

審査の結果の要旨

氏名 米永 一理

本研究は軟骨再生医療において重要な、プロトコル作りの一環として、軟骨細胞の細胞数測定方法を自動測定器を用いて画一化させた上で、ヒト耳介軟骨から軟骨細胞単離の際のコラゲナーゼ処理濃度・時間、および単離後の播種濃度の最適化を図り、浮遊細胞を用いることでより効率的な細胞培養の方法の確立を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 自動測定器 NucleoCounter®が、耳介軟骨細胞の測定に有用であることを、従来の細胞測定法である Live/Dead® Viability Assay と比較することで証明した。軟骨再生医療における培養において、客観的に細胞数を測定できることは、安定的な培養方法確立のために必須であり、特に細胞以外の残存物を含むような懸濁液中からでも、細胞を測定できることが示された。
2. 軟骨片から、軟骨細胞を単離する際の至適なコラゲナーゼ濃度は、0.3%24時間、0.6%6時間であることを明らかとした。コラゲナーゼ濃度 0.15%~1.2%、浸漬時間 2時間~24時間での軟骨細胞のアポトーシスと炎症性サイトカインの遺伝子発現は、コラゲナーゼ濃度が増加するにつれて、アポトーシス関連因子の P53 の増加する傾向を認めた。また、炎症性サイトカインである TNF- α および IL-1 β は、コラゲナーゼ濃度 0.6%以上では増加する傾向であった。アポトーシスアッセイの結果も、0.6%または 1.2%とコラゲナーゼ濃度が高い場合は、浸漬時間が長いほうが、アポトーシスを起こしやすい傾向が示された。
3. 軟骨細胞培養時の最適な細胞播種密度は、3,000~10,000 細胞/cm²であることを明らかとした。播種濃度が 10,000 細胞/cm² より多いと培養時に細胞凝集を起こす可能性があることが示された。また、3,000 細胞/cm² より少ない場合は、細胞増殖に時間がかかり、安定的な細胞確保ができない可能性があることが示された。これらは軟骨細胞のオートクリン/パラクリンシステムが関与していることが示された。
4. 至適な培養条件で軟骨細胞を播種・培養しても、培養液中には生着していない浮遊細胞が発生していることを明らかとした。この浮遊細胞と、通常の培養細胞である生着細胞との比較では、COL1A1 と COL2A1 の mRNA の Real-time RT-PCR を用いた測定では、浮遊細胞のみを用いて継代した場合、浮遊細胞と生着細胞を混合して継代した場合、生着細胞のみを用いて継代した場合いずれでも発現に有意な差はなかった。さらに、3週間ペレットにて培養した軟骨の組織学的、生化学的分析においても、有意な差は認めなかった。これらより、浮遊細胞は、通常の培養細胞である生着細胞と同様であることが示された。この浮遊細胞を用いた培養法を用いると通常培養のみ場合と比べおよそ 1.5 倍の細胞数を確保することができることが示された。

以上、本論文は、今まで未解明であった軟骨再生医療における効率的な細胞回収と培養方法の妥当性を明らかにした。このことにより、継代を繰り返すことによる脱分化や、細胞変性リスクを減らし、より安全・確実な再生軟骨移植片を作製することができるが示された。本研究内容は、現在東京大学で行われているヒト耳介軟骨を用いた再生軟骨の治療において、実際に利用されている技術の一部となっており、今後様々な細胞培養法の開発に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。