

Chondroinduction and chondrocytic maintenance in three-dimensional culture systems

著者	水野 秀一
内容記述	Thesis (Ph.D. in Medical Sciences)--University of Tsukuba, (B), no. 1243, 1997.1.31
発行年	1997
URL	http://hdl.handle.net/2241/1439

氏名(本籍)	水野秀一(静岡県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博乙第1,243号
学位授与年月日	平成9年1月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Chondroinduction and Chondrocytic Maintenance in Three-dimensional Culture Systems (3次元培養システムにおける軟骨誘導および軟骨形質と機能維持)
主査	筑波大学教授 医学博士 林 浩一郎
副査	筑波大学教授 医学博士 岡戸 信男
副査	筑波大学教授 薬学博士 相良悦郎
副査	筑波大学教授 理学博士 坂内四郎
副査	筑波大学助教授 医学博士 筒井達夫

論文の内容の要旨

(目的)

- 1, 生体グリコサミノグリカン, 及び合成グリコサミノグリカンが3次元組織培養法による線維芽細胞の成長と分化に及ぼす影響を調べる。特にこの培養系での細胞の態度, 追加した細胞外基質が及ぼす影響, 軟骨細胞性発現への添加した成長因子の影響などに注目する。
- 2, 間葉系線維芽細胞から軟骨芽細胞への分化に最適の脱灰骨粉を含む微少環境を明らかにする。特に膠原線維の最適特性, さまざまな3次元培養系での細胞態度, 軟骨基質合成などに注目する。
- 3, 上記培養系での軟骨基質の量を測定する。特に免疫組織学的に軟骨特有プロテオグリカンを同定し, かつその免疫化学的分析を行う。
- 4, in vitroにおける軟骨細胞の成長・分化に及ぼす物理化学的影響を調べる。特に培養系における静水圧の影響, 培養液灌流影響, 長期培養の影響および細胞の充実性と基質産生などについて調べる。

(材料と方法)

実験1: ラットの大腿骨および脛骨骨幹部の皮質骨からすでに報告されている方法により脱灰骨粉(demineralized bone powder; DBP)を自製した。3次元のコラーゲンスポンジは子牛の真皮から取った可溶性1型コラーゲンから作成した。コラーゲン溶液に脱灰骨粉を混ぜ自家製の型に入れ-70度で凍らせた後凍結乾燥した。

またコンドロイチン硫酸, ヘパリン硫酸, ヒアルロン酸をそれぞれ0.001, 0.01, 0.1%含むコラーゲンスポンジも作成した。これらを培養基材としてヒト皮膚由来線維芽細胞を2週間培養した後形態学的に調べた。更にPlatelet-derived growth factor (PDGF), およびTransforming growth factor (TGF- β)を培地中に加えDBPとの相補的な影響を見た。

実験2: コラーゲンスポンジにポケットを作成しその中に高密度にDBPを含むモデルを作成した。これにヒト線維芽細胞を播種し2週間培養した。対象としてDBPをグアニジン塩酸で抽出した残りの脱灰骨粉を用いた。

実験3：2で作ったスポンジで得られた軟骨基質のモノクローナル抗体を使用した免疫組織学的同定および抽出した基質の生化学的定量を行った。

実験4：軟骨細胞の増殖能に及ぼす物理化学的因子を調べることを目的に、コラーゲンスポンジ培養担体に静水圧をかけ細胞の変化を調べた。軟骨細胞は牛関節から取ったものを使用し、15日間培養後トルイジンブルー染色による形態の観察と軟骨基質の定量を行った。

(結果と考察)

- 1) 2週間後にはスポンジの表面は線維芽細胞で覆われていた。コンドロイチン硫酸並びにヘパラン硫酸を含むDBP群は星形の細胞がすべてのサンプルに認められた。DBP, PDGF, TGF- β などを含む群の方が細胞密度が高かった。一方ヒアルロン酸を用いた群ではDBPと関係なく細胞の数が少なく、その形は大部分円形をしていた。この結果はDBPやコンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸などが線維芽細胞の増殖に促進的に作用することを示すものと考えた。またコラーゲンスポンジが良い培養担体となることが示された。
- 2) 培養細胞はスポンジ表面から内部に侵入し、DBP周囲では軟骨に特有と考えられるトルイジンブルーに異染色性の細胞外基質が認められた。このスポンジをラットの皮下に移植したところで軟骨誘導が認められた。DBPをグアニジン塩酸で抽出した残りの脱灰骨粉を用いた群ではこのような基質は形成されなかった。この結果は線維芽細胞から軟骨細胞への誘導が起ること、DBPはこれを促進することを示すものと考えた。
- 3) DBPの周囲で得られた軟骨基質の免疫化学的定量を行い、コンドロイチン4および6硫酸ならびにケラタン硫酸が培養4日目に比べ、7日目、10日目に著しく増えているのが認められた。
- 4) 2.8メガパスカルの加圧下での軟骨細胞が、15日間の培養によって他の圧力群や無加圧群に比べてDNA量とコンドロイチン4硫酸量が有意に増加することを認めた。これは基質成分のグリコサミノグリカンが圧により濃縮された可能性もあろうが、また細胞の代謝や増殖能に圧力が何らかの関わりを持つ可能性も考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

軟骨の中でも多量の基質を持つ硝子軟骨は再生し難い組織であり、そのことが関節の老化変性が多発する一因となっている。従って軟骨細胞の増殖あるいは再生を制御できれば臨床的に重大な意義を持つことになる。本研究は培養系でその軟骨の誘導や増殖能を調べた意欲的研究である。特にコラーゲンスポンジを凍結乾燥させ、三次元の培養担体として用いるという著者のアイデアはこの研究を成功に導いた鍵となるものであろう。これにより凍結乾燥前に種々の化学物質を加えておき、その作用を見るということに成功した。例えば脱灰骨粉の持つ軟骨誘導能が詳細に調べられている。また関節には常に筋緊張による圧迫力がかかっており、それがむしろ生理的状态と言えるが、培養系で静水圧を加える工夫をし、加圧群の増殖能が高くなることを見出したことは軟骨細胞の生理を考える場合極めて重要な知見と言ってよい。使用されている方法も培養のみならず組織学、生化学、免疫学などにわたり、これらに通暁した著者の高い能力を示すものである。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。