

[課程一2]

審査の結果の要旨

氏名 武井美咲

本研究は、再生軟骨の基質量の差(ロット間差)と、作製に用いた培養軟骨細胞における糖鎖の発現傾向とを、レクチンアレイを用いて比較して、レクチン反応値による再生軟骨の基質量予測方法を確立する事により、移植前の培養軟骨細胞の品質管理法を確立する事を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 移植後の再生軟骨(n=19)におけるロット間差の評価を行い、移植後再生軟骨の軟骨基質産生量のばらつきを検討した結果、2型コラーゲン(COL2)やグリコサミノグリカン(sGAG)やトレイジンブルー(TB)染色を検討したところ、ロット間での基質産性能のばらつきが確認され、更にそれぞれの指標が相関傾向にあるため、ばらつきが単なる実験手技や移植手技による誤差ではないことが示唆された。
2. 移植後再生軟骨と高密度3次元培養によって作製した再生軟骨(in vitro 3次元培養)の相関関係を検討し、移植後再生軟骨の再生軟骨基質の指標のばらつきを別の角度から検証したところ、移植後再生軟骨と in vitro 3次元培養の結果には相関傾向がある事が示され、移植後再生軟骨における軟骨基質量のばらつきは、細胞特性を反映している事が示唆された。
3. レクチンアレイを用いた培養軟骨細胞の糖鎖解析を行い、レクチンアレイにより得られたレクチン反応値と軟骨基質量、特に移植後再生軟骨 TB 面積割合との比較を行い、軟骨組織における糖鎖の局在を検討した結果、レクチン反応値と移植後再生軟骨 TB 面積割合との相関を検討し最も相関の高かったレクチンは RCA120 であった。また、RCA120 を用いて軟骨組織のレクチン染色を行ったところ、軟骨細胞のみが染色され、軟骨膜は染色されなかったことから、RCA120 は軟骨組織において軟骨細胞と特異的に結合し、軟骨細胞の局在を示すため、レクチンアレイを用いた軟骨再生予測値に RCA120 を含むことに生物学的意義があることが示唆された。
4. レクチン反応値による軟骨再生予測式の検討を行い、軟骨再生予測値を示すレクチンを含む重回帰式を求めた結果、RCA120、WFA、NPA を用いた軟骨再生予測式として「 $y = 0.563 \times \text{RCA120} - 0.379 \times \text{WFA} + 0.131 \times \text{NPA} - 73.6$ 」を得た。この式により算出される軟骨再生予測値と TB 面積割合との相関は高く、sGAG や COL2 との相関もある程度移植後再生軟骨 TB 面積割合と類似した動態を示すようになったため、本予測式を本研究の目的である軟骨再生を予測する式とした。
5. 得られた軟骨再生予測式が培養軟骨細胞の特性を反映しているかを検証するために、遺伝子解析結果による軟骨再生予測式の検証を行った結果、正の相関のある遺伝子として、

耳介軟骨の弾性軟骨の発生に関わる因子とされる **MSX1** 及び **MSX2** が挙げられ、また、逆相関のある遺伝子として骨転写因子の **RUNX2** が挙げられた。更に、硝子軟骨に特有の転写因子である **SOX5**、**SOX6**、**SOX9** との相関は無かったが、用いた細胞が耳介軟骨組織由来の弾性軟骨であることから、用いた細胞の由来組織の性質と矛盾が無いことが示唆された。また、軟骨基質因子である **ACAN**、**COL1A1**、**COL2A1** との相関は無かったが、軟骨細胞の平面培養を行うと軟骨基質転写遺伝子の発現が低下する事から、これらの遺伝子との相関が無いことは、培養条件から判断して妥当性があると考えた。故に、この軟骨再生予測式が用いた培養軟骨細胞の特性を反映することが示唆された。

以上、本論文はレクチンアレイによる糖鎖解析と培養軟骨細胞の軟骨基質産性能との相関を検討する事によって、レクチンアレイを用いた糖鎖解析が培養軟骨細胞の特性を評価するマーカーの検索方法として有用であることを明らかにした。レクチンアレイを用いた培養軟骨細胞の品質管理研究は今日まで行われておらず、本研究は、今後の再生医療の安全性を高め、安定した品質の再生軟骨の提供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。