

学位論文審査結果の報告書

氏 名 中 尾 仁 美

生 年 月 日 昭和・平成 55 年 12 月 21 日

本 籍 (国籍) 日本

学位の種類 博 士 (医 学)

学位記番号 医 第 1178 号

学位授与の条件 学位規程第5条該当
(博士の学位)

論 文 題 目 ヒトたち耳および小耳症軟骨細胞を用いて
誘導した再生軟骨とその長期移植成績

審 査 委 員

(主 査) 磯貝 典孝



(副主査) 福田 寛二



(副主査) 重吉 康史



(副 査)



(副 査)



論文内容の要旨

【目的】

小耳症治療における耳介形成術に、大きな軟骨塊を得られる肋軟骨が利用されている。しかし肋軟骨採取による術後瘢痕、胸郭の陥凹変形や術後疼痛といった手術侵襲が問題となっている。そこで、肋軟骨に変わる生体材料として、小耳症治療で廃棄されてしまう残存耳介軟骨に着目し、細胞供給源として利用可能か、またヒト耳介軟骨細胞から正常耳と同等の耳介軟骨の再生が可能か検討した。

【方法】

ヒト耳介形態異常の中で、小耳症およびたち耳の手術時に採取した2種類のヒト耳介由来軟骨組織からヒト耳介軟骨細胞を使用した。ナノファイバーPGA不織布に播種後、4～6週齢無胸腺マウス背部皮下に移植し、5、10、20、40週間後に再生軟骨を採取し、採取組織の肉眼所見および形状計測、組織学的検討、Ⅱ型コラーゲン、Elastin、Sox 5、Ⅲ型コラーゲンのmRNA発現をリアルタイムPCRにより検討した。さらに細胞増殖因子(OP-1)徐放化システムを導入し、軟骨再生の促進効果について検討した。

【結果】

再生軟骨は両群ともに比較的厚い軟骨膜に覆われ、軟骨部には大型で丸い軟骨細胞が、単独あるいは数個集って、基質の中の軟骨小腔に粗に存在していた。たち耳群に優位に豊富なプロテオグリカンが存在し、両群で軟骨膜に連続する弾性線維が密な網状構造を形成し、軟骨部の全体に広がっている像が観察された。OP-1徐放化システムにより、明らかな組織変化および遺伝子発現の上昇は認められなかった。しかし、両群ともに再生軟骨の厚さが増加傾向を示した。軟骨関連遺伝子であるⅡ型コラーゲン、Elastin、Sox 5は経時的に増加傾向を認め、Ⅲ型コラーゲンは減少傾向を認めた。

【考察】

両群のヒト耳介軟骨細胞から誘導した再生軟骨において、Sox 5のmRNAが移植後の長期間にわたって発現されていることが判明したことから、ヒト耳介軟骨細胞を用いて良好な再生組織の誘導と維持が可能であることが示唆された。OP-1徐放化システムを利用することにより厚みをもった軟骨再生を誘導できることから、耳介の形状をもった3次元軟骨の誘導の一助となる可能性が示唆された。

【結論】

PGAナノファイバーを細胞の足場として利用し、ヒト小耳症軟骨およびヒトたち耳軟骨のヒト耳介軟骨細胞から耳介軟骨再生が可能であることが示唆された。また、移植後の長期間にわたって良好な形状維持と軟骨関連遺伝子発現が認められた。OP-1徐放化システムを利用することで厚みをもった耳介軟骨再生が可能であることが示唆された。今後、播種細胞への栄養拡散や高分子の長期3次元形状維持に残された課題を解決することにより、組織工学的手法は小耳症の新たな治療法として確立され臨床応用され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 26 年 12 月 日 公表予定 | 出 版 物 名 近畿大学医学雑誌 第 39 卷 第 3, 4 号 平成 26 年 12 月 日 発行予定 |
| | 公 表 内 容 | |
| | 全 文 | |

論文審査結果の要旨

本研究では、正常耳介軟骨の性状に近いヒトたち耳軟骨および小耳症軟骨の2種類のヒト耳介由来軟骨組織から単離した軟骨細胞を用いて再生誘導を試み、再生軟骨の性状に関する長期結果の比較検討を試みた。

