

氏名(本籍)	鎌田浩史(宮崎県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博乙第2437号		
学位授与年月日	平成21年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	アルジネート培養系における軟骨細胞のヒアルロン酸合成能力と年齢的要素の検討		
主査	筑波大学教授	医学博士	住田孝之
副査	筑波大学教授	獣医学博士	八神健一
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	松本功
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)

関節軟骨は約2～7mmの非常に薄い組織であるが、関節機能の上で重要な役割を担っている。その組織学的構成は非常に特殊で、豊富な軟骨基質の中に軟骨細胞は2%程度しか存在していない。また、軟骨細胞は分裂能力が低く、活動性は高くない。そのため、関節軟骨にいったん損傷が生じると、損傷治癒機転が働きづらく自己修復に乏しい。外傷に伴う軟骨欠損や、離断性骨軟骨炎、変形性関節症などで発生した軟骨病変に対しては有効な治療方法がないのが現状である。

そのアプローチとしてTissue Engineeringが検討されている。現在までに自家軟骨移植、自家細胞培養など行われているが、一つの問題点として、使用するドナーである自家の年齢があげられる。特に関節症の治療においては多くが高齢者であり、年齢的な変化を無視することはできない。

本研究の目的は、異なる年代(胎児, 若年, 成年)のウシの軟骨より採取した軟骨細胞を培養し、その合成、代謝能力を比較することである。

目的1: 軟骨基質の年代による合成、代謝の違いをコンパートメント毎に明らかにする

目的2: ヒアルロン酸分子の年代による大きさ(分子量)の違いを明らかにする

(対象と方法)

ウシを3つの年代に分け(妊娠第三期の胎児: 胎児細胞, 生後14～18ヵ月: 成年細胞, 生後5～8年: 老年細胞), 成年と老年のウシからは中手指節間関節軟骨を、胎児からは肩関節, 股関節, 膝関節より軟骨組織を全層にわたりスライスし採取した。sequential enzyme digestionといわれる2段階の連続酵素処理により軟骨細胞を完全に分離し、1.2%に調節したアルジネートの中に 4×10^6 cells/mlの割合にて均一なビーズ状の封入体を形成した。これらを最高14日まで培養し、培養終了したビーズはキレート剤にて溶解し、細胞周囲基質(CM)と細胞外基質(FRM)に分離した。それぞれのコンパートメントにおいて、DNA, プロテオグリカン, コラーゲン, ヒアルロン酸の定量を行った。さらに、アガロースゲルによる電気泳動でヒアルロン酸分子量の測定を行った。

(結果)

細胞の増殖能力を DNA 量で比較すると成年細胞が最も増殖し、7日目で3.0倍、14日目で5.3倍程度に増えた。最も少なかったのは胎児細胞で、14日目でわずか2.3倍に過ぎなかった。

プロテオグリカン量は、年代が上がるにつれて全体量は少なくなった。またコンパートメント毎では、細胞外基質より細胞周囲基質に年齢差が顕著に認められた。

コラーゲン量は、年代の上昇に伴い生成量は減る傾向にあるものの、7日目に成年細胞が生成するコラーゲン量は胎児細胞が生成するコラーゲン量よりも上回っていた。14日目においてはコラーゲンの合成総量は年代とともに減少した。

ヒアルロン酸の総量は、7日目、14日目とも年代上昇とともに多くなった。コンパートメント毎にみると、年代上昇により細胞周囲基質で少なくなり、細胞外基質で多くなる傾向があった。

プロテオグリカンに対するヒアルロン酸の比率（ヒアルロン酸／プロテオグリカン）は年代の上昇とともに高くなる傾向を示した。

ヒアルロン酸分子量を測定したところ、電気泳動では予想以上に分散した。各年代で比較すると、胎児細胞が合成したヒアルロン酸は成年、老年細胞に比較して分子量の大きい傾向を認めた。

(考察)

プロテオグリカンとコラーゲンの総量は細胞の年代上昇により少なくなる傾向にあったが、ヒアルロン酸の総量は年代上昇に伴い多くなった。これを2つのコンパートメントにおいて比較すると、細胞周囲基質で保持される量はヒアルロン酸でも年代とともに減少した。またプロテオグリカンに対するヒアルロン酸の割合は年代の上昇とともに増加した。これらより、ヒアルロン酸は年代とともに増加傾向を示すものの、細胞周囲基質ではプロテオグリカンと十分に結合できない可能性があると考えられる。

ヒアルロン酸の分子量は、細胞周囲基質および細胞外基質どちらにおいても年代の上昇に伴い小さくなる傾向にあることが示された。つまり軟骨細胞が生成するヒアルロン酸の大きさは年代により変化するものと考えられる。

軟骨細胞の異化作用、代謝については簡単に証明することはできないが、細胞周囲基質の合成能が年代上昇に伴い減衰することを裏付けるものと思われる。

(結論)

アルジネート培養系において軟骨細胞を培養し、年代ごとに軟骨基質の合成能力を比較した。ヒアルロン酸合成総量では増加傾向を認めたが、細胞周囲基質では減少しており、機能的にプロテオグリカンなどと結合できないものと考えられる。また、ヒアルロン酸の分子量も年代上昇とともに低下しており、軟骨基質合成の年代的限界を示唆するものと思われる。Tissue Engineering や軟骨移植では使用する細胞や組織の年齢を十分考慮する必要がある。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、関節軟骨の再生治療を確立するために、ウシの軟骨についてアルジネート培養系を用いて、年代による合成・代謝およびヒアルロン酸分子の違いを明らかにする事を目的とした。その結果、年代上昇とともに、ヒアルロン酸が細胞周囲基質で減少し、その分子量も低下していた。この事実から、ヒアルロン酸が年代上昇によりプロテオグリカンと結合できない可能性が示唆された。本研究成果は、将来の軟骨再生に使用する細胞を選択する上で重要な知見を示しており、世界的にも高く評価されている。

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。