

## 審査の結果の要旨

岩田くみ子

本研究は成長因子と生体材料の相互作用の活用により、血清に匹敵する増殖効果をもたらす無血清培地の開発に成功し、下記の結果を得ている。

1. 自己血清に含まれる成長因子を文献的に検索し、相当する成長因子量を添加した。全血を凝血させる方法で製造した血清には主要なものとして、おおよそ、200 pg/mL EGF、12.5 ng/mL PDGF、400 pg/mL VEGF、100 pg/mL TGF $\beta$  が含まれていることが報告されている。第一に、著者はこれらの成長因子を培地中に添加して、血清の代替として細胞増殖を促進することを試みた。FGF-2 (100 ng/mL)、insulin (5  $\mu$ g/mL)、EGF (10 pg/mL)、PDGF (625 pg/mL)、TGF $\beta$  (5 pg/mL)を添加した培養液(FIC')が、無血清下で効率的な増殖を示すことがわかった。
2. 次いで、培養ディッシュのコート条件に関して検討した。著者らはこれまで、細胞・基質(素材)間相互作用を促進する培養ディッシュのコートタンパクとしてI型コラーゲン(COL)を用いてきたが、それに加えて、血清タンパクとして豊富に含まれるフィブロネクチン(FN)、ビトロネクチン(VN)、基底膜の主成分であるラミニン(LN)について増殖効果を検討し、さらに、接着や増殖を効率的に実現する播種細胞密度についても、同様に検索した。その結果FIC'培養では、LNやコートなしにくらべてCOL、FN、VNでは増殖が見られた。また、13000 cells/cm<sup>2</sup>にて播種した場合に1週で7倍、3週で10倍程度まで増殖した。
3. さらに、血清や細胞外基質に含まれるタンパク、糖で、成長因子を安定化あるいは活性化させる役割を有する各種生体材料(ヒアルロン酸(HA)、アルブミン(ALB)、ヘパリン、コラーゲン)の併用を検討した。その結果、ALB0.4 mg/mL、HA0.5 g/mLの組み合わせを添加したFIC'では、FIC'のみの増殖に対して有意に高い増殖を示した。これらの生体材料との相互作用を利用して必要な成長因子の実効的な活性維持と半減期を延長することを試みた。
4. 最後にALBならびにHA添加による細胞増殖促進は、増殖因子とHA等の生体材料の相互作用による増殖因子の安定化によるものと仮説し、増殖因子と生体材料の相互作用を促進するため、増殖因子と

生体材料の混和方法を検討した。増殖因子を培養液に最後材料に添加し、生体材料とは直接混和しない方法（Ⅰ）においては、ほとんど増殖効果が見られなかったのに対し、細胞、増殖因子と直接混和してから培養液に添加する方法（Ⅲ）では FIC' に比べ有意に増殖が促進されており、10 日間で 25 倍程度の増殖を得ることができた。

5. さらに、無血清培地の継代培養における効果を検証するため、初代のヒト耳介軟骨細胞 (P0) を 13000 cells/cm<sup>2</sup> にて播種し、HFI、FIC'、Ⅲ、Ct の各種培養液で継代を繰り返した。継代を 1 週間ごとに行い、増殖曲線を作成したところ、HFI では 3 週間で 1000 倍増を超え、混和方法方法（Ⅲ）でも 1000 倍近くまで増殖した。
6. またこの作用の分子機序を検討するため、ヒト軟骨細胞存在下または非存在下での、Ⅱ、Ⅲ 群培地に含有される FGF-2 及び insulin 濃度を、ELISA を用いて経時的（0-7 日）に測定した。Ⅲ 群培地においては細胞の有無にかかわらず FGF-2、insulin いずれもほとんど減少は見られなかった。それに対し、Ⅱ 群培地では FGF-2、insulin いずれの濃度も、培養 1 日経過後から、急激に減少し、1/200 程度になった
7. さらに、FGF-2 などの成長因子の下流に存在し、細胞増殖シグナルの指標として知られている ERK の活性化を western blotting を用いて測定した。FGF-2 との相互作用が知られている HA 0.5 g/L、及び FGF-2 100 ng/mL 添加後 5、10 分の ERK リン酸化発現量の変動を評価した。HA 添加により FGF-2 の増殖シグナルが増強することが示唆された。

今回の研究では、成長因子 FGF-2 (100 ng/mL)、insulin (5 µg/mL)、EGF (10 pg/mL)、PDGF (625 pg/mL)、TGF-β (5 pg/mL) を、HA および ALB と十分に相互作用させ培地に添加することにより、10 日間で約 25 倍程度の軟骨細胞増殖を得ることができた。HA および ALB といった担体を導入し、また、成長因子が高濃度のうちに十分に混和し、相互作用させることにより、成長因子を安定化させ、かつ効果を増強し、細胞増殖を効率的に促進することができた。幸いこれらの生体材料は、上市薬剤として既に臨床導入されている。再生医療の臨床応用で要請されることは、その一つに安全性があげられる。培地添加因子として、これらの生体材料を利用することは、安全性を確保する上で有利な選択といえる。今後、本無血清培地のような、品質や効果が安定している培養液が多数開発されれば、大量の軟骨細胞を確実に入手できるようになり、再生医療の安全性や品質を高めることが可能となる。今後、本研究のような無血清培地の開発はますます重要になってくると思われ、学位の授与に値するものと考えられる。