)。培養 3 日後の野生型と P7FS の比較では、P7FS は野生型 FS よりも有意に高い DNA 含量を示した ($p < 0.01$)。3ng/mL の bFGF で刺激した後、P7FS は野生型 FS よりも有意に高い DNA 含量を示した ($p < 0.001$)。P7FS の免疫染色では、野生型 FS で見られたのと同程度の Sox9 陽性細胞を認め、全細胞に対する Sox9 陽性細胞の比率の中央値は、野生型で 56.3%、P7 で 55.2% であり、有意差はなかった。野生型および P7FS のいずれにおいても、スポンジの表層のフィブロイン線維の間に、アルシアンブルー染色で水色に染まる軟骨組織が同程度形成された。

考察：細胞から抽出したゲノム DNA の定量では、野生型 FS に比べ P7FS で bFGF 刺激により著しく増加した。P7FS は、bFGF 刺激を欠いた場合でも、野生型 FS より有意に高い細胞増殖と細胞 DNA 含量を示しており、P7FS が培地中の FBS 由来の微量な bFGF と効率的に結合できたことを示唆している。UE6E7-16 細胞を効果的に軟骨細胞に分化させるため、10ng/mL の TGF-β を添加した軟骨分化培地で培養したが、P7FS における軟骨への分化と軟骨組織形成は、野生型 FS で観察されたものと同等であった。TGF-β は培地に加えただけなので、P7FS の深部に浸透せず、FS に播種した細胞への TGF-β シグナル伝達が不十分で細胞に効率的に作用できず、軟骨分化と軟骨組織形成が促進されなかった可能性があり、フィブロインに TGF-β 結合ドメインやペプチドを付与するなどの改良が必要である。

結論：P7FS は、野生型 FS と比較してヒト間葉系細胞株 UE6E7-16 の増殖を促進したが、軟骨分化や軟骨組織形成は促進しなかった。軟骨組織を効率的に産生するためには、軟骨分化や軟骨形成に関与する成長因子の制御を含め、遺伝子導入 FS や培養条件の改良が必要である。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 778 号		氏 名		山 田 学	
学位審査担当者	主 査	武 者 芳 朗			
	副 査	高 橋 寛			
	副 査	南 木 敏 宏			
	副 査	高 橋 啓			
	副 査	中 田 雅 彦			
学位論文の審査結果の要旨：					
<p>関節軟骨の修復には現在、骨髄刺激法、骨軟骨柱移植術、自家培養軟骨細胞移植術などが行われているが、自家軟骨は採取可能な量に限界があり、広範囲な軟骨欠損には対応できないため、代替治療法を検討する必要がある。そこで様々な足場材や間葉系細胞を組み合わせた軟骨再生が検討されている。絹フィブロインスポンジ (fibroin sponge: FS) は、関節軟骨に適した力学的特性を持つ足場材として報告されており、申請者はこれに関する研究を重ねてきた。今回、FS と間葉系細胞を組み合わせた軟骨再生を試み知見を得た。FS はカイコの繭を溶解し、純水に対して透析を行い絹フィブロインの水溶液を調製し、1% v/v のジメチルスルホキシド (dimethyl sulfoxide: DMSO) と混合し、-20℃で凍結、解凍し DMSO 除去後、オートクレーブ滅菌したスポンジを野生型 FS とした。ヒト軟骨細胞は一般に増殖能が限られるため、FS で培養し細胞数を増やすことが特に重要である。塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) には強力な増殖促進作用がある。細胞増殖を図るため、強力な細胞増殖機能を有する bFGF 結合ペプチド (以下 P7) を FS に付与した P7FS を作製し、野生型 FS と P7FS 上で骨髄由来間葉系細胞株 UE6E7-16 を培養した。P7FS は野生型 FS と比較して bFGF 存在下で細胞増殖速度の増加を示し、細胞から抽出した DNA 量も bFGF 存在下で顕著に増加した。bFGF の非存在下においても P7FS が野生型 FS よりも高い細胞増殖速度と DNA 量増加を示したことから、培地中の FBS 由来の bFGF とも効率的に結合できたと考えられた。P7FS では、細胞増殖速度と DNA 含有量を増加させたが、軟骨分化と軟骨組織形成には差がなかった。bFGF は P7 と結合し細胞増殖を促すことが出来たが、Transforming Growth Factor-β (以下 TGF-β) は培地に添加しただけで、細胞に効率的に作用できなかった可能性があり、P7FS での軟骨分化と軟骨組織形成を促進するためには TGF-β 結合ペプチドを追加するなどの改良が必要であると結論された。</p> <p>2024 年 11 月 25 日に開催された学位審査会において申請者からの論文の要旨の発表のち、審査委員から「培養条件に成長因子として bFGF や TGF-β を選択したが、適切であったか、他に促進物質はないのか」「FS を生体に応用するにあたり、異物反応等の問題、親和性はよいのか」「FS の強度は十分なのか」「iPS ではいかがか」などの質問が寄せられ、これに対して申請者は、現在までに報告されている知見および自らの研究成果と考察を併せ、理論的かつ明解に回答した。本研究は自家軟骨細胞の採取の必要がなく、またフィブロインは炎症誘発性が低いこと、関節軟骨は力学的負荷に耐える必要があり、ゲルなど報告されている足場材と比較しても強度が強く、生体内で軟骨再生まで形状を維持できることを強調した。討論のち、本論文は学位に値する研究であることを審査委員全員一致で合意した。</p>					