

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21213

研究課題名(和文)再生骨軟骨組織開発における力学的刺激因子が持つ最良設計手法の考案

研究課題名(英文) Invention of suitable design method for regenerated osteochondral tissue under mechanical loading

研究代表者

小俣 誠二(Omata, Seiji)

名古屋大学・工学研究科・特任助教

研究者番号：60624814

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：欠損・損傷した関節軟骨を修復する為の再生軟骨組織を開発している。しかし、欠損部にゼリーのような柔らかい再生軟骨組織を移植しても定着しづらく、脱離しやすい問題があった。本研究では、再生軟骨組織の下に骨補填剤を積層する事で、骨軟骨組織移植片を構築する事を目標とした。再生骨軟骨組織モデルとして、軟骨組織にはアガロースゲルを用い、再生骨組織モデルにはハイドロキシアパタイトの誘導体であるリン酸カルシウムを希薄なアガロースゲルに分散させることで構築した。各組織モデルに対して軟骨細胞および間葉系幹細胞を懸濁させ、再生骨軟骨組織モデルを構築する事に成功した。基礎的実験が完了し、今後は設計論と有効性を検証する。

研究成果の概要(英文)：I have been developing a regenerated cartilage tissue for repairing defective/damaged articular cartilage. However, even if soft regenerated cartilage tissue like jelly was transplanted to a defective part, such as osteoarthritis, it was hard to fix and there was a problem that it was easy to detach. In this study, I aimed to construct an osteochondral tissue graft by laminating bone filling agent under a regenerated cartilage tissue. As a regenerated osteochondral tissue model, agarose gel was used for cartilage tissue, and calcium phosphate, a derivative of hydroxyapatite, was dispersed in a diluted agarose gel in a regenerated bone tissue model. We succeeded in constructing a regenerated osteochondral tissue model by suspending chondrocytes and mesenchymal stem cells for each tissue model. Basic experiments have completed, and from now on we will verify design method and effectiveness.

研究分野：生体医工学

キーワード：再生組織工学 骨軟骨組織 最良設計 アガロースゲル 力学的刺激 メカノバイオロジー 細胞外基質

1. 研究開始当初の背景

我々人類は、可動関節が健全な場合は、日々の健康な歩行や様々な運動が可能になっている。しかし、関節リウマチや変形性関節症などにより、関節軟骨が損傷する。そして、歩行が困難になった症例では、人工関節に置換することにより、歩行機能を回復させることが出来る。ところが、軽度な関節疾患治療においては、荷重負担の少ない関節の一部をくり抜き(新たな損傷と余分な侵襲性が発生)、骨軟骨移植を行うモザイクプラスチック法が多く適用されている。しかし、4 cm²を超える広範囲の軟骨組織欠損に対しては、十分な治療法が確立されておらず、無疼痛にもかかわらず人工関節置換術が行われている。

このため、現在再生軟骨組織を用いた置換術が臨床上一定の評価を受けているが、骨組織との接合に十分な手法が無い。そして、広範囲の組織疾患に対しては、再生組織置換が難しいのが現状である。再生骨軟骨組織を移植することの利点は、関節他部位の組織に損傷を全く与えることが無く、その組織を採取しない為に侵襲性が無くなる(1-3)。そして、多くの正常な軟骨組織を温存することになるので、人工関節の適用を出来る限り遅延させることが可能になり、再置換や再々置換による患者への過度の負担を軽減することが可能になる。

このため、特定の培養方法や力学的刺激などのさまざまな設計入力因子についての議論は、十分に行われていないのが現状である。

2. 研究の目的

申請者は、現在までに、再生軟骨組織モデルへの力学的刺激が、組織発達の上で重要であることを示してきた(4)。また、関節軟骨組織はバイオトライボロジー材料として、常に摩擦刺激に曝されている。このため、せん断変形やせん断力が、軟骨組織様の組織発達に必要な設計因子であると考えている。また、他の研究報告においても同様の見解が示されている(5,6)。

以上より、軟骨組織表面から下骨組織まで包括的に構築する新しい設計手法を

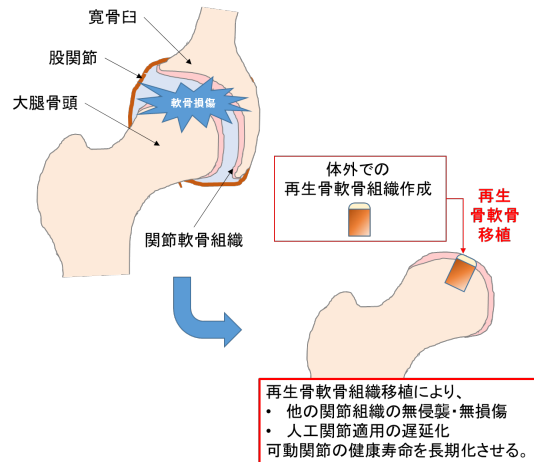


図1 再生骨軟骨組織移植の概要図

考案することが、今後の再生組織工学において重要な設計基準となると考えられる。このため、骨軟骨組織を体外で再生する為の基本的・普遍的な設計手法の考案を試みる。

また、今後において再生骨軟骨組織モデルの表面にせん断ひずみ刺激を与え、組織モデルの下半分(深層部)の変形を制限することにより、軟骨組織表面から下骨組織まで包括的に誘導することを、In Vitro 実験にて検証する。

