

審査の結果の要旨

氏名 山脇 孝徳

本研究は軟骨細胞を移植した際の再分化過程において、軟骨細胞の再分化を促進する生体内因子を同定するため、ヒト耳介軟骨細胞をヌードマウスの腹腔内に移植する系にて、腹腔内の細胞性因子および液性因子の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. カバースリップ上に培養した軟骨細胞をヌードマウスの腹腔内に移植すると、移植後2週目以降徐々にトルイジンブルー染色陽性領域を認め、4週目にはラクナの形成など成熟軟骨組織像を示した。HE染色では、1週目では、線維性組織のみで軟骨様組織を認めず、2週目以降では軟骨細胞周囲にホスト由来細胞と思われる細胞の集簇を認め、毛細血管形成も認めた。このことから、軟骨細胞はマウス腹腔内移植後4週目には成熟し、軟骨細胞を移植によって、周辺では毛細血管形成などホスト由来の細胞が何らかの機能を発揮したことが示唆された。また同様の移植系において、透過型電子顕微鏡により詳細に観察すると、移植後1週目から2週目において、軟骨様細胞とマウス由来細胞が近接し、マクロファージ様細胞と細胞間接着を認めた。軟骨細胞移植の軟骨再分化についてマクロファージが何らかの影響を与えていることが示唆された。
2. 移植後のマウス腹腔洗浄液の細胞成分と、ヒト耳介軟骨との接触共培養系では、カバースリップのみを移植した群の細胞成分との共培養と比較し、移植後1-3週目において軟骨細胞の *hCOL2* 発現が上昇したことから、軟骨細胞を移植したマウスの腹腔内細胞は軟骨再分化を促進することが示された。
3. 腹腔内細胞のフローサイトメトリーにて、マクロファージ、B細胞、樹状細胞についてポピュレーションを検討したところ、全ての経過で非移植群より移植群の方がポピュレーションは高く、カバースリップあるいは軟骨細胞を移植することはマクロファージのポピュレーションを上昇させた。さらにマクロファージは2週目において細胞移植群の方がカバースリップ移植群と比較し有意に低く、3週目においても傾向は維持されたことから、移植片上の軟骨細胞の有無によって、腹腔内に浮遊している細胞のポピュレーションに変化が生じ、腹腔内細胞の免疫反応が軟骨細胞の有無によって変化したことが示唆された。
4. 腹腔洗浄液上清を回収し、ヒト耳介軟骨細胞ペレット培養の添加因子としたところ、軟骨細胞移植後2週目、3週目に回収した上清において、基礎培地で培養したものと比較し4倍以上の *hCOL2* 発現上昇を認めた。そのため2週目に回収した上清

をプロテオームアレイで解析し、E-selectin, IL-1 β , IL-1 α , Thrombopoietin, IL-12, FGF acidic, IL-13 が高発現しており、軟骨再分化候補因子として同定された。

5. 上記のサイトカインを添加因子として軟骨細胞を培養した際、IL-1 β 、IL-12、IL-1 α 、TPO が有意に hCOL2 発現を上昇させ、IL-1 β 、IL-12 は4倍以上の発現を上昇させた。
6. ヒト耳介軟骨が産生する IL-1 β が autocrine に軟骨再分化に影響を与えている可能性もあるため、抗ヒト IL-1 β 抗体を添加し軟骨細胞を培養したところ、DMEM/F12 で培養した時に IL-1 β 抗体を添加した群で有意に低下し、BIT でも有意差を認めないものの、COL2 発現は減少傾向であった。このため軟骨細胞が分泌する IL-1 β は軟骨細胞の COL2 発現を上昇させる可能性があるとし唆された。
7. 細胞移植群から回収した 2 週目、3 週目の腹腔洗浄液に抗マウス IL-1 β 中和抗体を添加し、ヒト軟骨細胞を 1 週間培養したのち COL2 発現を検討した。2 週目、3 週目の腹腔洗浄液を用いた培養において、中和抗体添加により COL2 発現が減少する傾向を認めた。

以上、本論文は、ヒト耳介軟骨の再分化過程において、軟骨細胞を含む移植片は移植後、マクロファージやリンパ球などの宿主由来細胞の侵入を受ける際に、アップレギュレートした IL-1 β などの因子が軟骨再生のスイッチを押し、軟骨細胞の再分化に寄与することを明らかにした。本研究は、軟骨再生過程における炎症性サイトカインの再生促進作用の解析に重要な功績をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。