

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11371

研究課題名(和文) カニクイザル耳介軟骨前駆細胞の特性解析と自家細胞移植による有効性評価

研究課題名(英文) Characterization of monkey ear cartilage progenitor cells and efficacy evaluation by autologous cell transplantation

研究代表者

矢吹 雄一郎 (Yabuki, Yuichiro)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：30610357

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：カニクイザル耳介軟骨膜中の軟骨前駆細胞を抽出した。抽出した細胞群は良好に増殖し、軟骨分化誘導と回転培養により、生体外で軟骨様組織を再構築した。それらを鼻部皮下や咽頭粘膜下へ自家移植した。移植後4か月の時点で外鼻形態の評価や組織回収を行った。回収した組織は軟骨組織として成熟したものではなかった。今後はプロトコルの最適化や移植した組織の長期形態保持性、軟骨組織へ成熟する経時的変化の検討を行いたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト耳介軟骨前駆細胞を用いた再生医療の前臨床研究としてカニクイザル耳介軟骨前駆細胞とそれを用いた自家細胞移植の実験系は有用であることが示唆された。とくに、解剖学的構造が近似しているため、ヒトに対して行う手術手技と同様の手技で実験を行うことが可能であり、それらを含めた総合的な前臨床研究はカニクイザルを始めとした霊長類が適していると考えられた。研究成果の一部は国内の専門学会で発表した。

研究成果の概要(英文)：Chondrocyte precursor cells in the monkey auricular perichondrium were extracted. The extracted cell group proliferated well, and cartilage-like tissue was reconstructed in vitro by inducing cartilage differentiation and rotating culture. They were autologously transplanted subcutaneously in the nose or under the pharyngeal mucosa. Four months after the transplantation, the external nasal morphology was evaluated and the tissues were collected. The collected tissue was not mature as cartilage tissue. In the future, we would like to investigate the optimization of the protocol, the long-term morphological retention of the transplanted tissue, and the change over time in the maturation of cartilage tissue.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 軟骨 軟骨前駆細胞 カニクイザル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

形成外科領域では変形や奇形に対して、患者自身の軟骨組織を移植する手術が広く行われている。しかし、移植手術には自家組織の採取が必要であり、それに伴う侵襲が問題となる。そこでわれわれは、幹/前駆細胞を利用した低侵襲な治療法に着目し、マウスとヒト耳介軟骨膜中に軟骨前駆細胞が存在することを同定した。また、その分離/培養法などの基本的な細胞操作法を世界に先駆けて確立した。現在、これらを用いた低侵襲な軟骨再生医療の開発を試みており、臨床研究の申請に向け準備段階にある。

ヒト自家細胞移植を想定した再生医療では、免疫反応や炎症反応など複合的な要素を考慮しなければならない。とくに、軟骨再生医療において再構築される軟骨組織の形態や大きさが非常に重要なアウトカムであり、生体内の炎症反応や免疫反応が大きく関与する。そのため、前臨床研究として免疫不全動物における評価単独では不十分であり、免疫動物における自家細胞移植による評価は重要と考えられている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒトに近い動物種であるカニクイザルを用いて、ヒト耳介軟骨前駆細胞の自家細胞移植に関する前臨床研究を行うことである。カニクイザル耳介軟骨膜より軟骨前駆細胞を抽出し、in vitro で軟骨様再構築組織を作成する。それを皮下や粘膜下へ自家移植し、in vivo での組織学的な変化を評価する。これらにより前臨床研究としての問題点を抽出するとともに、組織学的解析などを中心とした検討を行う。

