

審査の結果の要旨

氏名 山岡 尚世

本研究は、臨床に応用可能なインプラント型再生軟骨用足場素材システムを構築することを目的として、軟骨細胞に三次元環境を提供できるハイドロゲル型足場素材について、現在、または近い将来に臨床的に利用可能な材料を比較検討し、さらに、ハイドロゲルを用いたペレット型再生軟骨に三次元形状を付与する目的で多孔体型足場素材との併用を試み、その有用性とハイドロゲルと併用する多孔体足場素材の条件を検討して、下記の結果を得ている。

1. アテロペプチドコラーゲン、アルジネート、PuraMatrix™の各種ハイドロゲル中で軟骨細胞の高密度培養を行い、ペレット型再生軟骨を作製したところ、ハイドロゲルを使用しないペレット型再生軟骨と比較して、いずれのハイドロゲルでも II 型コラーゲンの mRNA の発現が増加した。さらに insulin および BMP-2 の刺激により軟骨細胞の基質産生を促進させたところ、アテロペプチドコラーゲンでは II 型コラーゲンが、アルジネートではグリコサミノグリカンが顕著に集積した。アテロペプチドコラーゲン中の軟骨細胞では、 $\beta 1$  インテグリンの発現が増加しており、豊富な細胞基質シグナル伝達が示唆された。一方、n-カドヘリンの発現はアルジネートでは低く、個々の細胞の孤立性が保たれることにより軟骨細胞の活性が維持されている可能性が示唆された。PuraMatrix™ 中での基質合成は他と比較して少量であり、ゲル化後のヤング率も最も低く、ゲル化能および細胞と基質の支持能に改善の余地があることが示唆された。基質産生能が高く、また組織欠損補填剤としての臨床実績を考慮すると、現時点ではハイドロゲル型足場素材としては、アテロペプチドコラーゲンが第一選択と考えられた。

2. アテロペプチドコラーゲンを用いたペレット型再生軟骨を *in vitro* において培養すると、4 週間で約 70% まで収縮し、アテロペプチドコラーゲングルのみでは形状保持が困難であることが明らかとなった。そのため、細胞・アテロペプチドコラーゲン混和物を PLLA 多孔体型足場に投与し、形状変化を追跡したところ、長期にわたり形状保持が良好であった。そのため、細胞・アテロペプチドコラーゲン混和物を多孔体型足場に投与することによりインプラント型再生軟骨の作製が可能であると思われる。

3. 細胞・アテロペプチドコラーゲン混和物と併用する際の多孔体型足場素材の条件を検討するため自作の PLLA に加え、現在医療用材料として提供されているコラーゲンスポンジ、P(LA/CL) 50:50、P(LA/CL) 75:25 を使用し、インプラント型再生軟骨を

作製した。コラーゲンスポンジは、細胞やアテロペプチドコラーゲンの投与の有無に関わらず、液体に浸漬しただけで50~60%に縮小してしまい、初期形態を保つことが困難であった。一方、P(LA/CL) 50:50、P(LA/CL) 75:25 はいずれも、移植後も形状が保たれており、ほとんど収縮は見られなかった。PLLA も形状が保たれており、ほとんど収縮は見られず、むしろ、PLLA に細胞・アテロペプチドコラーゲン混合物を投与したものは約5%微増していた。生化学的には、コラーゲンスポンジおよびPLLA によるインプラント型再生軟骨では、グリコサミノグリカンとII型コラーゲンの顕著な蓄積が見られた。しかし、P(LA/CL) 50:50、P(LA/CL) 75:25 においては、ほとんど見られなかった。また、組織学的に検討すると、コラーゲンスポンジはサイズが保たれなかったものの、中心部までメタクロマジーが観察され、また PLLA では、他の多孔体型足場に比べ、最も豊富なメタクロマジーが観察された。一方、P(LA/CL) 50:50、P(LA/CL) 75:25 でいずれも辺縁部のみにメタクロマジーがみられ、軟骨細胞が辺縁部にとどまり、中心部まで十分に細胞が浸透していないことが示された。インプラント型再生軟骨を作製する上では、多孔体内部に粘調な細胞・アテロコラーゲン混和物を浸透させることが必須である。そのため、孔径の大きいコラーゲンスポンジや PLLA 多孔体が有利であったと思われる。培養や移植の間に受ける外力に抗するためには十分な剛性が必要であるが、剛性は逆に、細胞・アテロコラーゲン混和物の浸透を困難にさせる。そのためにも500  $\mu\text{m}$  程度の十分に大きな孔径を有する剛体の多孔体が必要であると考えられた。

以上、本論文は、軟骨再生医療の適応を拡大する上で必要なインプラント型再生軟骨を作製するための足場素材について、素材と構造という点から検討を加え、最適化を図った。本研究は、系統的に検討されていなかった軟骨再生用の足場素材に科学的な洞察をあたえ、軟骨再生医療学の発展に貴重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。