



Title	Impact of medium volume and oxygen concentration in the incubator on pericellular oxygen concentration and differentiation of murine chondrogenic cell culture
Author(s)	小瀬, 弘樹
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58961
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【79】	
氏 名	小 瀬 弘 樹 お ザ ひろ きゅ
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学 位 記 番 号	第 25125 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 24 年 3 月 22 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科外科系臨床医学専攻
学 位 論 文 名	Impact of medium volume and oxygen concentration in the incubator on pericellular oxygen concentration and differentiation of murine chondrogenic cell culture (培養液量とインキュベーター内の酸素濃度が軟骨細胞周囲の酸素濃度と細胞分化に与える影響についての検討)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 吉川 秀樹 (副査) 教 授 大蔵 恵一 教 授 菅本 一臣

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

近年iPS細胞などを用いた軟骨再生の研究が盛んに行われているが、限られた細胞を効率よく軟骨に分化させることは重要な課題の一つである。一般的に細胞分化は種々の培養条件 (pH、温度、重力、酸素濃度) によって影響をうける。その中でも酸素濃度は分化を決定する上で最も重要な因子の一つであることが知られており、我々は過去に低酸素条件下で軟骨細胞の分化が促進されることを報告した。

一方、乳癌細胞において培養液表面からの距離が深いほど培養液内の酸素濃度が低下するとの報告があり、インキュベーターの酸素分圧設定だけでなく培養液量の差が細胞周囲の酸素濃度に大きく関与している可能性が示唆された。そこで今回我々はインキュベーターの酸素分圧設定だけでなく、培養液量を変化させた際の培養液内の酸素濃度や細胞周囲酸素濃度 (pericellular oxygen concentration; POC) を実際に測定し、その動向が軟骨細胞の増殖と分化に与える影響を検討し、軟骨細胞培養における至適酸素濃度条件を検討することを目的とした。

〔 方 法 〕

新規に開発された低侵襲な酸素マイクロセンサー (PreSens(独)社製) を用いて、New Zealand white rabbitの膝関節内・軟骨表面の酸素濃度を測定し、過去の in vivo での軟骨酸素濃度の報告と比較することで酸素マイクロセンサー

の精度と軟骨培養に適した酸素環境を検証した。

また、in vitroではマウス軟骨細胞 (C3H10T1/2) を25cm²フラスコで培養し、インキュベーターの設定酸素分圧 (20%, 5%) と培養液量 (3700 μl, 7400 μl) を変化させ、培養液中の酸素濃度を前述のセンサーにて測定した。

軟骨分化については、至適酸素濃度をより明確にするため、上記の条件に40%の酸素分圧設定も加えて評価した。分化の評価にはalcian blue染色を定量分析し(軟骨基質産生量)、軟骨関連遺伝子のaggrecan, Col2a1発現をreal-time PCRで評価した。

[成 績]

ウサギを用いたin vivoでの膝関節、軟骨表面の酸素濃度は2.31±2.24~3.42±0.85%と過去の報告(軟骨では1~6%)と一致し、我々が普段インキュベーターで設定している20%と比較しはるかに低酸素であることを確認した。

C3H10T1/2培養液中の酸素濃度は培養液表面からの深さにしたがって低下し、培養液量が多いほど細胞周囲酸素濃度は低下していた。培養6日目の細胞周囲酸素濃度は20%下で18.99±0.81% (3700 μl、深さ1480 μm)、13.26±0.23% (7400 μl、深さ2960 μm)、5%下で4.96±0.08% (3700 μl、深さ1480 μm)、2.83±0.42% (7400 μl、深さ2960 μm)であり、培養液量の違いが細胞周囲酸素濃度に大きく反映され統計学的に有意であった ($P=0.0003$ 20%, $P=0.001$ 5%)。これは12well plateに換算すると、培養液量が500 μlの時と比較して1000 μlの時は細胞周囲酸素濃度が約2/3に低下することを意味する。

また、軟骨分化において軟骨基質産生量とaggrecan遺伝子発現は、細胞周囲酸素濃度が適切な低酸素状態 (20% 深さ2960 μm、5% 深さ1480 μm) の時、すなわち4.96±0.08~13.26±0.23%の範囲で最も促進され、極度の低酸素 (5% 深さ2960 μm)、高酸素 (40%) 環境では抑制された。

[総 括]

軟骨細胞培養においてはインキュベーター設定酸素分圧が20%の場合、培養液の深さが2960 μm以上となるように培養液量を確保すること、またインキュベーター設定酸素分圧が5%の場合、培養液の深さが1480 μm以上とならないようになることが効率よく分化促進させる為に重要であると考えられた。また、今後軟骨の再生医療を考えるうえでも、培養液量とインキュベーターの酸素分圧設定を詳細に検討することにより効率的な分化誘導が得られると考えている。

論文審査の結果の要旨

近年iPS細胞などを用いた軟骨再生の研究が盛んに行われているが、限られた細胞を効率よく軟骨に分化させることは重要な課題の一つである。軟骨培養において酸素濃度は分化を決定する上で最も重要な因子の一つであることが知られている。そこで今回我々はインキュベーターの酸素分圧設定と培養液量を変化させた際の培養液内の酸素濃度や細胞周囲酸素濃度を実際に測定し、その動向が軟骨細胞の分化に与える影響を検討し、軟骨細胞培養における至適酸素濃度条件を検討した。

軟骨細胞培養において細胞周囲の酸素濃度が4.96±0.08~13.26±0.23%の時、分化が最も促進された。具体的には設定酸素分圧が20%の場合は培養液の深さが2960 μm以上、5%の場合は培養液の深さが1480 μm以下とすることが効率よく分化促進させる為に重要であると考えられた。上記の研究での培養液量と酸素分圧を詳細に設定することで効率よく軟骨分化させることができる情報は学位の授与に値すると考えられる。