

氏名(本籍)	辰村正紀(茨城県)			
学位の種類	博士(医学)			
学位記番号	博甲第5814号			
学位授与年月日	平成23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	間欠的静水圧刺激下に培養した軟骨細胞 -椎間板再生を目指して-			
主査	筑波大学教授	医学博士	長田道夫	
副査	筑波大学教授	医学博士	住田孝之	
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	森下由紀雄	
副査	筑波大学助教	博士(理学)	山下年晴	

論文の内容の要旨

(目的)

変性した椎間板の再生を、自家軟骨細胞を用いて行うための基礎検討として、静水圧刺激にて細胞増殖や基質の産生を促す培養至適条件の設定を目的とした。

(対象と方法)

仔牛の肩及び肘関節中間層から分離した 5.5×10^5 個の軟骨細胞を 55 μ l のコラーゲンゲルに包埋した後、以下の実験を行った。

1. 刺激期間比較実験：いずれも最大 0.5MPa、0.5Hz の周期的静水圧刺激を用いて 4 日間の静水圧培養後に 10 日間の大気圧培養を行う 4d-HP 群、4 日間の静水圧培養と 3 日間の大気圧培養の組み合わせを 2 回繰り返す 4dx2-HP 群、7 日間の静水圧培養後に 7 日間の大気圧培養を行う 7d-HP 群、コントロールとして 14 日間の大気圧培養を行う S 群の合計 4 群に分けて培養を行った。

2. 刺激強度比較実験：いずれも 0.5Hz の周期的静水圧刺激を用いた。静水圧の最大強度 0.025MPa の低圧 (L-HP 群)、0.50MPa の中間圧 (M-HP 群)、3.0MPa の高圧 (H-HP 群) の 3 群に分け、0.5Hz 周期の静水圧環境下で 7 日間培養し、その後の 7 日間を大気圧環境下で培養した。さらにコントロールとして 14 日間を大気圧環境下で培養した S 群を加え合計 4 群の評価を行った。また軟骨の変性を防ぐために全培養期間中、酸素濃度を 3% として低酸素環境下にて培養を行った。基質産生のマーカーとしてアグリカン (Agg) 及び II 型コラーゲン (Col-2)、軟骨変性のマーカーとして I 型コラーゲン (Col-1)、基質分解のマーカーとして matrix metalloproteinase 13 (MMP13) の mRNA 発現を real-time PCR 法で測定した。基質の主要成分である硫酸グリコサミノグリカン (S-GAG) の定量をジメチルメチレンブルー (DMMB) 法で、軟骨マトリックスの蓄積を II 型コラーゲン免疫染色及びサフラニン O 染色で評価した。

(結果)

1. 刺激期間比較実験：4 日間の 0.5MPa の静水圧刺激で Agg-core と Col-2 の増加を認め、7 日間連続の刺激ではそれらの発現量がさらに増加した。Col-1 は静水圧刺激を加えた 7 日目まで抑制され、さらに刺激終

了後も数日は発現低下を維持した。DMMB 法では 4d-HP 群と比べ 7d-HP 群で S-GAG の量が多く、また 4 日間 1 回の培養より 4 日間 2 回の培養において *Agg-core* と *Col-2* 遺伝子発現の増加を認めた。大気圧培養の効果として *Agg-core* の発現は刺激中断後にやや減少するが、S 群より低くなることはなかった。*Col-2* の発現は刺激中断後に数日経ってから減少しはじめるが、S 群より低くなることはなかった。*Col-1* の発現は刺激中断後に緩やかに上昇し S 群の値に近づいた。*MMP13* の発現は刺激中断後も低値を保ち続けた。また S-GAG 蓄積量は大気圧培養中に蓄積量が増加する事が分かった。

2. 刺激強度比較実験：*Agg-core* や *Col-2* の発現量は今回の静水圧 3 群の中では L-HP 群が最も少なかった。*Col-2* は静水圧強度が高くなるに従い発現量も増加する一方で、*Agg-core* は M-HP 群と H-HP 群で大差は見られなかった。また S-GAG の蓄積量の結果は M 群が有意に多かった。静水圧刺激中の *Col-1* 発現量は M-HP 群で最も低い傾向を示した。*MMP13* 発現量は静水圧刺激期間中では L-HP 群で発現量が最も抑制されており、静水圧刺激後ではいずれも静水圧群においても S 群よりは抑制されている傾向を認めた。

(考察)

静水圧刺激期間が長いと細胞間基質の産生が増加することが証明された。また、M-HP 群は、H-HP 群に比べ *Col-2* 発現量で劣るものの *Agg-core* 発現量が同等かつ *Col-1* の抑制に優れ、同時に S-GAG 蓄積量も最大であったことから、中等度の静水圧 (0.50MP) による刺激は軟骨細胞の基質産生刺激としては適切であることが判明した。さらに、静水圧刺激後に大気圧下で培養することにより細胞間基質の合成が促進されたことから、間歇的刺激は細胞間基質産生の効率を向上させる可能性が示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

静水圧刺激により、軟骨は髄核の細胞間基質に類似した基質を産生する。中等度の水圧と間歇刺激など、基質産生への培養至適条件の一部を明らかにした。

本研究は、髄核変性に対する再生療法のひとつとして、軟骨細胞に静水圧刺激を加えることで、変性髄核の置換を髄核細胞に代替できる可能性を示唆した意義のある論文である。

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。