

〔考察〕

α と $\beta 1$ の発現ならびに BK_{Ca} 電流が生後顕著に減少したことから、 BK_{Ca} は DASMC の総 K^+ 電流を下げるという点で DA の閉鎖に寄与する可能性が考えられる。低酸素および飽和酸素条件下、paxilline が満期胎児 DA の張力に影響を与えなかったことから、 BK_{Ca} 電流は満期胎児 DA の張力に関与せず、酸素による DA 収縮にも寄与しない。未熟 DA は生後開存する傾向があるが、これは未熟 DA に BK_{Ca} が比較的多く発現していることにより説明できるのかもしれない。

〔結論〕

DA の発達に伴う BK_{Ca} の減少は正常に DA を収縮するために必要である。 BK_{Ca} 活性化剤 NS1619 は肺動脈閉鎖の場合外科的介入までの生命維持のため DA を開存する目的で臨床応用が期待される。

論文審査の要旨

動脈管開存症は小児循環器分野では比較的高頻度の先天性心疾患の一つである。カリウム (K^+) チャネル (例えば膜電位依存性や ATP 依存性) は、生後の酸素による動脈管 (DA) の収縮に関与することが知られているが、他の K^+ チャネルの研究は少ない。申請者はラージコンダクタンスカルシウム依存性 K^+ チャネル (BK_{Ca}) について詳細な検討を行った。未熟および成熟胎仔、ならびに新生仔ラット DA を用いた実験の結果、 BK_{Ca} は酸素誘導の DA の収縮には関与しないが、 BK_{Ca} 活性化剤 (NS1619) は生後の DA の開存維持に有効であることを見いだした。プロスタグランジン E (PGE) は DA の開存維持に用いられるが、副作用も多いため最良の治療法ではない点を考慮すると、外科的処置までの生命維持に BK_{Ca} 活性化剤が有効となりうると考えられた。

このように、本論文は動脈管開存症に BK_{Ca} 活性化剤が PGE に勝る可能性を示唆し、その研究は極めて意義があり、学位論文として価値あるものと判定された。

55

氏名	関根和希
学位の種類	博士 (医学)
学位授与の番号	甲第 492 号
学位授与の日付	平成 22 年 3 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 (医学研究科専攻、博士課程修了者)
学位論文題目	Assessment of the cell viability and metabolism of multi-layered cell sheets with insufficient supply of oxygen and nutrients, and a possible solution for overcoming the diffusion limit (細胞シートの多層化による 3 次元組織の構築—拡散の限界とその克服—)
主論文公表誌	Tissue Engineering: Part A 投稿中
論文審査委員	(主査) 教授 岡野 光夫 (副査) 教授 櫻井 裕之, 江崎 太一

論文内容の要旨

〔目的〕

細胞シート工学は細胞シートを積層化することで生体同様の細胞密度の高い 3 次元組織の構築を可能とする。しかし、3 次元組織内部の虚血により、再構築できる組織の厚みには限界がある。これまでに、特に *in vitro* においては作製可能な組織の厚さについての詳細な研究は行われていない。そこで本研究では細胞シートを一枚一枚積層することで組織の厚みを制御し、再構築可能な組織の厚みの限界を明らかにした。また、この限界を克服するための培養法を検討した。

〔対象および方法〕

ヒト子宮内臓由来間葉系細胞を温度応答性培養皿に播種し、4日間培養した後に温度降下処理のみで細胞シートとして回収した。回収した細胞シートを1~6層まで積層し、通常の培養皿に接着させた状態で7日間培養した。経時的に細胞生存率、糖代謝の測定、および組織学的解析を行った。また、積層化した細胞シートをセルカルチャーインサート上でも培養し、培養皿上での培養方法との比較を細胞生存率と組織学的解析により行った。

〔結果〕

グルコース消費量と乳酸産生量は3層までは積層化枚数にともない増加したが、4層以上ではその増加の割合は小さくなった。乳酸産生量/グルコース消費量の比 ($Y_{L/G}$) は1~6層の積層化細胞シートすべてにおいて高く、特に7日目では $Y_{L/G} \cong 2$ となる。培養上清中のLDH量の測定では、3層以下では培養日数によらず、ほぼ等しく低い値を示したが、4層以上では培養日数とともに増加した。細胞生存率は1層では $85 \pm 0.7\%$ であったが、4層以上で急激な低下が認められ、5層では $8.8 \pm 3.2\%$ であった。組織学的解析において、3層 ($38.1 \pm 2.3 \mu\text{m}$) までの厚みは増加するが、4層以上では細胞シート間の剝離と、Ki-67 (細胞増殖抗原) の発現が認められない細胞が多く観察された。一方、セルカルチャーインサート上で培養したところ、細胞生存率は5層 ($130.3 \pm 1.4 \mu\text{m}$) で $63 \pm 8.3\%$ に改善した。

〔考察〕

4層以上の積層化細胞シートでは、LDH活性の測定結果から培養日数とともに細胞への障害が顕著に認められる。このことは細胞生存率の測定結果とも一致している。また、組織学的解析からも4層以上の積層化細胞シートにおいて、培養皿に接着する側の細胞間および細胞シート間の接着が弱くなり、特に4層以上では細胞シート間の剝離が認められた。一方、組織の上下両側を培養液に触れさせることで細胞生存率が改善し、~130の組織を作製することができた。以上のことから、4層以上の厚みでは組織全体に酸素・栄養が供給されず、老廃物も蓄積されるために細胞が壊死するものと考えた。

〔結論〕

細胞の生存率、代謝、組織学的解析から総合的に評価すると、積層化細胞シートの厚みの限界は~40 μm (3層) である。しかし、組織の上下両側を培養液に接触させる培養法により、100 μm 以上の厚い組織を作製可能であることを確認でき、細胞シートによる組織構築の基盤を作った。

論文審査の要旨

本研究は、細胞シートを3次積層化し、その細胞シートの操作枚数により組織の厚さを変化させ、組織の厚さの限界について検討した。組織の厚さとその組織内の細胞の代謝、障害、生存率の関係が詳細に検討され、静置培養で作製可能な組織の厚さの限界を明らかにした。

酸素と栄養の組織内への拡散による供給が可能な組織の厚さに限界があると考え、多孔膜上で細胞を培養する方法で積層した細胞シート組織の上側からのみならず下側からも酸素と栄養を供給させる培養を行うことでより厚い組織が作製された。これまで不可能であった *in vitro* での生体内に近い高細胞密度組織の作製とその厚さを制御した組織解析を実現した。このことは、組織工学に新しい知見をもたらすと同時に組織工学的再生治療を具体化する重要な基礎・基盤を作った。

以上より、申請者は博士 (医学) の学位に適しいものと判定された。