



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	移植用軟骨様細胞シート作製に関するプロセス工学的研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	佐藤, 康史
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第11925号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58984
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Yasushi_Sato_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（工学） 氏名 佐藤 康史

学 位 論 文 題 名

移植用軟骨様細胞シート作製に関するプロセス工学的研究

関節軟骨は特有の細胞外マトリックス（ECM）（アグリカン、II 型コラーゲン）を含み、関節運動において常に強い荷重を受ける組織であるが、血管や神経を欠き、組織中の細胞密度が低く、細胞の増殖能も低いことから、軟骨組織の自己修復能力は極めて低く、損傷や変性した後の再生は極めて限定的である。関節軟骨の損傷や変性は、長期的には変形性関節症に進行し、痛みや可動域制限によって患者の Quality of life（QOL）の低下を引き起こす。変形性関節症の患者数は国内だけで 1000 万人以上といわれており、今後さらに増加すると考えられる。一方で、現在行われている関節軟骨の治療はそれぞれ欠点を有する上、効果は非常に限定的であり、現在のところ有効な治療法はない。そこで、これらの欠点を解決するために間葉系幹細胞（MSC）を使用した軟骨再生医療が考えられており、我々は今回、MSC を用いた移植用軟骨様細胞シート作製に関するプロセス工学的研究を行った。

すなわち、MSC の分離、増殖、分化、三次元組織化などの多数の工程を経て軟骨様細胞シートを作製するが、臨床応用のためには、安定的に安全な軟骨様細胞シートを作製する方法や、作製した軟骨様細胞シートの品質評価方法の開発などを達成しなければならない。

そこで本研究では、MSC を用いて移植用の軟骨様細胞シートを作製するプロセスにおいて、一定の形状の軟骨様細胞シートを動物由来成分を用いずに作製する方法、および作製した軟骨様細胞シート中の細胞の非侵襲的な分化度評価方法の検討を行った。

本論文は序論および総括を含む 6 章から構成されている。

第 1 章は序論であり、本研究の背景および目的を明らかにした。

第 2 章では、MSC から一定の形状の軟骨様細胞シートを作製する方法の検討のため、軟骨様細胞シート作製における培地組成の検討を行った。MSC を隔膜培養器であるセルカルチャーインサートに播種し、種々の培地で培養を行った。その結果、従来使用されていた軟骨分化培地を使用した場合、培養中に細胞シートが収縮した。また、これを基に考案した種々の改変培地のうち、血清を含まない培地では同様の収縮が見られた。一方、軟骨分化培地と増殖培地を 1:1 で混合した血清を含む培地を用いた場合、収縮が起こらずにほぼ一定の大きさの円盤状の軟骨様細胞シートを作製することに成功した。また、この方法で作製した軟骨様細胞シートは、収縮した場合に比べアグリカンや II 型コラーゲンといった軟骨関連遺伝子の発現が顕著に高い傾向があり、細胞シート中の MSC が効率よく軟骨細胞に分化したことが示唆された。

第 3 章では、移植用として安全な軟骨様細胞シート作製のため、異種動物由来成分を使用しない Xeno-free 法で軟骨様細胞シートを作製する方法の検討を行った。そこで、初めに分化培養に使用するウシ胎児血清（FBS）を、より安全と考えられるヒト血清（Xeno-free 法）に変え培養を行った。その結果、ヒト血清を使用した場合でも FBS を使用した場合と同等の形状、サイズを有する軟骨様細胞シートを作製することに成功した。さらに、細胞シートの性状を詳細に分析するため組織学染色および硫酸化グルコサミノグリカン、II 型コラーゲンの蓄積量を定量した。両者の間に組織学的な差は

見られず、定量の結果も同等であったことから、ヒト血清を使用することで軟骨様細胞シート作製を Xeno-free 法で行うことが可能であることが示された。さらに、増殖培養の工程を含めた、培養の全工程を Xeno-free 化するために、FBS 含有培地およびブタトリプシンの代わりに無血清培地および組換えプロテアーゼを用いて増殖させた MSC を使用し、軟骨様細胞シートの作製を検討した。その結果、Xeno-free で増殖した MSC を使用し、さらに軟骨様細胞シート作製にはヒト血清を含む培地を使用することにより、完全に Xeno-free 法で軟骨様細胞シートを作製できることを明らかにした。

第 4 章では、移植後の軟骨様細胞シートの生着、生存性を向上させるために、軟骨様細胞シート中の II 型コラーゲン蓄積量の増加を検討した。すなわち、軟骨様細胞シート作製時に培地に II 型コラーゲン遺伝子発現に有効と考えられる種々の添加物を加えることで、II 型コラーゲンの産生量の増加を検討した。その結果、アスコルビン酸を高濃度 (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で添加した場合、細胞シート中の II 型コラーゲン蓄積量が約 2 倍と顕著に増加した。また、I 型アテロコラーゲン (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加した場合にも細胞シート中の II 型コラーゲン蓄積量が約 4 倍と顕著に増加した。さらに、軟骨様細胞シート作製時にアスコルビン酸と I 型アテロコラーゲンを同時に添加したところ、II 型コラーゲンの蓄積量は無添加条件と比較して最大約 8 倍に増加した。ここでは、アグリカンや II 型コラーゲンの遺伝子発現が増加すると共に、ECM を分解するマトリックスメタロプロテアーゼ 13 (MMP-13) の発現が顕著に抑制されていた。このことから、アスコルビン酸と I 型アテロコラーゲンの添加効果には、II 型コラーゲンの合成の促進だけではなく、分解の抑制による、軟骨様細胞シート中の II 型コラーゲンの増加も含まれることが示唆された。これにより、軟骨様細胞シートの II 型コラーゲン量を従来の約 8 倍に増加させる培養方法を開発することができた。

第 5 章では、移植用軟骨様細胞シート中の細胞の軟骨細胞への分化度の非侵襲的評価方法について検討を行った。ここで、非侵襲的に行うことが可能である培養上清分析に注目し、軟骨細胞特異的な物質の上清中の濃度測定を行うことにより、軟骨細胞への分化度を推定できないか検討した。すなわち、軟骨細胞が特異的に産生する物質であるメラノーマ阻害活性 (MIA) の比生産速度と軟骨細胞分化マーカーであるアグリカン遺伝子発現率との関係を調べた。その結果、軟骨細胞の再分化培養において、アグリカン遺伝子発現率と細胞当たりの MIA 比生産速度との間に、アグリカン遺伝子発現率が約 100 % までは明確な正の相関関係が見られた。さらに MSC の軟骨分化培養においても同様に測定したところ、アグリカン遺伝子発現率と MIA 比生産速度との間に同様の相関関係が見られた。このことから、軟骨様細胞シート作製時に、上清中の MIA 濃度の変化を定量することにより、非破壊・非侵襲的に軟骨様細胞シート中の細胞の分化率を移植前に評価できる可能性が示された。

第 6 章では、総括として本研究で得られた成果についてのまとめおよび今後の展望を述べた。

本研究では、軟骨再生医療を目的とした II 型コラーゲン含量の多い MSC 由来移植用軟骨様細胞シートを収縮なく、かつ、より安全に作製する、さらには非侵襲的細胞分化率評価方法をも考案し、MSC から移植用軟骨様細胞シート作製の培養プロセスを考案した。