

氏 名	と 都 甲 武 史
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3206 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 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	Identification of cartilage progenitor cells in the adult ear perichondrium: utilization for cartilage reconstruction (成体耳介軟骨膜における軟骨前駆細胞の同定: 軟骨再建への応用)
論文調査委員	(主 査) 教 授 中 村 孝 志 教 授 伊 藤 壽 一 教 授 戸 口 田 淳 也

論 文 内 容 の 要 旨

肋軟骨および鼻中隔軟骨は小耳症手術における耳介フレームの材料として使用されるが、硝子軟骨であるため再建耳介は柔軟性に欠ける。しかしながら、健側耳介軟骨から採取できる弾性軟骨の量には限界がある。いずれにしても自家軟骨採取は侵襲が少なくはなく、また、再建した耳介形態を長期間維持することは依然として困難である。最近の研究では、多くの生体組織は組織幹/前駆細胞を含み、これらの細胞がそれぞれの組織の恒常性に関与していると考えられている。そこで、現状を打破するためのアプローチとして、弾性軟骨の再生医療において耳介軟骨膜が有用な cell source として利用できるか検討した。

4 週齢日本白ウサギに BrdU を連続 5 日間皮下注射し 4 週間後に染色したところ、long-term label-retaining cell が耳介軟骨膜に認められ、組織幹/前駆細胞を含むことが示唆された。そこで、単一細胞の分裂能力を評価するため、4 週齢日本白ウサギ耳介軟骨および軟骨膜から単離した初代細胞を 4 週間培養し、コロニーサイズを計測したところ、軟骨膜細胞の方がより大きなコロニーを形成した。長期培養においても、軟骨膜細胞は有意に優れた増殖能を示した。RT-PCR では、軟骨細胞は type II collagen および aggrecan の発現は 3 継代目で完全に消失した。一方、軟骨膜細胞では type II collagen の発現は 3 継代目で完全に消失したが、aggrecan はやや減少しながらも 7 継代目まで発現が認められた。多分化能を調べるため、分化誘導培地を使用して分化実験を行ったところ、軟骨細胞および軟骨膜細胞のいずれも脂肪および骨への分化が認められた。

次に、人工真皮として臨床使用されているものと同じコラーゲンスポンジに、3、5、10 継代目軟骨膜細胞を播種し、インキュベーターにて一晚培養後、ヌードマウス背部皮下に埋入した。4 週間後にハーベストしたところ、type II collagen および aggrecan の発現が低下していた 5、10 継代目軟骨膜細胞播種群と比較して、強発現していた 3 継代目軟骨膜細胞播種群は有意に大きく、いずれの再生組織も表面平滑白色光沢で弾性のある軟骨様組織であった。この結果から 3 継代目軟骨膜細胞播種群を 3 継代目軟骨細胞播種群と比較したところ、いずれの群もほぼ同様の組織を再生し、質量に有意差は認められなかった（以後、軟骨細胞および軟骨膜細胞を播種した再生軟骨組織をそれぞれ CSCs、PCSCs とする）。それぞれ組織染色したところ、いずれも軟骨に特徴的な染色像を示したが、各群において差は認められなかった。石灰化もしくは骨化は認められなかった。RT-PCR ではいずれの群も type II collagen および aggrecan は正常軟骨組織と同程度の発現を認めた。一方、type X collagen は CSCs では強い発現を認めたが、PCSCs ではほとんど発現は認められなかった。このことから、CSCs においては軟骨細胞が肥大軟骨細胞化していることが示唆された。更に、ウサギ骨髓間葉系幹細胞との比較実験を施行したところ、骨髓間葉系幹細胞播種群の再生軟骨は PCSCs よりも有意に小さかった。

成体耳介軟骨膜に軟骨前駆細胞が存在することを初めて明らかにした。軟骨膜細胞からは軟骨細胞よりも正常軟骨により近い軟骨組織が再生可能であった。軟骨膜はドナーの変形を伴うことなく採取可能であり、骨髓間葉系幹細胞よりも軟骨再生能に優れ、分化誘導の手間やコストも必要ないことから軟骨再生の医療において有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

臨床において採取可能な弾性軟骨は限られているため、小耳症治療において弾性軟骨による耳介再建は困難である。そこで再生医療において耳介軟骨膜に着目し、4 週齢日本ウサギを使用して BrdU Labeling を施行したところ Long-term Label-retaining cells の存在を認めた。軟骨膜細胞は長期培養およびコロニーアッセイにて高増殖能を示し、分化誘導で軟骨以外に脂肪や骨になることから、成体耳介軟骨膜における軟骨の progenitor cells の存在が初めて示された。

次に、コラーゲンスポンジに軟骨膜細胞と軟骨細胞を播種し、ヌードマウスに移植して軟骨再生能を比較した（軟骨膜細胞、軟骨細胞を播種した群を各々 PCSCs、CSCs とする）。4 週間後、いずれも軟骨再生を認めたが RT-PCR にて CSCs は肥大軟骨細胞化が示唆され、16 週間後では CSCs は縮小が著しく質量に有意差を生じた。

更に、骨髄間葉系幹細胞と軟骨膜細胞の軟骨再生能を比較した。前者は播種後 2 週間 in vitro で軟骨分化誘導してヌードマウスに移植した。4 週間後、PCSCs は骨髄間葉系幹細胞播種群と比較して有意に大きかった。

以上の結果から軟骨の progenitor cells を含む耳介軟骨膜細胞は軟骨再生において有用であり、この研究は軟骨再生の臨床応用への可能性を示しており、今後の治療法進歩に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値のあるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 20 年 1 月 23 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。