

氏 名 (本 籍) 日 高 美 代 子 (京 都 府)  
学 位 の 種 類 博 士 (医 学)  
学 位 記 番 号 博 士 第 5 4 2 号  
学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当  
学 位 授 与 年 月 日 平 成 1 9 年 3 月 2 6 日  
学 位 論 文 題 目 Transplantation of Engineered Bone Tissue Using a Rotary  
3-Dimensional Culture System

( 回 転 3 次 元 培 養 装 置 を 用 い て 作 製 し た 骨 組 織 の 移 植 )

審 査 委 員 主 査 教 授 松 末 吉 隆  
副 査 教 授 工 藤 基  
副 査 教 授 遠 山 育 夫

## 論文内容要旨

※整理番号	547	(ふりがな) 氏名	ひだか みよこ 日高 美代子
学位論文題目	Transplantation of Engineered Bone Tissue Using a Rotary 3-Dimensional Culture System (回転 3 次元培養装置を用いて作製した骨組織の移植)		
<p>【背景と目的】</p> <p>近年、生細胞と足場材料を複合化し組織の再構築を図る組織工学の研究が大きく発展し、再生培養骨移植の実現という可能性が生じてきた。骨をはじめとする生体の組織は、複雑に構成された 3 次元 (3D) 構造物である。再生培養骨移植を行うためには、<i>in vitro</i> において立体的に構築された 3D 構造物を作製する必要がある。一般的に用いられている静的培養環境下では、酸素・栄養供給が培養表面のみでしか行われなため、3D 構造物内部での細胞の生存が困難であった。そこでわれわれは回転 3D 培養装置 HARVs (high-aspect-ratio rotary vessels) に注目し、この装置に 3D 足場材料として <i>in situ</i> コラーゲンゼラチン化法を応用することにより、3D 構造物内部での細胞の生存を可能にし、<i>in vitro</i> で 3D 構造物を作製するための手法 (CG-RC 法: <i>in situ</i> Collagen Gelation using a Rotary 3-D Culture System) を確立した。本研究では、この CG-RC 法を用いて 3D 培養骨組織を作製し、この再生培養移植骨の臨床的有用性について動物モデルを用いて検討した。</p> <p>【方法】</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. ウィスター系ラット (2 日齢) の頭蓋骨から細胞を単離し、culture dish 上で培養した。これを骨芽前駆細胞として用いた。</li> <li>2. この細胞をウシ I 型コラーゲン溶液に包埋し、回転 3D 培養装置にて 3 週間培養し、3D 構造物を作製した (CG-RC 法)。培地は石灰化培地 (ascorbic acid, <math>\beta</math>-glycerophosphate) を用いた。</li> <li>3. まず作製した 3D 構造物を経時的 (1, 2, 3 週) に調べた。構造物内の細胞の代謝活性は Alkaline phosphatase (ALP) 活性と 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 代謝にて測定し、生存細胞およびその分布は共焦点レーザー走査型顕微鏡にて観察した。また、骨の生成の確認としてカルシウムの蓄積を Alizarin Red S 染色、von Kossa 染色にて観察し、さらに骨関連蛋白 (collagen I, osteonectin, osteopontin, osteocalcin) の発現を免疫組織化学染色法にて調べた。</li> <li>4. 次にこの 3D 構造物を移植し、<i>in vivo</i> において骨として機能するかどうかを明らかにする実験を行った。まずヌードマウス背部皮下へ移植し、石灰化能を有するか否かを検討した。1 ヶ月後に組織を摘出し、HE 染色、Alizarin Red S 染色、von Kossa 染色にて観察した。つぎに骨欠損動物モデルとしてラット頭蓋骨に円形の骨欠損 (直径 4mm) を作製し、同部へ移植し、3D 構造物が欠損部を修復し治癒可能か否かを調べた。対象群としてコラーゲングル担体のみ用いた。1、2 ヶ月後にそれぞれ</li> </ol>			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2 千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

