

氏名(本籍)	むら た とし み (熊本県) 村 田 利 己 (熊本県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 2,139 号		
学位授与年月日	平 成 11 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
学位論文題目	生体外軟骨組織再生を目指した軟骨細胞培養システムの開発		
主 査	筑波大学教授	工学博士	大 島 宣 雄
副 査	筑波大学教授	医学博士	三 井 利 夫
副 査	筑波大学併任教授	工学博士	大 箸 信 一 (工業技術院生命工学工業技術研究所)
副 査	筑波大学助教授	医学博士	宮 川 俊 平
副 査	筑波大学助教授	医学博士	落 合 直 之

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

関節軟骨は自己修復能が乏しく、著しい欠損では組織学的に硝子軟骨に回復する修復は期待できないと考えられている。関節疾患治療の新しい方向として、生体外で単層培養し増殖させた自家組織由来の軟骨細胞を懸濁液として注入する培養軟骨細胞移植法が注目されている。しかしながら、軟骨細胞を単層培養して増殖させると、細胞外マトリクスなどの合成能を失い、間葉系細胞に脱分化してしまうという問題点が指摘されている。従って、培養軟骨細胞移植を実現するためには、軟骨細胞を生体外でその形質を維持したまま増殖させ軟骨組織を再構築する基礎技術の確立が必要である。

関節軟骨は歩行などの際に負荷を受けており、このような力学的ストレスが組織の形成や機能維持に重要な役割を果たしていることが知られてきている。軟骨組織はプロテオグリカンなど荷電性高分子により水分子が保持されており、高い含水率を保っている。そのため荷重は主として静水圧により軟骨細胞に負荷されると考えられている。そこで静水圧の変動で細胞外マトリクスの産生がどのような影響を受けるかについて、一定の圧力や間欠的な圧力の負荷、様々な圧力値の条件で研究が進められてきた。しかしそれらの静水圧加压システムは、真の意味の静水圧が負荷されていないことや長期培養ができないなどの欠点があった。また、静水圧に対してどのようなメカニズムで軟骨細胞が応答し、遺伝子の発現レベルを変化させるのかはいぜん不明のままである。

そこで本研究では、培養液を一定の速度で灌流することにより軟骨細胞を長期培養することができ、かつ液相を介した加压により純粋な静水圧を負荷することが可能な静水圧負荷細胞培養システムの開発を行うと共に、静水圧が細胞外マトリクスの産生に及ぼす影響を評価することを目的とした。また、細胞内シグナル伝達の上流に位置するセカンドメッセンジャーとしての細胞内カルシウムイオンに注目して、静水圧負荷の条件下で軟骨細胞内のカルシウムイオン濃度変化をリアルタイムで可視化できるシステムを構築し、静水圧負荷に対する軟骨細胞の初期応答を検出することを目的とした。この目的のために、以下の2つの実験研究を行った。

実験1：静水圧加压による細胞培養システムの開発に関する研究

(方法、結果および考察)

液相に直接圧力を加えることができ、関節軟骨内の生理的な静水圧域をカバーし、歩行等による0から0.5Hz

の圧力変動をシミュレートできるような装置を作製した。酵素消化によって分解されたウシ軟骨細胞をウシ由来のタイプIコラーゲンでコーティングした円形のカバーガラス上に播種した。加圧実験では、この単層培養カバーガラスをスペーサーで隔離して、培養カラム内に積層した。この装置によって次の3つの静水圧負荷実験を行った。

第1のシリーズの実験では、静水圧の実質的な影響を検討した。 5×10^5 cells/cm²の密度で細胞を播種し、7-14日間前培養を行った。0 MPa (大気圧下, カラム中) および5 MPaの一定の静水圧を加えながら、8および48時間カラム中で培養した。3つの実験のすべてにおいて、大気圧下、24ウェルプレート (5% CO₂ インキュベーター中) において培養した細胞を対照群とした。細胞外マトリクスの蓄積を測定するために、ケラタン硫酸プロテオグリカンを指標として、グアニジン抽出物をELISA法で定量した。8時間連続的な静水圧を加えた群は、対照群および大気圧群に比べてこの値が増加した。このことから、5 MPaの静水圧が細胞外マトリックス合成に促進的な効果がある可能性が示唆された。

