

氏名（本（国）籍）	都 築 直（東京都）
主 指 導 教 員 名	帯広畜産大学 准教授 佐々木 直 樹
学 位 の 種 類	博士（獣医）
学 位 記 番 号	獣医博甲第402号
学位授与年月日	平成25年9月24日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学
学 位 論 文 題 目	ウマの骨および関節軟骨に対する生体組織工学を用いた 再生医療の応用に関する研究
審 査 委 員	主査 帯広畜産大学 教 授 山 田 一 孝 副査 帯広畜産大学 准教授 佐々木 直 樹 副査 岩 手 大 学 教 授 佐 藤 繁 副査 東京農工大学 教 授 加茂前 秀 夫 副査 岐 阜 大 学 教 授 海 野 年 弘

学位論文の内容の要旨

ウマにおける骨および関節軟骨疾患の発生は多く、临床上大きな問題となっている。このため、治癒効果の高い治療法が求められており、生体組織工学を用いた再生医療の応用が期待されている。生体組織工学は細胞、成長因子ならびに足場から成立し、骨および関節軟骨の再生を促進することが示されている。成長因子は生体内半減期が短いという問題点を有するが、近年、ゼラチンハイドロゲルによるドラッグデリバリーシステムの構築により、効果的な適用が可能となった。

現在、細胞として骨および軟骨への分化能を有する間葉系幹細胞ならびに誘導手技である骨髓造孔術、成長因子として骨および関節軟骨形成を促進する骨形成蛋白-2（BMP-2）ならびに関節軟骨形成を促進する多血小板血漿含浸ゼラチンハイドロゲルマイクロスフィア、足場材としてドラッグデリバリーシステムの機能ならびに細胞の浸潤性を有するゼラチンB-リン酸3カルシウムスポンジ（ β -TCP スポンジ）の応用が期待されている。これらは各種研究により、骨および関節軟骨再生に対して有効であることが示されているが、ウマに対する検討は十分になされていない。このことから、ウマに対する有効性を検討するために以下の研究を実施した。

第1章では、第三中手骨骨欠損に対するBMP-2含浸 β -TCPスポンジの骨再生への影響を検討した。X線スコアにおいて、BMP-2含浸 β -TCPスポンジはBMP-2単独、 β -TCPスポンジ単独と比較して有意に高値を示した。また、BMP-2含浸 β -TCPスポンジでは、組織所見による広範な緻密骨の形成が確認された。このことから、BMP-2と β -TCPスポンジの併用は良好に骨再生を促進することが示された。以上のことから、成長因子と足場材の併用は骨再生に対して有効であることが示された。

第2章では、第二、第四中手骨/中足骨骨欠損に対する間葉系幹細胞混合BMP-2含浸 β -TCPスポンジの骨再生への影響を検討した。CT値（Hounsfield Unit: HU）において、間葉系幹細胞混合BMP-2含浸 β -TCPスポンジは、BMP-2含浸 β -TCPスポンジならびに間葉系幹細胞

胞混合 β -TCP スポンジと比較して有意に高値を示した。また、間葉系幹細胞混合 BMP-2 含浸 β -TCP スポンジでは組織所見において他群と比較して広範な緻密骨の形成が確認された。このことから、間葉系幹細胞、BMP-2 ならびに β -TCP スポンジの併用は、骨再生を良好に促進すると考えられた。このことから、成長因子と足場材の併用に加え、さらに細胞を併用することは、骨再生をさらに促進することが示された。

第3章では、第三手根骨関節軟骨欠損に対する多血小板血漿含浸ゼラチンハイドロゲルマイクロスフィアならびに骨髓造孔術の関節軟骨再生への影響を検討した。肉眼スコアにおいて、投薬群では対照群に対して有意に高値を示した。また、組織所見において、投薬群ではサフラニン 0 陽性かつ 2 型コラーゲン陽性である硝子軟骨性の組織も一部に確認された。このことから、骨髓造孔術に対して多血小板血漿含浸ゼラチンハイドロゲルマイクロスフィアを併用することは軟骨再生を促進することが示された。これは骨髓造孔術により関節軟骨欠損部位へ誘導を受けた間葉系幹細胞が、多血小板血漿中の成長因子により硝子軟骨性組織への分化が促進されたためと考えられた。このことから、細胞ならびに成長因子の併用は、関節軟骨再生に対して有効であることが示された。

第4章では、大腿骨内側顆骨軟骨欠損に対する BMP-2、多血小板血漿含浸ゼラチンハイドロゲルマイクロスフィア、MSC ならびに β -TCP スポンジの骨軟骨再生への影響を検討した。軟骨下骨の CT 値において、投薬群では対照群と比較して高い値を示した。また、投薬群では組織所見でサフラニン 0 陽性かつ 2 型コラーゲン陽性である硝子軟骨性の組織が広範に確認された。本検討で確認された良好な再生は多血小板血漿含浸ゼラチンハイドロゲルマイクロスフィアを上層に留めることで 2 層構造とし、関節軟骨および軟骨下骨の再生に適した条件を同一のスポンジ内に共存させることによる効果と考えられた。したがって、間葉系幹細胞、BMP-2、多血小板血漿含浸ゼラチンハイドロゲルマイクロスフィアならびに β -TCP スポンジの併用は骨軟骨欠損再生を促進すると考えられた。このことから、細胞と成長因子の併用に加え、多層構造足場材を併用することは、骨軟骨再生に対しても有効であることが示された。

