

博士學位論文

内容の要旨

および

審査結果の要旨

平成 27 年 12 月

近畿大学大学院

医学研究科

学位論文審査結果の報告書

氏 名 西脇 仁

生 年 月 日 昭和・平成 53年 11月 24日

本 籍 (国籍) 日本

学位の種類 博 士 (医 学)

学位記番号 医 第 1196 号

学位授与の条件 学位規程第5条該当第2項該当
(博士の学位)


論 文 題 目 微細加工装置により作製したマイクロ軟骨を
細胞供給源とする新規軟骨再生誘導法の開発

審 査 委 員

(主 査) 福田 寛二 

(副主査) 重吉 康史 

(副主査) 梶 博史 

(副 査) 

(副 査) 

論文内容の要旨

【目的】

軟骨組織の再生修復能は極めて低く、また軟骨欠損部への軟骨片移植の臨床成績も芳しくない。近年では幹細胞を用いた軟骨再生誘導法が有望視されているが、幹細胞単離にかかるコストや加工手技に伴う細胞汚染・細胞障害等の諸問題が指摘されている。そこで本研究では、均一サイズに加工された微細軟骨組織片（以下マイクロ軟骨と略す）を幹細胞供給源とし、さらに移植時サイトカインを併用することで、培養行程を介さない軟骨再生誘導が可能であると推測し、その至適条件について検討した。

【方法】

まず軟骨を低侵襲的に微細加工する装置を作製し、至適マイクロ軟骨サイズの検討を行った（実験1）。次に塩基性線維芽細胞増殖因子（basic fibroblast growth factor/bFGF）徐放化システムを微細加工していない従来の軟骨移植に用い、その有用性を評価した（実験2）。さらに前述のマイクロ軟骨を吸収性足場材料に接着させ、マイクロ軟骨・足場材料・bFGF徐放化システムを組み合わせた移植を行い、細胞培養行程を介さない新規軟骨組織再生誘導を試みた（実験3）。

【結果】

実験1によるマイクロ軟骨内の軟骨細胞数および細胞活性度評価より、マイクロ軟骨の至適サイズは100～400 μm前後であると推測された。また実験2により、自家軟骨移植時にbFGF徐放化システムを併用することでSOX5活性化を伴う軟骨細胞増殖が有意に促進されることが示された。さらに実験3では、bFGF徐放化システムによるbFGF拡散の程度はマイクロ軟骨のサイズに依存し、比較的小型の100 μm群においてSOX5発現亢進を介した軟骨再生が最も効率よく行われることが明らかとなった。

【考察】

本研究により、マイクロ軟骨の至適サイズは周囲からの栄養拡散が良好でありかつ微細加工による細胞障害の影響が少ない大きさであり、さらに足場材料となるPGA不織布への接着性の良否も軟骨の再生誘導に重要な要素であると考えられた。またbFGF徐放システムの併用により、本サイトカインによる生理的組織修復機構が効率的に働き、マイクロ軟骨内に存在する幹細胞増殖が促進されることが考えられた。転写因子SOX5は前軟骨芽細胞より軟骨芽細胞への分化を決定づける重要な役割を担うとされ、本研究における軟骨再生の指標として極めて有用であった。

【結論】

微細加工装置により作製したマイクロ軟骨にサイトカインを併用することで軟骨組織の分化増殖を促しうることが示され、培養行程を介さない新規軟骨再生誘導法の可能性が示唆された。

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27年12月 日 掲載予定	出版物名
	微細加工装置により作製したマイクロ軟骨を細胞供給源とする新規軟骨再生誘導法の開発	近畿大学医学雑誌 第40巻 第3・4号
	全 文	平成27年12月 日 掲載予定

論文審査結果の要旨

本研究では、マイクロ軟骨を用いた新規軟骨再生技術の確立を試みた。まず実験1では、軟骨を低侵襲的に微細加工する装置を作製し、加工したマイクロ軟骨に含まれる生軟骨細胞数および細胞活性の評価などから、再生誘導に適したマイクロ軟骨サイズの検討を行った。次に実験2では、塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor/bFGF)徐放化システムを自家軟骨移植に併用し、本サイトカインが移植後軟骨片に及ぼす影響を評価した。さらに実験3では、マイクロ軟骨を吸収性足場材料に接着させ、マイクロ軟骨・足場材料・bFGF徐放化システムを組み合わせた自家移植を行い、細胞培養行程を介さない新規軟骨組織再生誘導を試みた。