第2シリーズの実験では、単層培養系を用いて、培養液の灌流 (0.3 ml/min) を伴った加圧下での長期培養の可能性を検討した。軟骨細胞は 5×10^5 cells/cm²の密度で播種し、前培養を3日間行った。その後、灌流させながら2.8 MPaの静水圧を負荷して培養した群と、灌流させながら大気圧下で培養した群に分け、4日間カラム中で培養した。コンドロイチン4-硫酸プロテオグリカンの蓄積量は、培養液を灌流させて培養することにより、対照群よりも42%増加した。2.8 MPaの静水圧を負荷した群はさらに蓄積量が増加した。ケラタン硫酸プロテオグリカンの蓄積量も同様の傾向を示した。

第3シリーズの実験では、一度増殖させた軟骨細胞に及ぼす灌流を伴った静水圧の影響を検討した。第2シリーズの実験に比べ、細胞を1/10の密度で播種し、8日間前培養を行った。その後、第2シリーズの実験と同様な群に分け、8日間カラム中で培養した。コンドロイチン4-硫酸プロテオグリカンの蓄積量は培養液を灌流させて培養することにより、対照群よりも204%増加した。2.8 MPaの静水圧を加えた群は、30%増加した。ケラタン硫酸プロテオグリカンの蓄積量も同様の傾向を示した。しかし第2シリーズの実験に比べて、両プロテオグリカンの蓄積量は共に減少していた。このことは、増殖させた軟骨細胞の静水圧に対する感受性は、軟骨細胞としての形質を保持した細胞の感受性に比べて異なっていることを示唆していると考えられた。

実験2：加圧下における軟骨細胞の細胞内カルシウムイオンのリアルタイム観察法に関する研究

(方法、結果および考察)

静水圧加圧下での細胞内カルシウムイオン濃度の測定を行うために、厚さ2.0 mmのサファイアガラスの窓を有する静水圧下培養細胞の観察チャンバーを作製した。このチャンバーに、静水圧加圧装置で発生させた定常的および間欠的な静水圧を直接導入した。

軟骨細胞をコラーゲンをコーティングしたサファイアガラス円板上に播種し、2-3日間前培養した。軟骨細胞をカルシウムイオン蛍光インジケーターであるFura-2で染色した後、340 nmおよび380 nmの励起光を交互にサファイアガラスを通して軟骨細胞に照射した。こうして得られた蛍光像を高感度の固体撮像素子カメラによってとらえ、細胞内カルシウムイオン濃度の画像解析システムを用いて画像処理することによりレシオイメージ (340 nm/380 nm) を得た。5 MPa, 0.5 Hzの間欠的な静水圧を60秒間、軟骨細胞に加えたところ、加圧直後より細胞内カルシウムイオン濃度のレシオが周期的に上昇と下降を繰り返す振動現象が観察された。本研究で用いた静水圧加圧システムは、培養液の流れや溶存ガス濃度などの因子の影響を排除した条件下で軟骨細胞に静水圧を加えることが可能であるため、観察された細胞内カルシウムイオン濃度変化は静水圧の軟骨細胞に対する実質的な効果を反映しているものと考えられた。

審査の結果の要旨

培養細胞系を組織工学 (tissue engineering) 的手法により操作することによって臓器機能を再生させる新しい再生医工学的治療法が近年注目されるようになり、人工の皮膚についてはすでに臨床応用の段階に達している。軟骨細胞はこれについて早期の臨床応用が期待される再生医工学の重要な研究テーマとなっている。このような点において、軟骨細胞培養システムの開発を目的とした本研究の意義は大きい。著者は新しいバイオリアクターを試作して、特に軟骨細胞培養系の機能が静水圧の負荷、培地の灌流による流れの負荷などの物理学的因子によって改善される可能性を示したことは新しい知見を加えたものとして評価できる。この成果を基礎として、より高密度かつ大量に軟骨細胞を培養できる方法を開発することが望まれる。著者はまた、物理的因子による軟骨細胞機能を細胞サルシウムに注目してシグナル伝達系のレベルで可視化するため新しいシステムを開発することに成功している。このシステムをさらに改良することにより、この分野の研究の新しい有力な手法が得られることが期待される。

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。