京都大学	博士（人間健康科学）	氏　名	伊　藤　明　良
論文題目	Culture temperature affects redifferentiation and cartilaginous extracellular matrix formation in dedifferentiated human chondrocytes （培養温度は脱分化したヒト軟骨細胞において再分化と関節軟骨細胞外基質形成に影響を与える）		

（論文内容の要旨）

【背景】

関節軟骨は軟骨細胞と細胞外基質（extracellular matrix: ECM）によって構成され、ECM は主にコラーゲンとプロテオグリカンで構成される。関節軟骨は血管や神経を欠き、一度変性が進行してしまうと自己再生は困難であることが広く知られているため、組織工学や培養細胞を用いた再生医療による関節軟骨再生が模索されている。自家培養軟骨細胞移植術は関節軟骨の再生治療として期待されているが、細胞培養の過程で軟骨細胞が脱分化してしまうことなどの問題が未だ残されている。これまで、脱分化した培養軟骨細胞の再分化や ECM の産生を促進するために多くの研究が成されてきたが、温度環境がそれらに与える影響については未だ不明であった。四肢など体幹部から離れた部位では外部温度の影響を受け、ヒト膝関節内温度も 32℃付近であることが報告されている。このことは、関節軟骨は生体内において深部体温と比べると低温環境に暴露されていることを示唆し、再生治療によって移植された細胞も同様の環境におかれることが想定される。よって、本研究の目的は脱分化したヒト軟骨細胞を用いて、異なる培養温度が再分化と ECM 形成に与える影響を明らかにすることとした。

【方法】

脱分化したヒト軟骨細胞を、32℃、37℃、41℃の 3 つの温度条件下でペレット培養法により最大 21 日間三次元培養した。再分化および ECM 形成能は、生成されたペレットの湿重量測定、遺伝子発現解析、組織学的観察、走査型電子顕微鏡を用いた超微細構造観察、そして glycosaminoglycan (GAG)および DNA 定量による生化学的解析を用いて評価した。

【結果】

湿重量は 41℃で顕著に少なく、実験期間を通して増加しなかった。32℃と 37℃を比較すると、37℃の方が培養 14 日目から有意に重くなった。関節軟骨の主要コラーゲンであるⅡ型コラーゲンの遺伝子発現は 37℃で最も促進されたが、脱分化を示唆するⅠ型コラーゲンの遺伝子発現は 32℃と 37℃間の比較では有意な差は認められなかった。一方で、41℃では解析した全ての遺伝子発現が他の温度よりも有意に抑制されていた。組織学的および生化学的解析では、37℃においてⅡ型コラーゲンおよびプロテオグリカンの産生が最も認められ、41℃ではそれらの産生が著しく抑制されていた。DNA 量は培養 14 日目から 41℃で有意に少なく、培養 21 日目では温度が高い程 DNA 量が少なかった。

【考察】

本研究により、培養温度は脱分化した軟骨細胞の再分化および ECM 形成に影響を与えることが初めて明らかとなった。41℃という高温環境では、細胞数の減少および ECM 関連遺伝子の発現抑制が生じ、その結果、著しく ECM 形成が阻害されたと考えられた。32℃と 37℃を比較すると、37℃の方がⅡ型コラーゲンおよびプロテオグリカンの産生がより認められたことから、再分化が促進され、硝子軟骨様の ECM 形成に働いたと考えられた。これらのことは、臨床において移植された軟骨細胞が関節内の温度環境に影響を受け得ることを示唆し、さらに関節内を 37℃程度に制御することで、関節軟骨再生を促進し得る可能性を示唆するものである。

【結論】

本研究条件において、深部体温付近である 37℃環境は、関節内温度付近である 32℃環境よりも脱分化した軟骨細胞の再分化および ECM 形成を促進させ得ることを示唆し、さらに 41℃環境では著しく阻害されることが明らかとなった。温度環境を調整することは、軟骨細胞の形質や生合成を制御する有用な手段と考えられる。

（論文審査の結果の要旨）

関節軟骨は自己再生能力に乏しい組織である。そのため関節軟骨治療においては再生医療に対する期待が高い。培養軟骨細胞移植術は関節軟骨再生医療のひとつとして期待されているが、培養過程において軟骨細胞が脱分化してしまい、正常な硝子軟骨への再生が不十分であることが、解決すべき課題である。

温度環境はあらゆる細胞にとって影響を与え得る重要な因子であるが、培養温度条件がヒト軟骨細胞の分化状態や細胞外基質形成に及ぼす影響についてはこれまで着目されていなかった。そこで本研究は、ペレット培養法を用いて、脱分化したヒト軟骨細胞に対して異なる培養温度がその再分化と細胞外基質形成に与える影響を検討した。

培養温度条件が与える影響を解明するために、膝関節内温度の 32℃、深部体温の 37℃、および細胞生存閾値付近の温度である 41℃の 3 条件において、最大 21 日間ペレット培養した。軟骨細胞の分化状態と細胞外基質形成の評価を、湿重量測定、遺伝子発現解析、組織学的観察、超微細構造観察、および生化学的解析によって多角的に検討した結果、37℃条件において軟骨分化マーカーであるⅡ型コラーゲンの mRNA 発現が最も高くなり、細胞外基質も最も形成されることが示唆された。

以上の研究は、培養温度環境がヒト軟骨細胞の再分化および細胞外基質形成に及ぼす影響の解明に貢献し、関節軟骨再生治療研究に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（人間健康科学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 27 年 2 月 5 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。

（なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。）