

[課程－2]

審査の結果の要旨

氏名 青木 絵里香

本研究は、細胞障害を生じうる酵素処理、脱分化が伴う平面培養、免疫反応を生じうる生体分解性足場に依存した三次元形状付与方法を抜本的に改善する再生軟骨作製法を実現するため、生体軟骨組織細断装置により作製した軟骨小片を用いたスカフォールドフリー再生軟骨の作製法について検討したものであり、下記の結果を得ている。

In vitro

1. 単純培養：細切後の軟骨小片の凝集の必要条件

Ultra-Low Attachment Plate で培養を行なった 10%FBS 群でのみ、約 5～6 週で軟骨小片同士が三次元的に集合、凝集し、軟骨小片の凝集体外層に膜様組織が形成された。DMEM 群、IGF-1 群では凝集は起こらなかった。Standard Culture Plate では全ての群で凝集は起こらなかった。

2. 複合培養：軟骨基質を形成する条件

凝集が起こった時点で、IGF-1 培地で培養し、分化誘導を行った。組織切片を作製して、HE 染色および TB 染色で基質形成を評価したところ、10%FBS で 7 週間培養後に、IGF-1 添加分化誘導培地で 5 週間培養を行なった群で最も良好な基質産生が見られた。

3. 体積の評価

培養後の凝集体の大きさを非接触光学式 3 次元スキャナ ATOS III Triple Scan で測定したところ、分化誘導を行なった群と、行わなかった群で、培養条件による差は認められなかったが、いずれのサンプルも培養開始前の軟骨小片と比較して体積は増大していた (2.14 倍)。

4. 凝集体形成における細胞動態解析

10%FBS 培地で 3 週間培養後のサンプルを使用し、KEYENCE (BZ-X700) を用いて、15 分間隔で 3 日間タイムラプス撮影を行ったところ、培地中に浮遊している細胞が、軟骨小片同士の間に徐々に集積していく様子が観察された。

5. 間質細胞の特性

細切直後の軟骨小片、10%FBS 培地で 7 週培養した軟骨小片由来凝集体と、さらに 5 週 IGF-1 培地で培養した凝集体の組織切片を用いて免疫組織学的染色を行なった。PCNA 陽性細胞は間質に見られ、軟骨小片から遊走した細胞が 12 週後も増殖していた。IGF-1 培地での培養後に見られた periostin は、コラーゲン組織の高次構造化を促進して、再生組織の成熟に寄与した可能性が示唆された。タンパク分解酵素 MMP-13 は増殖培地による培養後には僅かな細胞で陽性であったが、IGF-1 培地による培養で陽性細胞が増加した。細胞の遊走は凝集体形成時 7 週までに既に生じており、この過程における基質分解には他のタンパク分解

酵素の関与が示唆される結果となった。

幹細胞マーカーとして知られている TRA-1-60, SSEA3 の発現を検討したところ、細切直後の軟骨小片由来細胞を平面培養すると TRA-1-60 および SSEA-3 は陰性であったが、非接着 plate で三次元培養すると、IGF-1 刺激の有無にかかわらず間質細胞は TRA-1-60、SSEA-3 陽性となった。

In vivo

1. 凝集体移植時の軟骨再生能についての検討

非接着培養を行なって得られた凝集体および細切直後の軟骨小片をヌードマウスの背部皮下に移植し、8 週後に回収して組織学的評価を行なった。10%FBS で 7 週間培養後に、IGF-1 添加分化誘導培地で 5 週間培養を行なった凝集体を移植した群で、最も良好な基質産生を示しており、in vitro の組織所見とも一致していた。

2. ImageJ を用いた解析の結果、新生基質の割合、拡大率を算出した。また、回収した組織の力学的強度を測定した。培養なしで移植した群、10%FBS で 12 週間培養した群、10%FBS で 5 週間培養後に 7 週間分化誘導行なった群、10%FBS で 7 週間培養後に 5 週間分化誘導行なった群と比較すると、10%FBS で 7 週間培養後に 5 週間分化誘導を行なった群で、有意に高値となった。

よって、in vitro および in vivo 両者において 10%FBS で 7 週間培養後に 5 週間分化誘導を行なった群で、良好な基質産生が認められた。

以上、本論文は、生体軟骨組織細断装置を用いて作製した軟骨小片自体をコラゲナーゼ処理することなく細胞の供給源として軟骨基質ごと培養し、凝集させることで、脱分化させることなく、少量の軟骨から大きな再生軟骨を作製できる可能性が示唆され、新たな再生医療技術の開発に貢献できると考える。

よって本論文は博士(医学)の学位請求論文として合格と認められる。