摘出し、HE染色にて観察した。

#### 【結果】

CG-RC法を用い3週間培養した結果、*in vitro*において直径28.0mm、厚さ2.5mmの円柱状の3D構造物が作製可能であった。ALP活性とMTT代謝の分析結果により、この構造物内の細胞の代謝活性は経時的に増加していた。3週目の3D構造物内の生存細胞は約90%であり、均一に分布していた。カルシウムの蓄積は2週目から3週目にかけて有意に増加していた。骨関連蛋白は、1週目にcollagen I, osteonectinを、2週目以降にosteopontin, osteocalcinの発現を認めた。また、この3D構造物をヌードマウス背部皮下へ移植1ヶ月後に摘出した組織は、Alizarin Red S染色およびvon Kossa染色で陽性を示し、カルシウムの沈着が認められ、石灰化能を維持していた。この組織内には宿主からの新生栄養血管の侵入も認められた。ラット頭蓋骨欠損モデルに移植2ヶ月後、骨欠損部は全体が新生骨で覆われ、完全に修復され治癒していた。一方、対象群では骨欠損辺縁部に新生骨形成を認めるものの、中心部では骨形成が認められず、完全な修復には至っていなかった。

#### 【考察】

今回CG-RC法を用いて3週間培養後に、*in vitro*において立体的に構築された3D構造物を作製することが可能であった。*in vitro*における結果により、3D構造物内の細胞の代謝活性は経時的に増加し、3週目の3D構造物内部でも生存細胞は均一に分布していた。骨関連蛋白は、1週目に初期骨芽細胞マーカーであるcollagen I, osteonectinを、2週目以降に後期骨芽細胞マーカーであるosteopontin, osteocalcinを発現し、3D構造物内の細胞は分化していた。カルシウムの蓄積は2週目から3週目にかけて有意に増加していた。以上の結果により、*in vitro*において骨の生成が確認でき、CG-RC法を用いて3D培養骨組織を作製することが可能であった。また*in vivo*における移植実験結果により、この3D培養骨組織は骨欠損部だけではなく、異所部へ移植した場合も宿主に生着し、石灰化能を有し、良好な骨誘導能を持つことが明らかとなった。以上の結果により、CG-RC法を用いて*in vitro*で作製した3D培養骨組織は、再生培養移植骨として用いることができる可能性が示された。

#### 【結論】

CG-RC法を用いて*in vitro*で立体的に構築された3D培養骨組織(約直径28.0mm×厚さ2.5mm)を作製することに成功した。そしてCG-RC法は、再生培養移植骨を作製するために有用な方法となり得ることが示された。さらに、作製した3D培養骨組織を、ヌードマウス背部皮下とラット骨欠損部へ移植したところ、良好な骨形成能を認めたことから、再生培養骨移植の可能性が示された。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	547	氏名	日高 美代子
(学位論文審査の結果の要旨)			
<p>近年、組織工学的手法による再生培養骨移植開発が進められている。本研究は、回転 3D 培養装置 HARVs (high-aspect-ratio rotary vessels)を用いて <i>in vitro</i> での 3D 培養骨組織の作製と骨分化への過程を検討し、さらにその臨床的有用性について動物モデルを用いて検討したものである。</p> <p>培養骨組織での細胞の代謝活性 (ALP 活性、MTT 代謝)、カルシウム濃度の定量的評価および、カルシウムの蓄積を Alizarin Red S 染色、von Kossa 染色にて、骨関連蛋白の発現 (collagen I, osteonectin, osteopontin, osteocalcin) を免疫組織化学染色法にて、さらに生存細胞の分布は共焦点レーザー走査型顕微鏡にて観察した。さらに、この 3D 培養骨組織の臨床的有用性について動物モデルを用いて検討した。</p> <p>その結果、作製した組織中の細胞の代謝活性は経時的な増加を示し細胞は正常な骨分化と同様の過程であることが示され、<i>in vitro</i>において大きな 3D 培養骨組織を作製することに成功した。この 3D 培養骨組織は動物体内の異所部において、良好な生着が得られ石灰化能を維持し、頭蓋骨欠損部では良好な骨形成が示された。</p> <p>新しい培養骨組織の作製し生体内でその有効性を確認した本研究は、組織工学的手法による骨欠損の修復の研究の発展に重要と考えられ、博士 (医学) の授与に値するものと判定された</p>			
(平成 19 年 2 月 15 日)			