方法

実験では、培養したヒトたち耳軟骨細胞および小耳症軟骨細胞を高分子に播種した。長期移植成績の特徴を詳細に理解するため、無胸腺マウスの背部皮下に細胞・高分子の複合体を移植して軟骨再生を誘導し、再生軟骨の形状、組織像およびmRNA発現の変化について比較検討した（実験1）。さらに、軟骨再生に重要な役割を果たすサイトカインとしてOP-1を選択し、細胞増殖因子（OP-1）徐放化システムが再生軟骨に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした（実験2）

結果





実験1では、両群のヒト耳介軟骨細胞から軟骨再生が可能であることが判明した。また、移植後の長期間にわたって良好な形状維持と軟骨関連遺伝子発現が認められた。実験2では、OP-1徐放化システムによる明らかな組織変化および遺伝子発現の上昇は認められなかった。しかし、両群ともに再生軟骨の厚さが増加傾向を示した。

考察およびまとめ

临床上、小耳症軟骨の有用性はないと考えられており、小耳症に対する耳介再建術では、残存する小耳症軟骨は余剰軟骨として手術中に除去される。一方、軟骨再生において小耳症軟骨が有用な細胞供給源となり、この細胞から臨床的に必要な大きさと複雑な3次元形状を長期的に維持するヒト耳介形状軟骨の再生誘導ができるとすれば、従来の肋軟骨採取は不要となり、ドナー犠牲のない理想的な耳介再建が可能となる。この観点から、小耳症軟骨細胞の基礎研究は積極的に進められるべき領域と考えられるが、これまでの報告は数少なく、その有用性については未知の部分が多い。本研究結果は、ヒト軟骨細胞をナノファイバーと組み合わせることにより（1）良好な再生軟骨の長期移植成績が得られること（2）軟骨再生において小耳症軟骨を新たな細胞供給源として利用することが可能であることを示唆しており、今後、3次元形状軟骨の再生誘導を臨床応用する上で、重要な価値を有すると考える。

博士學位論文最終試験結果の報告書

平成 27 年 1 月 27 日

| | | | |
|---------|--------------------------------------|-------|---|
| 審 査 委 員 | 主 査 | 磯貝 典孝 |  |
| | 副主査 | 福田 寛二 |  |
| | 副主査 | 重吉 康史 |  |
| | 副 査 | |  |
| 学位申請者氏名 | 中 尾 仁 美 | | |
| 論 文 題 目 | ヒトたち耳および小耳症軟骨細胞を用いて誘導した再生軟骨とその長期移植成績 | | |

要 旨

従来の耳介形状軟骨の再生誘導に関する研究において、ヒト耳介軟骨細胞から耳介特有の質感を反映する軟骨再生が可能かどうか、さらに小耳症軟骨を細胞供給源として利用することが可能かどうかに関しては、未解決な問題として残されている。そこで本研究では、正常耳介軟骨の性状に近いヒトたち耳軟骨およびヒト小耳症軟骨から単離した軟骨細胞をナノファイバーPGAと組み合わせて再生誘導を試み、再生軟骨の長期結果を比較検討した（実験1）。さらに本モデルに細胞増殖因子（OP-1）徐放化システムを導入して、OP-1による軟骨再生の促進効果について検討した（実験2）。その結果、実験1では、両群のヒト耳介軟骨細胞から軟骨再生が可能であることが判明した。また、移植後の長期間にわたって良好な形状維持と軟骨関連遺伝子発現が認められた。実験2では、OP-1徐放化システムによる明らかな組織変化および遺伝子発現の上昇は認められなかった。しかし、両群ともに再生軟骨の厚さが増加傾向を示した。

本研究結果は、ヒト軟骨細胞をナノファイバーと組み合わせることにより (1) 良好な再生軟骨の長期移植成績が得られること (2) 軟骨再生において小耳症軟骨を新たな細胞供給源として利用することが可能であることを示唆しており、今後、3次元形状軟骨の再生誘導を臨床応用する上で、重要な価値を有すると考える。

この発表に対して、副査より (1) ナノファイバーPGAにおける播種細胞の分布 (2) 播種細胞における軟骨関連遺伝子（Sox 5）の意義 (3) 徐放化システムのメカニズム、(4) 弾性散骨と硝子軟骨におけるOP-1の作用が異なる理由、などについて質問があり、発表者は適切に答えることができた。よって、最終試験に合格したと考える。