

氏 名	上 中 一 泰
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 6 3 6 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 3 年 3 月 1 0 日
学 位 論 文 題 目	Relation of low-intensity pulsed ultrasound to the cell density of scaffold-free cartilage in a high-density static semi-open culture system  (高濃度 semi-open 静置培養法による scaffold-free cartilage の低出力超音波パルスの効果はその細胞濃度に影響する)
審 査 委 員	主 査 教 授 村 上 節  副 査 教 授 犬 伏 俊 郎  副 査 教 授 村 田 喜 代 史

## 論文内容要旨

※整理番号	641	(ふりがな) 氏名	うえなか かずひろ 上中 一泰
学位論文題目	<b>Relation of low-intensity pulsed ultrasound to the cell density of scaffold-free cartilage in a high-density static semi-open culture system</b> (高濃度semi-open 静置培養法によるscaffold-free cartilage の低出力超音波パルスの効果はその細胞濃度に影響する)		
<p><b>【目的】</b>          組織工学の分野の進歩によって、軟骨損傷の治療の可能性が徐々に広がってきている。軟骨再生の先駆的な治療として自家軟骨細胞移植 (ACT)が行われて以来、様々な人工物をスキャフォールドとして用いた軟骨組織の再生が試みられてきた。軟骨細胞は単層培養すると、短期間に脱分化を起こし、本来の軟骨細胞の持つ形質を失ってしまう。しかし、スキャフォールドを用いた三次元細胞培養法は軟骨細胞の脱分化を抑制し、その形質を再分化させることが分かってきた。近年、スキャフォールドを用いた三次元培養軟骨とは異なって、胎生期の前軟骨期の細胞凝集に似たスキャフォールドフリーの関節軟骨の再生が斬新な組織工学的手法として注目されてきている。今回の実験において、我々はその手法を応用し、シンプルな culture system を用いた scaffold-free の軟骨様組織を作成した。又、軟骨細胞濃度を調節することで脱分化を防ぎ、その形質を再分化させることを試みた。さらに作成した組織への骨折治癒促進効果のある低出力超音波パルス(LIPUS)の基質合成効果の有無を調査した。</p> <p><b>【方法】</b>          ラット軟骨細胞を単層培養にて増殖させた後、多孔性の合成半透膜上に3種類の段階的な細胞濃度、1.0, 2.0, <math>4.0 \times 10^7</math> cells/cm<sup>2</sup> で播種させて、細胞間相互作用を誘導させscaffold-free 軟骨様組織を作成した。その組織をLIPUS により20分/日で刺激した。超音波刺激の基質合成の効果を調べるために、軟骨基質合成に関与するmRNA の発現を real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法にて評価した。Type II collagen, type I collagen や proteoglycan の合成を組織学的手法により評価した。また、作成した軟骨様組織の glycosaminoglycan (GAG)の濃度を dimethylmethyleneblue (DMMB)法を用いて測定した。</p> <p><b>【結果】</b>          高濃度で軟骨細胞を培養すると凝集して組織となり、肉眼的、組織学的な所見から、<math>2.0 \times 10^7</math> cells/cm<sup>2</sup> group のみ自然な関節軟骨に似たプレート状の組織となった。Real-time PCR の統計学的な分析において、<math>2.0 \times 10^7</math> cells/cm<sup>2</sup> group の細胞濃度では他の2つの group より type II collagen と aggrecan は有意に高く発現していた。興味深いのは、<math>2.0 \times 10^7</math> cells/cm<sup>2</sup> group のみLIPUS をもちいることで aggrecan の mRNA の発現が有意に高く発現していた。さらに、DMMB法を用いた測定においてGAG濃度がLIPUSを用いた群で有意に高かった。</p>			

(備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。

2. ※印の欄には記入しないこと。

(続 紙)

#### 【考察】

アガロースゲル、アルジネートやコラーゲンなどの数多くのスキヤフォールドを用いた培養が有効である報告が多数存在し、実際にその組織を生体内に移植した報告もある。しかし、その組織の生体適合性や長期間での安全性や副作用については知られていない。

スキヤフォールドを用いずに高濃度培養を行うと脱分化が抑制され、細胞間同士の接着が促進されることで軟骨合成がすすみスキヤフォールドフリーの軟骨様組織が作成できる。高濃度培養による問題点として栄養や酸素の供給が不十分になりやすい点があげられる。永井らは、これらの問題に open rotational culture をもちいてこの問題を解決しようとした。また、Groganらは透析の半透膜を用いた closed system を用いて軟骨組織を作成したが、酸素や栄養の十分な交換が行いにくい。今回の研究では ceramic porous membrane を用いた semi-open static system を考案し、type II collagen や proteoglycan に富む良好なスキヤフォールドフリー軟骨組織を作成できた。さらに静置する環境では細胞がつくる成長因子や基質分子が集積しやすくなるのも利点の一つと考えられる。

LIPUSは現在、骨折の治癒促進効果が認められ整形外科の治療に臨床応用されている。LIPUSの proteoglycan 合成促進効果は Parvizi らによってはじめて報告されたが、スキヤフォールドフリーで作成した軟骨組織への効果の報告はない。今回の結果より Aggrecan mRNA の発現が促進され、GAG 濃度も高くなることから、良好な軟骨を作成できた  $2.0 \times 10^7$  cells/cm<sup>2</sup> group の細胞濃度で LIPUS の効果が認められることが分かった。しかし、LIPUS の作用する分子機構やその至適条件についてはさらなる研究が必要である。

#### 【結論】

この研究では関節軟骨細胞から scaffold-free の軟骨様組織を作成することができる新たな semi-open static culture system を紹介した。LIPUS はその組織における基質合成を高めて、scaffold-free の軟骨様組織と組み合わせることでより良好な移植軟骨を作成する有効な手段となる可能性がある。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	641	氏名	上中 一泰
論文審査委員			
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>関節軟骨は損傷されると再生しないと考えられており、関節軟骨損傷や変形性膝関節症に対する治療は困難とされている。本論文は、関節軟骨細胞の移植療法を実現するために、細胞間相互作用を応用する手法を改良し、さらに低出力超音波パルス刺激 (low intensity pulsed ultrasound; LIPUS) を併用して軟骨様組織の作製を試みたものである。結果を以下に示す。</p> <p>1) ラット軟骨細胞を単層培養にて増殖せしめた後、多孔性の合成半透膜上に播種する高濃度培養法を考案し、タイプ2コラーゲンやアグリカンなどの軟骨基質合成能を評価することにより、培養に供する至適細胞濃度が <math>2.0 \times 10^7</math> cells/cm<sup>2</sup> であることを明らかにした。</p> <p>2) さらに上記の条件下において、LIPUS を併用することにより、アグリカンやコンドロイチン硫酸の合成能力が高まることを示した。</p> <p>以上より、LIPUS を併用する高濃度 semi-open 静置培養法は良質の軟骨様組織作製法であると結論した。</p> <p>本論文は、Scaffold-free の条件下における軟骨細胞から良質な軟骨様組織を作製する方法を新たに考案したものである。この結果は、治療困難な関節軟骨損傷や変形性膝関節症に対する再生治療の可能性を切り開くものであり、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 558 字)</p>			
(平成 23 年 1 月 25 日)			