

Title	コラーゲン・ゲル内培養法による軟骨細胞の基質合成と分化状態の維持
Author(s)	木村, 友厚
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35057
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【7】

氏名・(本籍)	木 村 友 厚
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 6913 号
学位授与の日付	昭和60年5月8日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	コラーゲン・ゲル内培養法による軟骨細胞の基質合成と分化状態の維持
論文審査委員	(主査) 教授 小野 啓郎 (副査) 教授 松本 圭史 教授 田川 邦夫

論文内容の要旨

(目 的)

軟骨細胞を適当な培地を用いて単層培養を行うと、細胞は球状あるいはpolygonalな形態を示し、軟骨特有のtype II コラーゲンやプロテオグリカンの合成を行うことが知られている。しかし分裂増殖とともに細胞は次第に“脱分化”し、合成されるマトリックス高分子も軟骨の特徴を失ったものになってしまう。この軟骨細胞がin vitroで分化した状態を保つためには、cell-cell contact, cell-matrix interactionなどが重要と考えられ、種々の培養条件が検討されてきた。我々は軟骨細胞の分化状態(chondrogenic phenotype)の維持には、合成されたマトリックス成分が効率よく細胞周囲に蓄積できるような、なんらかのframeworkを与えてやることがより重要と考え、細胞をコラーゲンのゲル内に埋め込んで長期培養を行い、この培養法の有用性について組織学的、生化学的に検討を加えた。

(方 法)

1. コラーゲン・ゲル内培養

13日鶏胚胸骨より0.1% trypsin-0.25% collagenaseを用いて軟骨細胞を分離した。0.3%コラーゲン(0.001 M酢酸溶液中)9 vol., 2倍濃度のHam's F-12培地9 vol., 牛胎児血清1 vol., 軟骨細胞浮遊液1 vol.を氷上で静かに混和し、径16mmのmultiwell plateに分注後すみやかにCO₂ incubator内にて37°Cに保温すると数分後にはコラーゲンはゲル化し、single cellがきれいに分散された状態で埋め込まれた(3×10⁵ cells/ml, final 0.135% collagen)。このゲルを径60mmのシャーレに移し、3日ごとに培地交換を行い、長期培養を行った。なお対照として、同じ細胞密度で通常の単層培養を行った。

2. 形態学的検討

経時的に位相差顕微鏡とH-E, toluidine blue染色により培養細胞の観察を行った。

3. 軟骨基質の分析

軟骨分化の量的指標として細胞を³⁵S-sulfateにてラベルし、硫酸化ムコ多糖の合成を測定した。さらに蓄積したムコ多糖をセルロースアセテート膜による2次元電気泳動を用いて分析した。次に軟骨のうち1つのマトリックス成分であるコラーゲンについて、¹⁴C-prolineでラベル後得られたコラーゲンをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、フルオログラフィーにより分析した。

(成 績)

1. 形態学的検討

コラーゲン・ゲル内に埋め込まれた直後の軟骨細胞は、球状の形態を示し、単一の細胞が分散された状態で埋めこまれていた。これらの細胞は球状の形態を保ったまま次第に分裂増殖し、培養6週においてもmetachromasiaを呈し、lacunaeを有する軟骨様組織として認められた。一方通常の単層培養では、細胞は次第にfibroblasticな形態となり、metachromatic matrixの蓄積も次第に減少した。

2. 酸性ムコ多糖の分析

次に硫酸化ムコ多糖合成を、cell-layerとmedium fractionに分けて分析し、コラーゲン・ゲル内培養法と単層培養法で比較した。コラーゲン・ゲル内培養では、ムコ多糖合成は培養日数とともに軽度の低下傾向はあるものの長期にわたり安定しており、またそのほとんどがmedium中へreleaseされることなく、cell-layer中に蓄積していた。一方通常の単層培養ではムコ多糖合成は培養10日以降より急速に低下し、またその大部分がmedium中へreleaseされてしまっていた。

培養6週後までに蓄積したムコ多糖を2次元電気泳動にて分析すると、コラーゲン・ゲル内培養法ではコンドロイチン硫酸に一致するmain spotと、ごく少量(5%以下)のヒアルロン酸のみを認めた。これは鶏胚胸骨より直接抽出したムコ多糖の泳動パターンと同じであった。一方単層培養法ではヒアルロン酸の蓄積が明白で、約12%を占めた。

3. 産生コラーゲンの分析

培養4日目では、コラーゲン・ゲル内培養法、単層培養法ともに軟骨特異的なtype II コラーゲンの産生が主であった。しかしながら培養6週後の比較では、通常の単層培養では細胞に脱分化がおりtype I コラーゲンの産生が主体になるのに対し、コラーゲン・ゲル内培養ではtype II コラーゲンの産生が維持されていた。

これらの結果は、軟骨細胞がコラーゲン・ゲル内で長期にわたりその分化状態を維持し得ることを示している。

(総 括)

1. 軟骨細胞をコラーゲン・ゲル内で培養することにより、in vitroで軟骨様組織の形成が可能であった。2. 軟骨細胞はコラーゲン・ゲルのframeworkの中に埋め込まれた状態で、球状の形態を保ちながらその周囲に効率よくマトリックス高分子を蓄積した。3. このようにマトリックスの蓄積を促すような frameworkにとり囲まれた状態は、軟骨細胞にとって分化状態を維持するに適した微小環境であると考えられた。4. この培養法では個々の軟骨細胞が互いに離れて分散した状態でも活発にmetachromatic matrix

を形成することができ、いわゆるcell-cell contactは軟骨細胞の分化状態の維持には重要とは考えられなかった。

論文の審査結果の要旨

本論文は軟骨細胞の分化状態をin vitroで保つために、新たな培養法の開発を目的としたものである。軟骨細胞をコラーゲンのゲルの中に埋め込んで培養するという方法を用いることにより、分化状態の維持が可能かどうか、産生される酸性ムコ多糖、コラーゲンの分析などにより検討したものである。その結果、従来の方法とは異なり、このコラーゲンゲル内培養法を用いることにより、軟骨細胞は長期にわたりムコ多糖合成を維持し、また産生されるコラーゲンも軟骨特異的なⅡ型コラーゲンであることが認められた。本研究は、軟骨組織欠損に対する同種培養軟骨細胞移植の可能性を開くものであり、学位論文にふさわしいと考えられる。