



Title	Characterization of Chondrocyte Behaviors Affecting Quality of Cultured Cartilage
Author(s)	Ali, Baradar Khoshfetrat
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49640">https://hdl.handle.net/11094/49640</a>
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。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	アリ バラダル コショフエトラット Ali Baradar Khoshfetrat
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	第 22997 号
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 基礎工学研究科物質創成専攻
学位論文名	Characterization of Chondrocyte Behaviors Affecting Quality of Cultured Cartilage (培養軟骨組織の品質に影響を及ぼす軟骨細胞挙動の特性解析)
論文審査委員	(主査) 教授 田谷 正仁 (副査) 教授 荒木 勉 教授 野村 泰伸 准教授 紀ノ岡正博

### 論文内容の要旨

From a viewpoint of manufacturing process for tissue-engineered cartilage, the understanding of mechanism for cell aggregation in a scaffold is one of the important steps to evaluate the tissue quality. Rabbit chondrocyte cells exhibited different behaviors when cultured at low and high seeding densities, and thereby led to different architectures of cell aggregates in the collagen gels. In this study, chondrocyte behaviors affecting architecture of cultured cartilage were characterized by using the tools developed to construct strategies for the quality control of tissue-engineered cartilage.

In Part I, the profiles of cell distribution and size of aggregates in collagen gel-embedded cultures with varied seeding densities were investigated by the stereoscopic image analysis as well as the observation of cultured cartilage. Seeding density was found to be an important factor that caused different mechanisms of cell distribution with the formation of aggregates and collagen type II. The detailed examination of chondrocyte behaviors in an early culture phase revealed that the division-driven and gathering-driven mechanisms led to different fates of cell aggregation, that is, the formation of dense and loose cell clusters.

In Part II, an alternative strategy based on 2-D collagen surface (CL surface) was developed to analyze the cell behaviors in 3-D mimicking environment for applying it to 3-D collagen gel culture. The aggregation behaviors of chondrocytes on the CL surface fairly coincided with the observations in the collagen gel-embedded cultures. Indeed, the CL surface enabled the quantitative evaluation of morphological behaviors for the cell aggregates in an early phase culture. The soluble factor(s) released from high seed chondrocytes were recognized to modulate the cell aggregation and the state of chondrogenic differentiation through encouraging cell-cell communication on the surface. The administration of chondrogenic growth factor, TGF $\beta$ 1, also promoted the migration of individual chondrocytes and branching of cell aggregates in the culture seeded at a low density on the CL surface in an early culture phase.

In Part III, the effect of TGF $\beta$ 1 on the migration and morphology of cells and the resultant architecture of cell aggregates in culture seeded at a low seeding density in collagen gels was examined as an extended study of the strategy described in Part II. TGF $\beta$ 1 had a culture-time dependent effect on the morphological characteristics relating to the migration and differentiation of chondrocytes. The growth factor promoted the cell migration with deteriorated proliferation in an early culture phase, and accelerates the transformation of spindle-shaped

cells to spherical-shaped ones in the prolonged culture, as evidenced by the quantitative analysis of cell morphology and gene expression as well as the observation of cultured cartilage.

The present work demonstrated that the behaviors of cell division, migration, gathering and differentiation caused spatial heterogeneity in the fate of cell aggregates in terms of distribution, size, morphology as well as collagen type II formation. The obtained results can be also applicable for the deeper understanding of cell behaviors through communications among cells with respect to regulating the architecture of cell aggregates and manufacturing cultured tissue with specific functions.

### 論文審査の結果の要旨

再生医療分野における培養組織の品質制御を目的とし、培養軟骨組織内に存在する細胞の挙動に着目して、細胞集塊形成機構について定量的評価、評価ツールの構築、サイトカイン添加による質的向上を行った。まず、ウサギ軟骨細胞のゲル包埋培養における細胞分布の空間的不均一性の形成機構について、ゲル内の酸素濃度勾配などの培養環境の不均一性が影響する細胞分裂に起因する受動的集塊形成と、分泌した増殖因子が関与するパラクラインによる細胞遊走に由来する能動的集塊形成を識別した。さらに、能動的細胞集塊については、立体的な細胞挙動観察ならびに定量的解析を実施し、細胞の播種密度が低い時は細胞の遊走が促進され、星型の細胞集塊が形成されることを見出した。特に、遊走細胞は、軟骨特有の細胞外マトリックスであるII型コラーゲンの生成に乏しく、結果として、培養軟骨組織として低品質なものへと導くことが分かった。また、細胞挙動のより精密な解析を可能とするためコラーゲン塗付面を採用した。低播種密度においては、星型細胞集塊の形成、遊走細胞のII型コラーゲン生成抑制に関して、立体的な細胞挙動と同様な結果が認められ、平面的解析が有効であることが分かった。そこで、コラーゲン塗付面上において、TGF- $\beta$ 1の添加効果について検討したところ、遊走性の点では変化がなく星型細胞集塊を形成したが、集塊形成後の集塊中心部において細胞形態が球形を呈し、II型コラーゲンの生成が顕著となることを示した。さらに、ゲル包埋培養にてTGF- $\beta$ 1の添加効果を確認したところ、平面培養と同様の結果を得ることができ、TGF- $\beta$ 1は集塊形成後の軟骨組織の品質向上を促進する効果をもつことを明らかとした。

以上、本論文は、培養軟骨細胞の集塊形成機構の観点から、培養組織の品質評価と制御に関する新たな知見を与えるものであり、博士(工学)の学位論文として価値のあるものと認める。