3. 研究の方法

再生骨組織モデルは、加熱溶解したアガロース溶液中にリン酸カルシウム誘導体のグリセロリン酸カルシウムと、リン酸カルシウムに変換する為のアルカリフォスファターゼを分散混合させ成形した。再生軟骨組織モデルは、牛関節から単離した軟骨細胞をアガロース水溶液に分散させ、再生骨組織モデルに積層させた。冷蔵庫にてアガロースをゲル化させることにより、再生骨軟骨組織モデルを得た。

上記の組織モデルを培養液中に浸漬し、静置培養を行った。使用した培養液は、ダルベッコ変性培地(DMEM)に10%牛胎児血清を混合した基礎培地を用いた。

1および2週間の培養後、組織モデル中の細胞の生存確認を行った。培養後の組織モデルの中央付近をナイフで厚さ約1mmに薄切し、カルセインAMおよびエチジウムホモダイマで蛍光染色を行った。

4. 研究成果

1 および 2 週間の培養後の再生骨軟骨組織モデル中の細胞生存確認を行った所、内部の細胞の生存率がじゃっかん低下していたが、おおむね良好に培養が行えている事を確認した。このため、本研究で作成した再生軟骨組織モデルで使用した足場においては培養可能である事が判明した。

今後は、増殖因子の一つである TGF- β を混入させ、化学的刺激を加えたり、膝関節の可動を想定した圧縮・せん断負荷を印加したりして、培養環境に対する設計手法の考案を行う。

< 引用文献 >

- (1) J. Lam *et al.*, *Osteoarthritis and Cartilage*, 22(9):1291-1300, 2014
- (2) L. S. Moreira Teixeira *et al.*, *International Orthopaedics*, 38(9):1861-1876, 2014.
- (3) S. Omata, In *Tissue Culture*. 133-150. InTech. 2012.
- (4) A. Marmotti *et al.*, *International Orthopaedics*, 38(9):1787-1801, 2014.
- (5) G. E. Nugent *et al.*, *Arthritis & Rheumatism*, 54(6):1888-1896, 2006.
- (6) L. Bian *et al.*, *Tissue Engineering (A)*, 16(5):1781-1790, 2010.

5 . 主な発表論文等

(研究代表者 , 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 6 件)

S. Omata, Y. Sawae, T. Murakami. Relationship of wear particles of poly(vinyl alcohol) hydrogel and immune response of macrophage. International Symposium on Artificial Hydrogel Cartilage, Joint Replacement and Related Topics, January 2016, Fukuoka, Japan.

S. Omata, Y. Sawae, T. Murakami. Relationship of wear amount of poly(vinyl alcohol) (PVA) hydrogel and elution of PVA molecules in lubricant.

International Conference on Bioelectronics, Biosensors, BioMedical Devices, BioMEMS/NEMS and Applications 2015 (Bio4Apps 2015), December 2015, Fukuoka, Japan.

S. Omata, Y. Sawae, T. Murakami. Effect of eluted poly(vinyl alcohol) (PVA) molecules in water lubricant on total wear amount of PVA hydrogel, The 8th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (AP Biomech 2015), September, 2015, Sapporo, Hokkaido, Japan.

S. Omata, Y. Sawae, T. Murakami. Relationship of wear particles of poly(vinyl alcohol) hydrogel and immune response of macrophage, Summer Biomechanics, Bioengineering and Biotransport Conference 2015, June, 2015, Utah, USA.

小俣誠二, 佐々木沙織, 中嶋和弘, 牛尾哲郎, 後藤徳雄, 村上剛史, 桑島海人, 岡崎賢, 鎗光清道, 松田秀一, 岩本幸英, 村上輝夫. ハイドロゲル人工軟骨/人工骨複合体の可動関節内での安定性評価. 2016 年日本生体医工学会九州支部学術講演会. March 2016. 佐賀県佐賀市.

小俣誠二, 澤江義則, 村上輝夫. 水潤滑液中に溶出したポリビニルアルコール (PVA) 分子が PVA 水和ゲルの摩耗に与える影響. 第 42 回日本臨床バイオメカニクス学会, November 2015. 東京都千代田区.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

特になし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

小俣 誠二 (OMATA, Seiji)

所属機関: 名古屋大学

所属部門：工学研究科

職名：特任助教

研究者番号：60624814