

審査の結果の要旨

氏名 石橋 牧子

本研究は軟骨再生医療において生理的な軟骨と同等な様な構造を有する軟骨組織を再生するために、ヒト耳介軟骨細胞から基質産生能の高い細胞集団を同定し、濃縮する方法として細胞分裂速度による分取の有用性を検討し、下記の結果を得ている。

1. 耳介軟骨から単離した直後のヒト耳介軟骨膜細胞における軟骨幹・前駆細胞マーカーとして報告があった CD44 (+) CD90 (+) について、ヒト耳介軟骨細胞の継代培養に伴う発現変化を検討したところ、単離直後の P0(o)で、CD44 (+) CD90 (+) は 5.4%であったのに対し、本研究室で移植細胞として使用している P2 では、CD44 (+) CD90 (+) は 95%以上であったことを明らかにした。申請者の所属する研究室で行われている PLLA 足場を用いた再生軟骨移植では、CD44 (+) CD90 (+) 細胞が大多数を占めていると考えられる P2 の細胞を移植しても、再生軟骨は不均一な島状を呈しており、必ずしも基質産生の高い再生軟骨を得られていないことから、CD44 (+) CD90 (+) は、細胞を大量培養した後の軟骨幹・前駆細胞を濃縮するマーカーとしては不適當であることが示唆された。
2. 体性幹細胞様の特性を有した細胞が分裂速度の速い細胞群に含まれると想定し、分裂速度の違いを検出する方法を検討した。培養軟骨細胞の細胞分裂を追跡するために、CFSE (Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) を用いて蛍光標識を行い、flow cytometry にて CFSE 蛍光シグナル分布の経時的変化を観察した。その結果、経時的にヒストグラムの幅が広くなることから、様々な蛍光強度の細胞が存在し、細胞分裂の速い細胞と遅い細胞が混在すると示唆された。
3. P1 day7 で回収した細胞に CFSE を用いて蛍光標識し、P2 day4 まで培養後に sorting を行った。分裂速度の速い細胞群 (ヒストグラム左側 45%、30%) と遅い細胞群 (右側 45%、30%) を分取し、48 well plate に置いた coverslip 上に細胞密度 1.0×10^5 cells/well で播種した。これを 1 週間培養後、ヌードマウス背部皮下に移植を行った。移植 2 週間後、4 週間後で組織片を回収し、トルイジンブルー染色による軟骨基質の評価を行ったところ、分裂速度の速い細胞群は、in vivo において高い軟骨基質の産生を示した。通常の移植では、様々な基質産生能を有する雑多な細胞を同時に移植していたことが推測され、分裂速度の速い細胞群の分取、濃縮することで、より高い軟骨再生能を有する細胞集団の移植が可能であることが示唆された。
4. 分裂速度の異なる細胞群のなかに体性幹細胞様の特性を有する細胞が存在するかを検討するために、幹細胞特性の一つであるコロニー形成能を、分裂速度の異なる各群において比較した。その結果、分裂速度の速い細胞群、特に rapid 30%でコロニー形成能が高いことを示した。
5. CFSE と細胞表面マーカーを組み合わせ、flow cytometry にて解析した結果、分裂速度の速い細胞群に単独で明瞭な特異的なマーカーを検出することはできなかったが、細

胞分裂速度の違う群において異なる発現傾向を示す CD26、SSEA-3 と、群間での発現傾向に差は見られなかったが二峰性の発現を示した CD90 を明らかにした。

6. CD26、SSEA-3、CD90 の 3 つのマーカーに対する抗体による多重染色を実施し、これらの発現パターンの違いにより区別される細胞群間のコロニー形成能に違いがあるかを検討した。Control より有意に高いコロニー形成能を認めた組み合わせは SSEA-3 (-) CD26 (-) CD90 (+) であり、約 2 倍高い結果となった。加えて、その細胞集団は、CFSE ヒストグラムの rapid 30% に半数が分布していることを確認した。この結果から、細胞分裂速度の速い rapid 30% 細胞と SSEA-3 (-) CD26 (-) CD90 (+) 細胞が似たような性質を有する細胞集団である可能性が推察された。

以上、本論文は、ヒト耳介軟骨細胞において、分裂速度の異なる細胞が存在することを明らかにし、軟骨基質産生の高い細胞群を同定、濃縮する方法として、細胞分裂速度による分取が活用できることを実証した。本研究は、これまで成しえていない生理的な軟骨と同等な様な構造を有する再生軟骨組織を構築するために、軟骨再生医療における有用な細胞濃縮法の確立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。