

氏名(本籍)	三島初(東京都)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第2641号
学位授与年月日	平成13年3月23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	Three dimensional alginate culture conditions enhance the chondrocytic phenotype of perichondrium-derived cells (アージネート三次元培養下における肋軟骨膜分離細胞の軟骨分化特性)
主査	筑波大学教授 理学博士 久野節二
副査	筑波大学助教授 歯学博士 石橋利文
副査	筑波大学助教授 医学博士 今門純久
副査	筑波大学助教授 理学博士 志賀隆

論文の内容の要旨

(目的)

軟骨膜は軟骨細胞への分化能を有する前軟骨細胞を含んでおり、採取培養が困難な軟骨細胞の代替細胞として、軟骨欠損の修復や細胞移植においてその応用が考えられてきた。軟骨膜そのもの自体が軟骨様組織へ分化することは *in vitro* の系で証明されている。しかし採取できる量に限度があるため組織工学へ向けての応用のためには *in vitro* で効率よく軟骨細胞へ分化させる培養系の確立が必要となる。これまでの研究では、単層培養系において TGF β や BMP-7 (OP-1) などの成長因子を用いた分化誘導の試みはなされているものの、未だ実用の段階からはほど遠い。本研究では生体内環境により近い三次元アルジネート培養系を導入することにより、軟骨膜から分離した細胞を軟骨細胞へ分化させることが可能か否かを検証することを目的とした。

(対象と方法)

家兔の肋軟骨から採取した軟骨膜を酵素処理して得られた細胞を単層培養し、トリプシン処理後アルジネートに包埋し、DMEM/F12、胎仔牛血清、アスコルビン酸塩を含む培養液で三次元培養を行った。経時的なプロテオグリカン発言をアルシアンブルー染色と ^{35}S -sul-fate の取り込み活性で定性及び定量的に、タイプ I 及び II コラーゲンとコンドロイチン硫酸の発現を免疫染色により調べ、コラーゲン遺伝子発現を RT-PCR により半定量的に測定した。また、 ^3H -チミジンの取り込み活性を計測し細胞の分裂能を定量化した。

(結果)

三次元培養下において、軟骨分離細胞の形状は軟骨細胞と同様に円形で、盛んに分裂し、増殖している状態を観察できた。培養期間が長くなると細胞は集合し、細胞塊を形成した。アルシアンブルー染色では細胞外基質が濃染された。免疫染色の観察では、細胞外基質にタイプ II コラーゲンとコンドロイチン硫酸に対する陽性反応を認めた。一方、単層培養下では線維芽細胞様の細胞が認められ、培養期間が長くなるにつれて増加することが明らかになった。細胞分裂は単層培養では培養期間に伴い減少したが、三次元培養では逆に期間とともに増加した。プロテオグリカン合成については全ての培養期間で三次元培養系で有意に高かった。コラーゲン遺伝子発現につ

いてはタイプIIコラーゲンmRNAは単層培養下では急速に減少するのに対し、三次元培養では培養期間とともに増加した。タイプIコラーゲンは三次元培養では減少した。

(考察)

近年、軟骨細胞で三次元培養の有用性が論じられている。本研究ではアルジネートを用いた三次元培養下での軟骨膜細胞の挙動が初めて報告された。本研究で用いた培養条件下では軟骨膜細胞は旺盛なプロテオグリカン合成とタイプIIコラーゲン発現の亢進を示した。これらの結果は、アルジネートを用いた三次元培養系では特別な成長因子なしに通常の軟骨膜培養培地において軟骨膜細胞が軟骨様細胞の特性を獲得し、それを維持することを示しており、将来このようにして得られた軟骨膜分離細胞の軟骨欠損治療への臨床応用の可能性を示唆している。アルジネートは他の三次元培養法に比べ、培養細胞の回収が容易なために細胞移植などへの利用が簡便である。今後は軟骨膜分離培養細胞をin vivoでの軟骨欠損治療に応用する際の組織特性についてさらに詳細な検討を加えたい。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、アルジネートを用いた三次元培養法による軟骨膜分離細胞の生育状況に関して、細胞の正常な増殖と軟骨様細胞特性の獲得について初めて詳細に記載した報告であり、非常に貴重な観察データを提示している。軟骨膜細胞の培養に必要な初期条件の解明は、近い将来この系の軟骨培養細胞を使った軟骨欠損治療への糸口を与える。本研究は今後、臨床応用へ向けて大きな進展が期待される点においても優れており、学位論文として高く評価できる。

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。