第5章では、臨床例に対する生体組織工学の応用による骨軟骨欠損の再生効果を検討した。本検討は骨軟骨欠損に対し、第4章と同様の手技を適用した。つなわち、本章では術後 16 週に CT 検査により欠損部の充填、関節鏡により表面が滑らかな組織で覆われていることが確認された。このことから、臨床例においても生体組織工学の応用は骨軟骨再生に対して有効であることが示された。

本研究により、細胞、成長因子ならびに足場材を用いた生体組織工学の適用により、ウマの骨および関節軟骨欠損の再生促進が示された。ウマの骨および関節軟骨修復に対して生体組織工学を用いた再生医療の応用は有効であることが明らかとなった。

審 査 結 果 の 要 旨

学位申請者である都築直君は、ウマの骨および関節軟骨修復に対して成長因子、足場材ならびに細胞を用いた生体組織工学による再生医療の応用は有効であることを明らかにした。その結果、以下の成績を得たことを踏まえ、審査した。

本論文の第一章では、第三中手骨骨欠損に対する BMP-2 含浸 β -TCP の骨再生への影響を検討している。その結果、BMP-2 とゼラチン β -TCP スポンジの併用は良好に骨再生を促進することが示され、成長因子と足場材の併用は骨再生に対して有効であることを明らかにしている。特に、成長因子を効果的に除放するゼラチン β -TCP スポンジの効果が示せたこ

とは、今後の研究を推進する上で大きな成果である。

続いて、第二章では、第二、第四中手骨/中足骨骨欠損に対する間葉系幹細胞播種 BMP-2 含浸ゼラチン β -TCP スポンジの骨再生への影響を検討している。その結果、間葉系幹細胞、BMP-2 ならびにゼラチン β -TCP スポンジの併用は、骨再生を良好に促進することが示され、成長因子と足場材の併用に加え、さらに間葉系幹細胞を併用することは、骨再生をさらに促進することを明らかにしている。

さらに第三章では、第三手根骨関節軟骨欠損に対する多血小板血漿含浸ゼラチンハイドロゲルマイクロスフィアならびに subchondral drilling の関節軟骨再生への影響を検討している。その結果、subchondral drilling に対して多血小板血漿含浸ゼラチンハイドロゲルマイクロスフィアを併用することは軟骨再生を促進することが示され、間葉系幹細胞ならびに成長因子の併用は、関節軟骨再生に対して有効であることを明らかにしている。

第四章では、大腿骨内側顆骨軟骨欠損に対する BMP-2、多血小板血漿含浸ゼラチンハイドロゲルマイクロスフィア、間葉系幹細胞ならびに β -TCP スポンジの骨軟骨再生への影響を検討している。その結果、間葉系幹細胞と成長因子の併用に加え、多層構造足場材を併用することは、骨軟骨再生に対しても有効であることを明らかにしている。この多層構造足場材の適応は独創的であり、関節軟骨のような複数の層構造を有する組織再生への応用が可能となることから、その技術は普遍性を有するといえる。

最後に第五章では、臨床例に対する生体組織工学の応用による骨軟骨欠損の再生効果を検討している。その結果、術後 16 週に CT 検査により欠損部の充填、関節鏡により表面が滑らかな組織で覆われていることが確認され、治癒に時間を要する離断性骨軟骨症においても生体組織工学の応用が骨軟骨再生に対して有効であることを明らかにしている。

ウマの骨および関節軟骨に対する生体組織工学を用いた再生医療に関する一連の研究により、間葉系幹細胞、成長因子ならびに足場材を用いた生体組織工学の適用により、ウマの骨および関節軟骨欠損の再生促進が示された。本研究で確立された骨および関節軟骨修復に対する生体組織工学技術は、ウマの骨および関節軟骨疾患に対する有用な治療法となることから、学術的意義は高い。また、論文の構成は論理的であり、内容は独創性に富み、結果に対する科学的考察も十分になされていると判断した。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として充分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : In vivo osteoinductivity of gelatin β -tri-calcium phosphate sponge and bone morphogenetic protein-2 on an equine third metacarpal bone defect

著 者 名 : Tsuzuki, N., Otsuka, K., Seo, JP., Yamada, K., Haneda, S., Furuoka, H., Tabata, Y. and Sasaki, N.

学術雑誌名 : Research in Veterinary Science

巻・号・頁・発行年 : 93(2):1021-1025, 2012

- 2) 題 目 : The effect of a gelatin β -tricalcium phosphate sponge loaded with mesenchymal stem cells (MSC), bone morphogenic protein-2 and platelet-rich plasma (PRP) on equine articular cartilage defect

著 者 名 : Tsuzuki, N., Seo, JP., Yamada, K., Haneda, S., Furuoka, H., Tabata,

Y. and Sasaki, N.

学術雑誌名 : The Canadian Veterinary Journal

巻・号・頁・発行年 : in press, 2013

3) 題 目 : Use of a bioengineered osteochondral precursor for treatment of osteochondritis dissecans in a Thoroughbred filly

著 者 名 : Tsuzuki, N., Seo, JP., Haneda, S., Yamada, K., Furuoka, H., Tabata, Y. and Sasaki, N.

学術雑誌名 : Australian Veterinary Journal

巻・号・頁・発行年 : in press, 2013

既発表学術論文

1) 題 目 : Effect of compound of gelatin hydrogel microsphere incorporated with platelet-rich-plasma and alginate on sole defect in cattle

著 者 名 : Tsuzuki, N., Seo, JP., Yamada, K., Haneda, S., Tabata, Y. and Sasaki, N.

学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年 : 74(8):1041-1044, 2012