

# 複合型コラーゲン足場材料内での間葉系幹細胞の増殖分化制御による軟骨様人工組織の構築に関する研究

中牟田, 侑昌

<https://doi.org/10.15017/1807090>

---

出版情報：九州大学, 2016, 博士（工学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：全文ファイル公表済

氏 名 中牟田 侑昌 (ナカムタ ユウスケ)

論 文 名 : 複合型コラーゲン足場材料内での間葉系幹細胞の増殖分化制御による  
軟骨様人工組織の構築に関する研究

区 分 : 甲

## 論 文 内 容 の 要 旨

近年、変形性関節症や関節リウマチ等により損傷した軟骨に対して、再生医療の適用が検討されている。再生医療の技術的基盤が組織工学であり、軟骨に関しても組織工学的方法による人工組織の開発研究が進み、一部臨床応用も始まっている。代表的な人工組織は、コラーゲンゲルのような足場材料の内部で軟骨細胞を増殖させ、細胞外基質を形成させることで作製した組織様構造体である。細胞源としては、患者自身の軟骨細胞が主に用いられているが、健全な関節の一部から軟骨組織を採取するために、新たな損傷を加えることになってしまう。そこで、新たな細胞源として、骨髄から採取可能なヒト間葉系幹細胞 (hMSC) の使用が検討されている。患者本人から採取した hMSC は拒絶反応がない利点があるが、多種の細胞への分化能を有するため、軟骨細胞への分化を制御する必要がある。さらに、細胞の分化と増殖および細胞外基質形成をサポートする適切な足場材料の開発も重要な課題であり、未だに生体軟骨と同等の構造と力学特性を有する人工組織は作られていないのが現状である。

本論文は、力学特性に優れる足場材料を用いて hMSC と組み合わせることで軟骨様人工組織を作製するための基礎技術の確立を目的としている。軟骨再生用新規足場材料として開発したコラーゲンゲル/スポンジ複合材と hMSC の培養系において、軟骨細胞への分化と細胞増殖の両方を達成するための培養環境の設定、および細胞増殖と細胞外基質形成が圧縮力学特性に及ぼす影響を明らかにするために実験的研究を行っている。

第 1 章では、研究の背景と目的について述べている。まず、軟骨の構造について概説し、続いて再生医療と組織工学について説明している。さらに、現在の軟骨再生医療について概説し、その問題点について説明している。次いで、そのような背景の下、力学特性に優れる軟骨再生用足場材料の開発と hMSC を用いた軟骨再生法の確立を目的とすることを述べ、本論文の構成について説明している。

第 2 章では、軟骨再生用の新規足場材料として開発したゲル/スポンジ複合材に

hMSC を播種後、軟骨分化培地を加え、最長 14 日間の軟骨分化培養実験を行っている。圧縮力学特性、細胞数、ALP 活性、軟骨分化マーカー等の評価、および FE-SEM による微視構造観察を行い、軟骨分化培養の影響について検討している。その結果、hMSC が軟骨細胞へと順調に分化している様子が確認され、ゲル/スポンジ複合材が足場材料として、十分な機能を有していることが示唆された。また、軟骨分化培養のみでは、細胞数がほとんど増加せず、圧縮弾性率は足場材料の劣化が原因で培養日数とともに低下していくことを明らかにしている。

第 3 章では、細胞数を増加させるための新規培養法として、2 種類の組み合わせ培養法を提案している。細胞増殖培養と軟骨分化培養を組み合わせた培養環境 A と軟骨分化培養と軟骨細胞増殖培養を組み合わせた培養環境 B を比較した結果、両培養環境ともに、順調に hMSC の軟骨細胞への分化と細胞数の増加、ならびに圧縮力学特性の増大が行われていることを確認している。さらに、A よりも B の方が、より優れた細胞数、圧縮弾性率、軟骨分化マーカー発現量の上昇を示しており、人工軟骨組織を作製する培養条件としてより有効であることを見出している。また、足場材料の表面では、軟骨細胞の脱分化による線維芽細胞の存在が多数確認され、培養環境の改良が必要であることが示されている。

第 4 章では、線維芽細胞の発現を抑制し軟骨細胞を維持するために、コラーゲンゲルで全体を覆うゲルラッピング法を考案し、培養実験によりその効果を確認している。培養環境 B による 28 日間の培養実験の結果、ゲルラッピング法の導入により軟骨分化マーカーの発現量が上昇し、さらに線維芽細胞がほとんど消失し軟骨細胞特有の球状細胞の集合が多数存在することを見出し、ゲルラッピング法の有効性を明らかにしている。

第 5 章では、軟骨様組織形成に及ぼす初期播種細胞数と足場材料の厚さの影響について検討を行っている。ひとつの足場材料あたり  $1.0 \times 10^5$  個と  $2.0 \times 10^5$  個の hMSC をそれぞれ播種し、培養環境 B で 28 日間の培養実験を行った結果、最終的に細胞数は 1.7 倍、圧縮弾性率は 1.5 倍に増加することを明らかにしている。次に、生体軟骨と同等の厚み 2mm を持つ足場材料を作製し、培養環境 B で培養実験を行った結果、細胞数の増加についてはほとんど変化は無かったが、軟骨様組織が高密度化することで圧縮弾性率が 17% 程増加することが見いだされた。さらに軟骨分化マーカーの発現量の上昇も確認している。

第 6 章は総括であり、各実験研究から得られた重要事項について説明している。