

審査の結果の要旨

氏名 川西 誠

本研究は再生医療における荷重関節軟骨再生において細胞外マトリックスの産生に重要とされている静水圧負荷の検証をするために、今まで存在しなかった圧負荷時も培地のガス交換が可能で長期負荷の可能な静水圧負荷培養装置を構築することと、脱分化した関節軟骨細胞より作製した3次元培養体 (pellet) に対する間欠的な生理的な静水圧負荷を行いその再分化促進効果について検証することを試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 培養液を循環水から隔離するためにガス透過性が確認されバクテリア・ウイルス・フリーである血小板自己血輸血用のポリオレフィン製のカワスミ分離バッグを加工して細胞を封入し耐圧カラム内 RO 水に沈めることにより、培地と循環水系を分離し、循環水系でガス交換可能とするシステムを構築した。
2. ガス圧測定ではバッグ内 $p\text{CO}_2$ は実験開始時で平均約 4.3% その後圧負荷開始後 24 時間で 5% となり平衡に達し、4 日後まで持続した。一方 $p\text{O}_2$ は開始時平均 21% で 24 時間後に 18.5% となり平衡に達し、4 日後まで持続した。どちらもバッグで良好にガス交換されている事が示された。
3. 5 継代目までの 2 次元培養の結果、仔牛膝関節軟骨細胞は 2 系代目より Type II コラーゲン・アグレカンの mRNA 発現が減少し Type I コラーゲン mRNA が増加し 3 継代目では Type I コラーゲン mRNA の発現はピークとなり、Type II コラーゲン mRNA の発現はほぼ失われ、仔牛関節軟骨細胞では 3 継代目の細胞が脱分化しているとみなせる事が示された。
4. この脱分化した軟骨細胞を用いて pellet を作製し、間欠的静水圧を負荷した pellet は Aggrecan と Type II コラーゲンのバンドが負荷していない pellet よりもはっきりと出現していた。半定量解析はそれぞれ NIHimage を使用して、GAPDH で補正を行い、Microsoft Excel の統計解析用マクロプログラムの unpaired Student's t-test を用いて危険率 1% 未満を有意差有りとした。Aggrecan mRNA の発現は圧負荷を行った群で有意に上昇しており、負荷していない群の約 5 倍 ($m \pm \text{SEM}$ (n=4), $P < 0.01$) を示した。Type I コラーゲン mRNA 発現は圧負荷を行った群も、行っていない群も有意差は認められなかった。Type II コラーゲン mRNA の発現は圧負荷を行った群で有意に上昇しており、負荷していない群の約 4 倍 ($m \pm \text{SEM}$ (n=4), $P < 0.01$) を示した。以上より半定量ではあるが、3 継代目で脱分化傾向に向かっていた仔牛膝関節軟骨細胞は pellet にすることで Type I コラーゲン mRNA の発現は減少した。さらに生理的な間欠的静水圧を負荷す

ることにより、軟骨細胞に特異的な Aggrecan と Type II コラーゲン mRNA の発現は静水圧を負荷しない群よりもそれぞれ約 5 倍、4 倍と増加し再分化の傾向がある事が示された。

5. 組織染色では H-E 染色を比較観察してみると、組織形成は間欠的静水圧を負荷した pellet も負荷していない pellet も壊死も無く組織形成は良好であった。アルシアンブルー染色の比較では静水圧を負荷していない pellet も染色性を認めたが、静水圧を負荷した pellet の染色性はさらに良好であった。サフラニン O 染色による比較では静水圧を負荷していない pellet もわずかに染色性を認めたが、静水圧を負荷した pellet は明らかに染色性が良好であった。以上より mRNA の発現だけでなく、間欠的静水圧を負荷した pellet では静水圧を負荷しない pellet よりも胞外マトリックスが良好に産生されている事が示された。

以上、本論文は脱分化した仔牛膝関節軟骨細胞より作製した 3 次元培養対に対してガス交換可能なシステムで間欠的静水圧負荷を行うことにより再分化の傾向が起こる事を明らかにした。本研究はさらに改良を進めることにより、これまで脱分化を起こしたまま自家軟骨細胞移植を行っていた関節軟骨再生医療の現場で再分化した状態で移植可能になると考えられる。実現すれば関節軟骨治療に新たな局面をもたらすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。