

氏名(本籍)	よし おか とね かず (山梨県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第5468号		
学位授与年月日	平成22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	人間総合科学研究科		
学位論文題目	家兔骨髓細胞由来三次元軟骨様組織同種移植による軟骨全層欠損修復の試みと蛍光バイオイメージング技術を用いた移植細胞の追跡		
主査	筑波大学教授	医学博士	千葉 滋
副査	筑波大学教授	博士(医学)	大根田 修
副査	筑波大学准教授	博士(獣医学)	杉山 文博
副査	筑波大学講師	博士(医学)	三好 浩 稔

論文の内容の要旨

(目的)

動的回旋培養法を用いて、家兔骨髓細胞から構築した三次元軟骨様組織同種移植法の軟骨全層欠損修復に対する有用性を明らかにすること、およびナノパーティクル(量子ドット)を用いた蛍光バイオイメージング技術により、移植後の細胞動態を追跡することを目的とした。

(対象と方法)

12日齢家兔の長管骨骨髓腔から細胞を採取した。接着性細胞を単層培養した後に動的回旋培養システムに播種、軟骨分化誘導を行い、三次元軟骨様組織を構築した。細胞内への量子ドット導入は、モータリンと呼ばれる細胞表面蛋白質に対するモノクローナル抗体と量子ドットの複合体を作製し、抗原抗体反応によるエンドサイトーシスで行った。10週齢家兔大腿骨滑車部に直径5.0mm、深さ4.0mmの軟骨全層欠損を作製し、三次元軟骨様組織を同種移植した。三次元軟骨様組織移植群、欠損放置群を設定し4、8、12週後に組織学的、生化学的に評価した。量子ドット導入三次元軟骨様組織移植群は4、8、26週で評価した。

(結果)

組織学的評価において、移植群では4週の時点で硝子軟骨様組織での欠損修復が得られ、12週までの経過で隣接正常軟骨に近い軟骨層が徐々に骨に置換された。明らかな関節炎所見、移植後の死亡、組織学的リンパ球浸潤所見は認めなかった。組織学的スコアリングでは、術後4、8週において、移植群が欠損放置群に比し有意に良好な軟骨様組織で修復が得られていた。生化学的評価では全評価週において移植群の修復組織内グリコサミノグリカン含有量が高値を示したが統計学的有意差は認めなかった。量子ドット導入三次元軟骨様組織移植群において、その蛍光は4週では修復組織の深層から中間層に観察され、8週では修復組織全体の骨髓間質、軟骨下骨の骨梁壁、軟骨層部に観察された。26週では、観察される蛍光は著明に減少し、軟骨下骨の骨梁壁にわずかに蛍光が観察されたのみであった。

(考察)

本研究では、骨髓を構成し、接着能を有する雑多な細胞集団を単層培養し、三次元培養においては軟骨分化誘導に反応する細胞群が硝子軟骨様組織を構築したと考えられる。移植群は欠損放置群と比較し、硝子軟

骨様組織による欠損修復が促進されたが、量子ドットを用いた移植細胞の追跡において、その蛍光は軟骨層部よりも骨髄間質部に多く観察された。このことより、移植細胞が直接軟骨へ分化する以外に間接的にその欠損修復に寄与した可能性が示唆された。また本研究は免疫抑制剤を用いずに行った同種移植モデルであり、移植免疫の関与を考慮する必要がある。臨床応用への課題として、さらなる修復機序解明のためのより詳細な検討が必要であり、すでに臨床応用されている培養骨髄間葉系細胞移植との比較を自家移植モデルで行うことで、軟骨分化誘導を行う本手法の有用性が明らかになるものと考ええる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

関節全層欠損に対して自家骨髄細胞を利用して新たな方法の開拓するための基盤研究として行われた研究である。三次元培養技術を利用して骨髄由来細胞を培養することにより軟骨様組織を得る、という先攻研究に基づき行われた。家兎で関節全層欠損モデルが作成され、培養する骨髄細胞に抗体を結合させた蛍光性の微細粒子を取り込ませて長期間途トレースできるように工夫がなされた。培養細胞由来軟骨様組織を移植した群では、対照群と比べ早期に良好な硝子軟骨様組織によって欠損が修復されることが、はじめて証明された。

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。