

氏名	ケツ 関 ジョウ 上 ガイ 凱
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第3059号
学位授与の日付	平成19年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科外科系専攻
学位論文題目	Transplantation of Allogeneic Chondrocytes Cultured in Fibroin Sponge and Stirring Chamber to Promote Cartilage Regeneration (軟骨再生促進のための、フィブロインスポンジ及び滑り運動下培養を用いた再生軟骨同種移植)
論文調査委員	(主査) 教授 戸口田 淳也      教授 中村 孝志      教授 開 祐 司

### 論 文 内 容 の 要 旨

関節軟骨組織は様々な機械的負荷にさらされている。軟骨基質は、主としてコラーゲン線維のネットワークとプロテオグリカンから構成されており、低摺動摩擦、集中応力分散等の力学的機能を有している。また、力学的な刺激は軟骨組織の構築に重要な役割を果たしており、軟骨細胞の mechanotransduction に関する研究が数多く行われているが、統一的なメカニズムを解明するためには、未だ多くの課題が残されている。

一方、関節軟骨は生理的条件下においては自己修復能力が乏しいため、組織工学的手法を用いた軟骨移植の試みに期待が寄せられている。本研究では、外科用縫合糸として用いられてきた絹糸に注目し、絹から精製分離したフィブロイン蛋白からフィブロイン・スポンジ(平均気孔径 80 $\mu$ m)を作製した。この、フィブロイン・スポンジを細胞の足場(スカフォールド)として使い、滑り運動負荷を加えた状態で培養を行った。さらに、生成した再生軟骨をウサギ骨軟骨欠損部に移植し、その治療への応用可能性を検討した。

ウサギの大腿骨、脛骨、上腕骨より採取した関節軟骨細胞を単離し、 $3.75 \times 10^5$  cells/200 $\mu$ l の濃度でフィブロイン・スポンジに播種した。滑り運動負荷培養では、magnetic stirring chamber を作製し、平均滑り速度 7.85mm/sec. 荷重 7.85N/m<sup>2</sup> の条件下で培養を行った。Magnetic stirring chamber 内で三週間培養し続けた結果、コントロール(対照群)と比較して21日目ではDNA量は38.9%、グリコサミノグリカン(GAG)量は54.3%の有意な増加が見られた( $P < 0.001$ )。さらに、proteoglycan およびタイプIIコラーゲンの組織検査により、軟骨組織の成熟が促進したことが明らかになった。再生メカニズムの検討として、インテグリン・サブユニット $\alpha 5$ 及び $\beta 1$ の蛍光相対強度、並びに形態学的検討として組織成熟の評価を行ったが、有意な変化を追うことができず、今回はインテグリンへの物理刺激の影響を発見することはできなかった。

さらに、臨床応用の可能性を検討するために日本白色家兔(12週齢、雄、2.4~2.6kg)の膝関節大腿骨グループ部に直径5mmの骨・軟骨全欠損を作製し、同部への同種移植を行った。軟骨組織修復の定量評価には、関節軟骨用の Histological grading scale の指標を用いた。その結果、Magnetic stirring chamber を用いて作製した再生軟骨移植では、Magnetic stirring chamber を用いない場合に比べて有意に良好な組織像を示した。

以上、今回の研究からはMagnetic stirring chamber によるどのような物理要素がどのような mechanotransduction を経て軟骨組織形成にかかわったかについての知見を得ることはできなかったが、Magnetic stirring chamber を用いた物理刺激によって良好な軟骨組織構造物が形成された。このことは、本法の軟骨修復治療への応用可能性を示唆するものである。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

力学刺激などの軟骨組織再構成技術を用いて関節疾患の治療を行う試みは数多くなされているが、in vitro にて機能的に再構成された軟骨組織が、生体内に移植されても高い機能性を持った形態を形成し得るか否かについての情報は未だ少ない。

また、自家軟骨細胞等の限られた細胞数から変形性関節症等の比較的広い障害範囲を覆うだけの組織を得る技術も、未だ発展途上である。本研究では、軟骨細胞担体として絹から精製したフィブロインスポンジを用い、力学刺激として相対滑り運動を培養中に加える Magnetic stirring chamber を開発した。さらに、得られた軟骨様組織を生体の骨軟骨欠損部に移植することによって、移植後の組織形成を観察した。

その結果、フィブロインスポンジ内では細胞の増殖と豊富な細胞外基質の産生が認められた。また、Magnetic stirring chamber を用いることによって、細胞数、基質産生量ともにさらに増加していた。得られた軟骨様組織を12週齢の家兎の膝関節部に移植した結果、Magnetic stirring chamber にて2週間の力学刺激を加えた軟骨様組織では、力学刺激を加えなかった組織に比べて移植後12週においても良好な組織像を示した。さらに周囲軟骨との境界も不鮮明であり、良好な生着を思わせた。Magnetic stirring chamber を用いることによって、どの力学要素がどのようなカスケードに作用して軟骨組織形成を誘導したのかを特定することはできなかったが、これらの研究は力学刺激を用いた軟骨組織再構成技術が、関節疾患治療に用い得る可能性を示した。

以上の研究は軟骨再生のメカニズムの解明に貢献し、軟骨再生治療上に寄与するところが大きい。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものとみとめる。

なお、本学位授与申請者は、平成19年1月29日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。