学位論文審査結果の報告書

氏　　名	平野 成彦
生　年　月　日	1981年 11月 4日
本 籍（国 籍）	韓国
学 位 の 種 類	博　士（医 学）
学 位 記 番 号	医　第1246号
学位授与の条件 （博士の学位）	学位規程第５条該当
論　文　題　目	ヒト耳介軟骨細胞と複合型吸収性スキャフォールド（nanoPGA / PCL）を用いた耳介形状軟骨の再生誘導
学位論文受理日	2017年　11月　8日
学位論文審査終了日	2018年　1月　18日
審　査　委　員　（主　査）	福田　寛二　㊞
（副主査）	梶　博史　㊞
（副主査）	重吉　康史　㊞
（副　査）	㊞
指　導　教　員	磯貝 典孝　㊞

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

耳介形状軟骨の再生において，生体内で3次元形状を維持する事が困難であった．3次元耳介形状を維持する方法を確立するために，PGAナノファイバー（nanoPGA）とポリ-ε-カプロラクトン（PCL）を組み合わせた，複合型吸収性スキャフォールドを作製した．この研究では，nanoPGAにおける播種細胞の生存率を検討した．さらに複合型吸収性スキャフォールドをエタノールで処理して親水性を高め，軟骨の再生に対する効果を検討した．

【方法】

たち耳手術時に採取したヒト耳介軟骨から軟骨細胞を単離し，in vitroで増殖させた．その後nanoPGA，従来のPGAに播種し，生細胞数の経時的変化を比較検討した．さらにこれらの細胞を吸収性複合足場（nanoPGA / PCL）上に播種し，無胸腺マウスに移植した．移植後10および20週で，肉眼的形態および軟骨再生量の画像解析，組織学的検討，Ⅱ型コラーゲン，Elastin，Sox 5，Caspase 8，Caspase 9，IL-1αのmRNA発現をリアルタイムPCRにより検討した．

【結果】

培養5日目のnanoPGA群における生細胞数の割合は，従来のPGA群に比較して有意に高い値を示した．生体内に移植10週後，エタノール処理群では白色光沢を帯びた軟骨組織で覆われていたのに対し，対照群は薄い結合組織と軟骨再生が散発的に局在していた．エタノール処理による複合型吸収性スキャフォールドの改質は，SOX5の発現を促進し，IL-1αの発現は低下した．20週間後，エタノール処理により軟骨基質面積，被覆率は経時的に増加し，サフラニンO陽性染色はスカフォールド内部に拡大していることが分かった．

【考察】

播種細胞のスキャフォールドへの接着はナノファイバー化したPGAを使用することで，従来のPGAと比して明らかに良好であることが判明した．また，複合型吸収性スキャフォールドの表面性状をエタノール処理にて改質する事で，Sox5の上昇，IL-1αの低下が見られ，軟骨基質の産生が経時的に促進されることが判明した．複合型吸収性スキャフォールドにおける軟骨再生は，足場材料の周囲と中心に向けて同時進行しており，このことから，最終的に足場材料は再生軟骨に置換され得る可能性が示唆された．

【結論】

表面改質した複合型吸収性スキャフォールドは，高い軟骨再生能と三次元形状を維持するために必要な高い力学的特性を有しており，今後，本技術は三次元形状軟骨の再生誘導を臨床応用する上で有用な基盤技術になり得ることが期待される．

博士論文の印刷公表	公　表　年　月　日	出版物の種類及び名称
	平成30年 6 月末　公表予定	博士学位論文 近畿大学医学雑誌 第43巻　第1，2号 平成30年 6 月末　発行予定
	ヒト耳介軟骨細胞と複合型吸収性スキャフォールド（nanoPGA / PCL）を用いた耳介形状軟骨の再生誘導	
	全　　文	

論 文 審 査 結 果 の 要 旨

1）論文内容の要旨

【目的】

耳介形状軟骨の再生において、生体内で3次元形状を維持する事が困難であった。3次元耳介形状を維持する方法を確立するために、PGAナノファイバー（nanoPGA）とポリ-ε-カプロラクトン（PCL）を組み合わせた、複合型吸収性スキャフォールドを作製した。この研究では、nanoPGAにおける播種細胞の生存率を検討した。さらに複合型吸収性スキャフォールドをエタノールで処理して親水性を高め、軟骨の再生に対する効果を検討した。

【方法】

たち耳手術時に採取したヒト耳介軟骨から軟骨細胞を単離し、in vitroで増殖させた．その後nanoPGA、従来のPGAに播種し、生細胞数の経時的変化を比較検討した。さらにこれらの細胞を吸収性複合足場（nanoPGA / PCL）上に播種し、無胸腺マウスに移植した。移植後10および20週で、肉眼的形態および軟骨再生量の画像解析、組織学的検討、Ⅱ型コラーゲン、Elastin、Sox 5、Caspase 8、Caspase 9、IL-1αのmRNA発現をリアルタイムPCRにより検討した。

【結果】

培養5日目のnanoPGA群における生細胞数の割合は、従来のPGA群に比較して有意に高い値を示した．生体内に移植10週後、エタノール処理群では白色光沢を帯びた軟骨組織で覆われていたのに対し、対照群は薄い結合組織と軟骨再生が散発的に局在していた。エタノール処理による複合型吸収性スキャフォールドの改質は、SOX5の発現を促進し、IL-1αの発現は低下した。20週間後、エタノール処理により軟骨基質面積、被覆率は経時的に増加し、サフラニンO陽性染色はスカフォールド内部に拡大していることが分かった。

【考察】

播種細胞のスキャフォールドへの接着はナノファイバー化したPGAを使用することで、従来のPGAと比して明らかに良好であることが判明した。また、複合型吸収性スキャフォールドの表面性状をエタノール処理にて改質する事で、Sox5の上昇、IL-1αの低下が見られ、軟骨基質の産生が経時的に促進されることが判明した。複合型吸収性スキャフォールドにおける軟骨再生は、足場材料の周囲と中心に向けて同時進行しており、このことから、最終的に足場材料は再生軟骨に置換され得る可能性が示唆された。

【結論】

表面改質した複合型吸収性スキャフォールドは、高い軟骨再生能と三次元形状を維持するために必要な高い力学的特性を有しており、今後、本技術は三次元形状軟骨の再生誘導を臨床応用する上で有用な基盤技術になり得ることが期待される。

2）審査結果の要旨

本研究は、新規複合型吸収性スキャフォールドに注目した軟骨再生に関する独創的研究である。この発表に対して、主査である福田寛二教授、副主査である重吉康史、梶博史両教授が質問した。

質問内容は、(1) エタノール処理による改質の意義 (2) 臨床応用における可能性と限界 (3) 播種した軟骨細胞の分化度と幹細胞を使用しなかった理由 (4) 耳介軟骨と他の軟骨（硝子軟骨や線維軟骨）との違い (5) ナノファイバーの至適径の決定方法 (6) 軟骨マーカーSOX系の中で、SOX5を選択した理由 (7) SOX5、6、9の発現の差、についてであった。これらの多方面にわたる質問に対して、著者は、具体的な例をあげながら極めて的確に応答した。著者はこの研究を論理的に遂行し、臨床応用が可能なレベルに研究成果をまとめ、指導能力もあると考えた。したがって、主査・副主査は合議の上、提出された学位論文が確かに平野成彦氏の研究成果であること、学位授与にふさわしい外科的知識や能力を合わせて持つものと判断した。

3）最終試験の結果：合格と判定する

4）学位授与の可否：可