

論文の内容の要旨

論文題目「Characterization of chondrocyte sheets fabricated by co-cultured
with synoviocytes using temperature responsive inserts」

(温度応答性インサートを使用した滑膜細胞との共培養により作製した軟骨細胞シート
の特性)

学位申請者 小久保 舞美

キーワード：温度応答性培養皿 細胞シート 軟骨細胞 滑膜細胞 共培養法

【背景】関節軟骨は関節機能維持のために重要な役割を担っているが、極めて自己修復能力の乏しい組織である。これは、軟骨には血管が存在せず、豊富な細胞外基質の中にある軟骨細胞はほとんど移動せず、成熟した軟骨細胞は加齢とともに増殖能を失っていくという性質が理由としてあげられる。このため、軟骨欠損が形成されると、しばしば変形性関節症へと発展する。現在、関節軟骨全層欠損においては、人工関節や骨切り術など様々な治療法が行われている。一方関節軟骨部分欠損においては現状では明確な治療方針がなく、対症療法的に治療されている。どちらの欠損においても、硝子軟骨での再生は不可能であることが指摘されている。我々は、温度応答性培養皿UpCell®を用いた軟骨細胞シートによる関節軟骨修復再生を研究し、動物への移植実験においてその有効性を確認してきた。しかしながら、採取から移植可能な組織を作製するまでに4-5週間を要した。これは、組織内の多くを軟骨細胞外基質が占め、採取された組織内から得られる細胞数が少ないことと、軟骨細胞の増殖能が低いことが理由としてあげられる。臨床応用へ向け、さらなる培養期間の短縮が治療期間短縮に繋がり、患者のQOL向上に繋がると考えられる。

【目的】同じ膝関節内に存在し軟骨組織の栄養供給源として働く滑膜組織に注目し、軟骨細胞と共培養することによって、通常の培養方法では積層化細胞シート作製までに4-5週間を要する培養期間を短縮し、より短期間で軟骨細胞シートを作製することを目的とした。

【方法】前十字靱帯再建術時に得られた10例の人関節軟骨及び滑膜のP0～P2の細胞を使用した。軟骨細胞のみ培養を行うS群、インサートを介して滑膜細胞との共培養を行うC群を作製し、軟骨細胞増殖度を計測した。同様に温度応答性インサートを用いて共培養をし、培養14日目にC群を3層に積層化し、7日間培養したCL群を作製しCollagen-type1 (COL1)、Collagen-type2 (COL2)、Tissue metalloproteinase inhibitor 1 (TIMP1)、Fibronectin-1 (FN1)、SRY-related HMG Box 9 (SOX9)、Aggrecan-1 (ACAN)、Collagen-type27α1 (COL27α1)、integrin-α10 (ITGα10)、Matrix metalloproteinase-3 (MMP3)、Matrix metalloproteinase-13 (MMP13)、A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5 (ADAMTS5)の発現をreal time PCRで評価した。シートの組織学的評価は従来の培養方法と比較するため、温度応答性培養皿UpCell®で培養した後、3層に積層化した積層化軟骨細胞シートを同時に作製し、免疫染色法を用いてCOL2、FN1、ITGα10の発現を評価した。

【結果】S群と比べC群はP0では培養7日目から、P1、P2では培養3日目から有意に増殖した

($P<0.05$)。その結果、移植可能な組織作製までの培養期間は単独培養と比べ、平均10.5日短縮することが可能となった。また、real time PCRでは、COL2、TIMP1、SOX9、COL27といった軟骨形質維持に重要な遺伝子の有意な発現上昇を確認した($P<0.05$)。全ての継代数でCOL2はCL群がS群と比べ1.7倍以上の発現を呈し、接着因子であるITG α 10の発現は1.5倍以上の発現を呈した。一方、COL1、MMP3、MMP13、ADAMTS5などのカタボリックファクター遺伝子発現は特にP0細胞においてCL群がS群と比較し有意に抑制された($P<0.05$)。免疫染色では、積層化軟骨細胞シートはCOL2、FN1、ITG α 10の全てで強発現をみとめたが、単層シートではFN1、ITG α 10の発現は極僅かであった。また、従来の温度応答性培養皿を使用した積層化軟骨細胞シート作製法では免疫染色にてシート表面に接着因子FN1の局在を認めていたが、温度応答性インサートを用いた共培養法では、シート全体に強い発現をみとめた。

【考察】再生医療の臨床応用において、移植する組織工学的軟骨の作製には、手法のシンプルさが求められる。我々はその点を考慮し、Scaffoldを用いず細胞のみを用いて、その培養方法を工夫することによって軟骨の形質を維持させる方法を検討し、報告してきた。今回我々が提案した滑膜細胞との共培養法では、軟骨細胞の増殖能が上昇し、培養期間の短縮につながった。これは、培地に増殖因子を添加せず、血清 (FBS)と滑膜細胞から供給される液性因子のみを軟骨細胞に作用させるという、より関節内部での栄養供給状況をmimicした方法であり、軟骨細胞にとってより自然な培養方法であると考えられる。一般に軟骨細胞は2次元培養条件下では、軟骨固有の性質を失い、線維芽細胞様に変化する。この変化には、プロテオグリカン産生が低下、分泌コラーゲンの2型から1型への変化を伴う。今回、軟骨細胞シートを積層化することによってCOL2、TIMP1、SOX9、COL27などの軟骨特異的遺伝子の発現が有意に増えたことから、積層化は、軟骨細胞に適した環境構築に寄与するものと推察された。また、従来の温度応答性培養皿を用いた方法と比較して、温度応答性インサートを用いた培養方法によって、上下から栄養をとり入れることが可能となり、結果シート全体にFN1の局在を認めるなど、インサート使用の利点も示唆された。

【結語】滑膜細胞との共培養法は、軟骨細胞の増殖能を上昇させ、短期間で優れた軟骨細胞シートの作製を可能とした。しかしながら、組織採取から移植可能な細胞シート作製まで、P0細胞で最短21日間を要した。臨床応用に向けて、さらなる培養時間の短縮が求められる。今後の課題としては、より生体内に近い環境での培養方法たとえば低酸素培養を用いるなど、軟骨細胞に適した培養を行い、より一層の培養期間短縮を目指していきたい。