方法：実験1では、独自に作製した微細加工装置を用い、軟骨組織を微細加工して再生医療用マイクロ軟骨を製造した。各サイズ(立方体：100, 200, 400 μm)に微細加工されたマイクロ軟骨に含まれる生軟骨細胞数および細胞活性の評価には、フローサイトメトリー法を用いた。実験2では、デルマパンチを用いて、採取した耳介軟骨から小円型(直径5 mm、厚さ約500 μm)の自家軟骨片を作製した。bFGF徐放システムを投与した後、軟骨片を自家移植し移植後5週目における形状変化および組織学的評価を行った。実験3では、作製したマイクロ軟骨・PGA複合体にbFGF徐放化システムを併用して自家移植し、移植後5週目における移植片の肉眼的観察、組織学的評価(トルイジンブルー染色、サフラニンO染色)、免疫組織学的評価(II型コラーゲン、SOX5)を行った。

結果

(1) 実験1の結果より、酵素処理による細胞回収率が最も高く、かつ微細加工による機械的細胞障害の少ないマイクロ軟骨の至適最少サイズ(立方体)は、100 μm前後となることが推測された。

(2) 実験2の結果より、自家軟骨移植時にbFGF徐放化システムを併用することで、SOX5活性化を伴う軟骨細胞増殖が促進される可能性が示唆された。

(3) 実験3の結果より、bFGF徐放化システムによるbFGF拡散の程度は、マイクロ軟骨のサイズに依存し、比較的小型の100 μm群においてSOX5発現亢進を介した軟骨再生が最も効率よく行われていることが示唆された。

考察およびまとめ

本研究では、PeerらとLuらが発案した自家軟骨移植による軟骨再生法をさらに発展させ、低侵襲・簡便・正確に微細加工したマイクロ軟骨・bFGF徐放化システム・足場材料(PGA)を組み合わせた複合体を自家移植して軟骨組織の再生誘導を試みた。特にマイクロ軟骨に関する実験(実験1)では、マイクロ軟骨サイズの最適化を試みた。またbFGF徐放化システムによる軟骨再生誘導の指標として、軟骨細胞増殖にかかわる転写因子SOX5の発現量を評価した。本研究結果から、微細加工装置を用いて作製したマイクロ軟骨を細胞供給源とする軟骨再生誘導法は新たな耳介再建術として有用であり、今後の臨床展開において有用な手法となることが考えられた。

審査結果の要旨および最終試験の結果(可否)





この発表に対して、主査および副主査より、微細加工装置について(1)微細加工できる軟骨組織のサイズ(2)ヒト軟骨においても使用加工か(3)これまでに微細加工された軟骨を用いた報告がなされているか(4)Flow cytometryの具体的手技(5)SOX5発現領域とbFGF作用部位との関係(6)再生新法における本研究の位置づけ、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。

学位授与の可否に関する意見

本論文は、軟骨の再生誘導法において細胞供給源として微細加工されたマイクロ軟骨を使用した極めて独創的研究である。申請者(西脇 仁)は、これまでに報告のない研究を論理的に進め、臨床応用が可能なレベルに研究成果をまとめた。研究遂行能力と伴に研究指導能力があり、学位授与に値すると考える。

博士学位論文最終試験結果の報告書

平成 27 年 10 月 29 日

審査委員	主査	福田 寛二	
	副主査	重吉 康史	
	副主査	梶 博史	
	副査		
学位申請者氏名	西脇 仁		
論文題目	微細加工装置により作製したマイクロ軟骨を細胞供給源とする新規軟骨再生誘導法の開発		
要旨	<p>本研究では、より実際的な新規軟骨再生誘導法の開発を試みた。まず実験1では、軟骨を低侵襲的に微細加工する装置を作製し、再生誘導に適したマイクロ軟骨サイズの検討を行った。その結果、細胞利用率が最も高いマイクロ軟骨の至適最少サイズ（立方体）は、100 μm 前後であると推測された。次に実験2では、塩基性線維芽細胞増殖因子（basic fibroblast growth factor/bFGF）徐放化システムを軟骨移植に併用し、本サイトカインが移植後軟骨片に及ぼす影響を評価した。その結果、自家軟骨移植時にbFGF徐放化システムを併用することで、SOX5活性化を伴う軟骨細胞増殖が促進されることが示された。さらに実験3では、マイクロ軟骨を吸収性足場材料に接着させ、マイクロ軟骨・足場材料・bFGF徐放化システムを組み合わせた複合体の自家移植を行い、細胞培養行程を介さない新規軟骨組織再生誘導を試みた。その結果、bFGF徐放化システムによるbFGF拡散の程度はマイクロ軟骨のサイズに依存し、比較的小型の100 μm群においてSOX5発現亢進を介した軟骨再生が最も効率よく行われることが示唆された。</p> <p>以上の結果より、微細加工装置により作製したマイクロ軟骨にサイトカインを併用することで軟骨組織の分化増殖を促しうることが示され、培養行程を介さない新規軟骨再生誘導法の可能性が示唆された。本研究は、3次元形状軟骨の再生誘導法として独創的であり、今後の臨床応用において極めて有用な価値を有すると考える。審査委員（主査、副主査）は、本学位論文が論文提出者（西脇 仁）の研究成果であることを確認した。</p>		