

氏名(本籍)	佐藤卓(神奈川県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第3432号
学位授与年月日	平成16年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Hybrid porous scaffolds of synthetic biodegradable polymer and collagen - Application to tissue engineering of cartilage - (生分解性合成高分子とコラーゲンから成る多孔質複合担体の組織工学的軟骨再生への応用に関する研究)
主査	筑波大学教授 博士(医学) 長田道夫
副査	筑波大学教授 工学博士 大島宣雄
副査	筑波大学助教授 博士(医学) 白杵哲
副査	筑波大学講師 博士(医学) 大根田絹子

論文の内容の要旨

(目的)

関節を中心として、軟骨が損傷される疾患は多岐にわたり患者数も多く、罹患者のクオリティーオブライフを著しく損ねている。障害軟骨の局所再生を促す治療法の確立が望まれるが、軟骨組織は自己修復能が低く、損傷軟骨を完全に回復することは困難である。本研究は、軟骨再生治療の臨床応用にむけて、吸収性合成高分子とコラーゲンから成る複合型生分解性多孔質複合担体を用いた軟骨再生の可能性について基礎検討することを目的とした。

(対象と方法)

1) 生体内培養

PolyL-lactic acid (PLLA) sponge 担体と、この孔内にコラーゲン小胞を複合化して PLLA-collagen sponge 複合担体を作成した。幼牛の関節軟骨細胞を両担体に播種し、1週間の生体外培養後、ヌードマウスの背側皮下に移植した。移植後2, 4, 8週間後に各移植片を摘出し、ヘマトキシリン・エオジン (H/E) 染色, サフラニン O 染色, II型コラーゲン特異抗体を用いた免疫染色にて軟骨組織の分化を評価した。

2) 播種効率測定

担体上で効率のよい軟骨組織形成条件を決定するために、厚さ約200 μ mの polyDL-lactic-co-glycolic acid (PLGA) mesh 材料にコラーゲン小胞を複合化して PLGA-collagen mesh 複合担体を作成した。幼牛の関節軟骨細胞から濃度 0.4, 1.0, 2.0, 5.0 $\times 10^6$ cells/ml の細胞懸濁液を作成し、PLGA mesh 担体及び PLGA-collagen mesh 複合担体に播種した。24時間後の接着細胞数を DNA 量測定により算出し、播種細胞数による接着細胞数の商を播種効率として評価した。

3) 脱分化軟骨細胞形質発現解析

担体上で再生した軟骨細胞の分化について検討するために、幼牛の関節軟骨細胞を単層培養した。2継代後 5.0 $\times 10^6$ cells/ml の細胞懸濁液を作成し、PLGA-collagen mesh 複合担体に播種し培養した。0, 2, 4, 12週培養後の担体から total RNA を抽出し、I型・II型コラーゲン及びアグリカン mRNA の発現を Northern

blot 液で検討した。また、培養後の担体を走査電子顕微鏡と組織学的及び免疫組織学的染色法で観察した。

(結果)

1) 生体内培養

PLLA sponge では細胞播種前に湿潤を要したが、PLLA-collagen sponge は懸濁液の滴下のみで容易に細胞播種できた。播種後、担体は形態を維持して白色組織を形成した。組織学的には軟骨細胞に類似した小円形細胞とサフラニン O 及び抗 II 型コラーゲン抗体に陽性の均質な細胞外基質を認めた。これらの染色陽性な細胞外基質の領域は両担体ともに経時的に増加したが、PLLA-collagen sponge 内でより広範囲であった。

2) 播種効率測定

細胞播種効率は PLGA mesh (28 ~ 51%) より、PLGA-collagen mesh (50 ~ 79%) と高く、かつ均一に分布した。両担体とも播種効率は播種細胞濃度に相関した。DNA 量による各濃度での播種効率は、 0.4×10^6 cells/ml を除き PLGA mesh よりも PLGA-collagen mesh が統計学的有意差をもって大きかった。

3) 脱分化軟骨細胞形質発現解析

Northern blot 法で、単層培養下の細胞は急速に II 型コラーゲン及びアグリカン mRNA の発現が減少し、I 型コラーゲンの発現が増加して軟骨細胞の脱分化が示唆されたが、2 回継代培養後 PLGA-collagen mesh 担体内で培養された細胞は担体内培養期間の増加につれて II 型コラーゲン及びアグリカン mRNA の発現が増加し I 型コラーゲンの発現が減少した。走査電子顕微鏡観察では培養後 4 週の時点で担体内のコラーゲン小腔は播種細胞が形成した組織によって満たされていた。組織学的及び免疫組織学的観察では担体内に軟骨細胞様の小円形細胞とサフラニン O 及び抗 II 型コラーゲン抗体に陽性の均質な細胞外基質を有する細胞形成を認めた。

(考察)

軟骨細胞を播種した PLLA-collagen sponge 複合担体は、生体内で形態を維持し、内部に PLLA sponge 担体より広範囲に軟骨様組織を形成した。これは複合担体が手術操作や生体内培養に耐えうる機械的強度と軟骨組織の形成性を有することを示し、複合化により高強度で細胞親和性が高いという両者の利点が担体に備えられたと考える。

また、PLGA-collagen mesh は約 80% と、PLGA mesh より有意に高い播種効率を示した。これは複合化により播種効率を増加し得るというもうひとつの重要な利点が加わったことを示している。さらに、脱分化軟骨組織を播種し生体外培養した PLGA-collagen mesh の細胞形質発現解析において、脱分化軟骨細胞が分化形質を再獲得し、軟骨様組織を再生することを示している。

以上から、本複合担体により限られた量の自己軟骨細胞を単層培養で増加させた後、複合担体内で再分化させて効率よく分化軟骨細胞を再生することが可能であることが明らかとなった。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、合成高分子とコラーゲンから成る複合担体という新しい素材を用いて、生体内軟骨再生の臨床応用の可能性を検討した。本研究から、PLLA-collagen sponge 複合担体は生体内培養において形状を保つに足る機械的強度を有し、この担体を用いた軟骨細胞の生体内培養において軟骨様組織が形成されることを示した。さらに、PLGA-collagen mesh 複合担体は軟骨細胞生体外培養において播種効率を有意に増加させ、脱分化した軟骨細胞の再分化を促進させることを明らかにした。これらの結果は、この新しい複合担体が軟骨組織再生の臨床応用に有用であることを示し、これまでの類似の研究からさらに臨床応用に近づける大変意義のあるものと考えられる。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。