

氏 名	安 藤 厚 生
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 (論) 第 3 6 8 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 1 年 9 月 9 日
学 位 論 文 題 目	Effect of dynamic compressive loading and its combination with growth factor on the chondrocytic phenotype of three-dimensional scaffold-embedded chondrocytes (メカニカルストレスと成長因子が3次元培養下関節軟骨細胞に与える影響について)
審 査 委 員	主 査 教 授 岡 村 富 夫 副 査 教 授 小 森 優 副 査 教 授 木 村 隆 英

論文内容要旨

※整理番号	372	氏名 (ふりがな)	安藤 厚生 あんどう こうせい
学位論文題目	Effect of dynamic compressive loading and its combination with growth factor on the chondrocytic phenotype of three-dimensional scaffold-embedded chondrocytes (メカニカルストレスと成長因子が3次元培養下関節軟骨細胞に与える影響について)		
目的	<p>関節軟骨は血管・神経の存在しない特殊な組織であり、一旦損傷を受けると元の状態に治癒するのは非常に難しいと言われている。その損傷軟骨に対する治療として、以前から様々な方法が試みられているが完全な治癒は得られていない。最近では自家培養軟骨細胞を用いて修復を図る研究が盛んに行われており実際に臨床応用されているが、細胞培養時に起きる早期脱分化現象が大きな問題として存在している。一方、軟骨細胞はメカニカルストレスやある種の成長因子によりその基質産生能が促進される特性があることが知られている。そこで我々は一旦脱分化した軟骨細胞を効率よく再分化させることを目的とし、メカニカルストレスや成長因子を用いた軟骨細胞の3次元培養を行い、その有用性について調べた。</p>		
方法	<p>使用する軟骨細胞は5週齢のWistar系ラットから採取した。評価はリアルタイムPCRとトルイジンブルー組織染色にて行い、追跡遺伝子はType I・II collagen、Aggrecanとした。統計学的解析は、one-factor analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni / Dunn <i>post hoc</i> tests (p-values < 0.05) を用いた。</p> <p>(実験1)</p> <p>採取した軟骨細胞を単層培養し、継代を4回行った。単層培養時における軟骨細胞の脱分化の程度を経時的に調べた。</p> <p>(実験2)</p> <p>採取した軟骨細胞をすぐにコラーゲンゲル内へ包埋して3次元培養を計5週間行った。軟骨細胞の形質維持に3次元培養がどの程度有効なのかを調べた。</p> <p>(実験3)</p> <p>いったん単層培養で増殖させた軟骨細胞をコラーゲンゲル内へ包埋し、3次元培養下にメカニカルストレスを負荷した。培養期間は7日間とし、メカニカルストレスは1日1回負荷した。1回あたりの負荷時間を0、10、60、120分間の4群に分けて1回あたりの有効な負荷時間について検討した。</p> <p>(実験4)</p> <p>いったん単層培養で増殖させた軟骨細胞をコラーゲンゲル内へ包埋し、3次元培養下にメカニカルストレスと成長因子を負荷しながら培養を行った。成長因子にはbasic fibroblast growth factor (bFGF)とbone morphogenetic protein-2 (BMP-2) を使用し、濃度は100 ng/mLとした。メカニカルストレスは1日1回、1回あたり60分間負荷した。培養期間は7日間とした。成長因子単独使用、メカニカルストレス単独使用、成長因子とメカニカルストレス併用、の3群に分けて、成長因子とメカニカルストレス同時併用の有効性について検討した。</p>		

結果

(実験1)

採取した軟骨細胞を繰り返し単層培養したところ、Type II collagen、Aggrecan の mRNA 発現が早期から急激に低下し、一方で Type I collagen の発現が有意に上昇した。

(実験2)

軟骨細胞をコラーゲンゲル内にて3次元培養を計5週間行った結果、Aggrecan の発現が1週から、Type II collagen の発現は3週から有意に低下した。組織染色の結果、細胞質染色は週毎に縮小傾向にあり、細胞外マトリックスの染色にほとんど差は無かった。

(実験3)

一旦単層培養で増殖させ(細胞数の確保を目的として)、コラーゲンゲル包埋軟骨細胞にメカニカルストレスを負荷しながら培養を行った結果、1回あたりの負荷時間が60分間の群において Type II collagen、Aggrecan の発現が他群と比べて有意に上昇した。組織染色の結果、細胞質と細胞外マトリックスともに、60分間群においてより広範囲に染色を認めた。

(実験4)

Aggrecan、Type II collagen の発現においては、メカニカルストレス単独使用群が最も上昇しており、次いで bFGF 単独使用群が上昇していた。成長因子、メカニカルストレス併用群においては Aggrecan、Type II collagen 発現ともに有意な上昇は認めなかった。組織染色の結果は、細胞質、細胞外マトリックスともに成長因子、メカニカルストレス併用群と成長因子単独使用群の間に明らかな差は無かった。

考察

現在軟骨再生を図る上で、単層培養にて軟骨細胞の増殖を図る際に細胞が急激に脱分化することが大きな問題となっている。我々もこの現象を実験1にて確認した。そして、この脱分化を防ぐために3次元培養が有効であるということが過去の文献にて数多く報告されているが、今回の我々の結果では3次元培養だけでは3週間ではほぼ脱分化を起こしてしまった。そこで細胞の脱分化を防ぐ目的にて、軟骨細胞の基質産生能を促進させるのに有用と言われているメカニカルストレスを3次元培養時に負荷した結果、1日当たりの負荷時間が60分間において軟骨細胞の基質産生能が有意に上昇することが分かった。これは、メカニカルストレスには至適条件が存在することを示唆していた。そしてさらに軟骨細胞の形質維持を図るため、メカニカルストレスに加えて成長因子を同時併用してその相乗効果を意図した実験を行ったが、我々の期待に反してその有効性は示せなかった。その原因の一つとして、メカニカルストレスと成長因子が各々その効果を発揮する際に、軟骨細胞の分化ステージに依存している可能性が示唆された。今後、メカニカルストレスと成長因子をそれぞれの至適なタイミングに負荷することにより相乗効果が得られる可能性があると考えた。

結論

臨床応用に耐え得る関節軟骨組織を再生するには、基質産生能を維持しつつ十分な細胞数を確保する必要がある。メカニカルストレスと成長因子は、両者の相乗効果は得られなかったが、一旦細胞増殖時に脱分化した軟骨細胞を基質産生段階まで再分化させる有用な細胞刺激方法であった。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	372	氏名	安藤 厚生
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨)</p> <p>関節軟骨は損傷を受けると回復するのが非常に困難な組織であり、損傷軟骨に対して様々な治療が試みられてきた。最近では自家培養軟骨細胞を用いる方法が臨床応用されているが、細胞培養時に生じる早期脱分化現象が問題となっている。本研究は、一旦脱分化した軟骨細胞を効率よく再分化させることを目的として、細胞基質産生能を指標にメカニカルストレスや成長因子の影響を三次元培養下で検討した。</p> <p>その結果、1) これまで有効とされてきた三次元培養だけでは軟骨細胞の脱分化を抑制できなかったが、メカニカルストレスを加えることにより、分化の指標である基質産生能が上昇した。2) 形質維持を図るために成長因子を併用したが、その相乗効果は得られなかったことから、それぞれの刺激には軟骨細胞の状態に応じた至適条件が存在することが示唆された。</p> <p>本論文は、損傷軟骨による整形外科疾患の治療に対して新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け、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;">(平成 21年 8月 26日)</p>			