

審査の結果の要旨

氏名 松山 真理子

本研究は、生体内で再生組織を構成する再生前駆細胞を同定して選別するとともに、生体内の修復力・再生力のメカニズムを明らかにし、両者を活用して軟骨再生組織の移植前成熟を実現し、再生軟骨組織の特性を飛躍的に向上させることを目的として行い、下記の結果を得ている。

1. 培養 EGFP 陽性耳介軟骨細胞から成る再生軟骨組織をマウスに移植し、移植後主要臓器における EGFP 陽性耳介軟骨細胞の移動や転移を観察したところ、全ての臓器において、陽性細胞は見られなかった。再生軟骨を作製する培養軟骨細胞には、間葉系幹細胞にみられるような非常に高い遊走能により積極的に組織修復に関わる循環型細胞は存在せず、血行を介して他臓器へ移動あるいは転移し、異所性に生着、増殖する可能性は極めて低いと推察された。

2. 軟骨再生に直接寄与するような細胞（軟骨再生前駆細胞）の数を推計するため、カバースリップに軟骨細胞を単層培養したものを移植して軟骨再生を組織学的に観察したところ、移植後 1 週から 16 週まで軟骨領域数（島状の数）はほぼ一定であった。これらの再生軟骨領域は軟骨細胞が島状に集塊を形成する傾向があることを勘案すると、特定の培養軟骨細胞が生体内でモノクローナルに増殖し、再生軟骨領域を形成すると推測された。軟骨再生前駆細胞の存在確率は、培養軟骨細胞の直径を約 0.1 mm と仮定すると、島状再生軟骨領域の平均数が 1 mm あたり 0.8 個であるため、約 8% と推計された。

3. 培養軟骨細胞の増殖速度の分布を検索するため、培養軟骨細胞を PKH で蛍光標識し、増殖に伴う希釈の分布を flow cytometer 測定した。蛍光標識後の培養 0 日目では、標識濃度を示すヒストグラムは鋭い波形を示したが、培養 6 日目まで経時的に蛍光強度は減弱し、ピークは鈍化しヒストグラムが扁平化した。標識細胞群では経時的に波形が徐々に幅広になり、分裂速度の速い細胞群と遅い細胞群とが存在することを確認した。

4. PKH26 による蛍光標識を行って培養し、分裂速度の速い細胞集団（全体の 50%）を分取し、遅い細胞集団（残りの 50%）と比較した。in vitro の系では、分化誘導後の II 型コラーゲン遺伝子の発現、GAG 定量評価において、分裂速度の遅い群にくらべ、速い細胞群では有意に高かった。トルイジンブルー染色組織学的検索においても、分裂速度の速い細胞群の方が遅い群よりメタクロマジーが強い傾向を示した。in vivo の評価においては、移植後 8 週の再生軟骨組織のトルイジンブルー染色を行い、分裂速度の速い細胞群では遅

い群と比較し、広範にメタクロマジーが観察され、良好なプロテオグリカンの蓄積と軟骨再生が示された。

5. 生体内への移植により再生前駆細胞の成熟を誘導する因子を検索するために、軟骨細胞を移植した周囲組織における各種因子の局在を免疫組織化学染色で評価したところ、マクロファージとGCSFのみ1週より再生軟骨の周囲に局在が観察された。軟骨の成熟を誘導する、移植母床側から産生される因子はマクロファージより分泌されるものと推測された。

6. マクロファージの軟骨成熟に対する作用をより詳細に検討するため、腹水中の液性成分や細胞を回収して評価しやすい腹腔内移植を検討したところ、腹腔内移植で、再生軟骨の形成が観察された。軟骨細胞を腹腔内に移植し、移植後に回収した腹水中の液性成分と細胞成分の、軟骨分化における効果を検索するため腹水上清ならびに腹水細胞と軟骨細胞との共培養を行った。Ⅱ型コラーゲンの発現増強が最も観察された2週のサンプルに関し、gene chipによる遺伝子発現の網羅的解析を行った結果、IGFBP4に着眼した。心筋では、IGFBP4はFrz8やLRP6というウィントシグナルに関わるようなファクターに直接作用して心臓発生を制御している。培養軟骨細胞の場合、再生前駆細胞にこれらのファクターが高発現しており、特異的に働いている可能性がある。そのため、IGFBP4はウィントシグナルを介して再生前駆細胞に特異的に作用している可能性があると考えられた。

以上、本論文はこれまで未知に等しかった軟骨再生前駆細胞を同定して選別するとともに、生体内の修復力・再生力のメカニズムを解明する点において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。