3. 研究の方法

カニクイザル耳介軟骨前駆細胞の分離、抽出

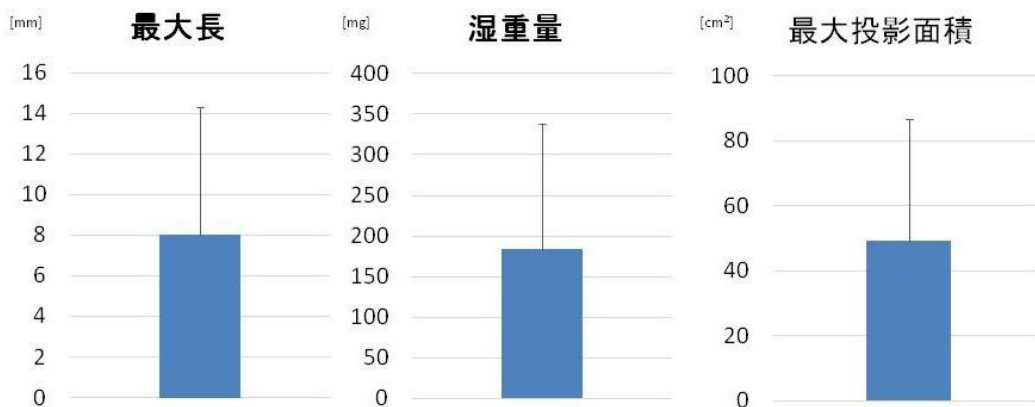
全身麻酔下にカニクイザル耳介を部分切除した。皮膚を剥離、切除した後にルーペ下にエレバトリウムを用いて軟骨膜を剥離した。軟骨組織が付着している軟骨膜は取り除き、純粋に軟骨膜組織だけとした。剪刀でミンスし、コラゲナーゼ処理を行った。限外希釈法で酵素を不活性化し、セルストレイナーで不純物を除去し、細胞懸濁液として細胞を回収した。10%胎ウシ血清/10ng/mL bFGF 含有培地に播種し、初代培養とした。これらの操作をカニクイザル6頭に対して行った。

生体外での軟骨様再構築組織の作成

4週間2 - 3日毎に培地交換し、コンフルエントになる前に継代を行い、軟骨膜由来細胞を増殖させた。増殖した軟骨膜由来細胞に対して、4週間の期間において分化誘導培地(アスコルビン酸、デキサメサゾン etc 含有)と積層化培養で軟骨分化誘導した。さらなる軟骨分化誘導と三次元的な基質産生を誘導することを目的として4週間の期間において rotating wall vessel (RWV)を用いて回転浮遊培養を行った。作成した軟骨様再構築組織は最大長[mm]、湿重量[mg]、最大投影面積[mm²]を計測した。

カニクイザル自家組織移植と組織学的解析

再構築された軟骨様組織を全身麻酔下においてカニクイザルの外鼻皮下、腹部皮下、咽頭粘膜下に自家組織移植した。移植後4カ月において再度全身麻酔を導入し、外鼻、腹部、咽頭それぞれ皮膚や粘膜ごと組織回収し、それらを組織学的に解析した。染色はヘマトキシリンエオジン染色(HE染色)、アルシアンブルー染色(AB染色)、エラスチカワンギーソン染色(EVG染色)を行った。



(図1) 再構築された軟骨様組織の最大長、湿重量、最大投影面積

増殖の不良であった個体から形成したものは2mm程度と小さく、軽かった。一方で、最大約20mm程度と比較的大きいものも形成された。

4. 研究成果

カニクイザル耳介軟骨前駆細胞の分離、抽出

カニクイザル耳介軟骨膜より軟骨膜由来細胞は良好に抽出できた。また、今まで我々が報告してきたようにマウスやヒト、ビーグル犬と同様にカニクイザル軟骨膜由来細胞は軟骨前駆細胞を含んでいると思われる特性を示し、それを確認することができた。(Kobayashi S, Yabuki Y, et al. PLoS ONE. 2011 ;6(10): e26393 / PNAS. 2011 ; 108(35): 14479-84/ Mizuno M, Yabuki Y, et al. Stem Cell. 2014 ;32(3): 816-21 / Kagimoto S, Yabuki Y, et al. Cell transplantation.). しかし、定性的な評価で増殖が不良な個体も認めた。

生体外での軟骨様再構築組織の作成

増殖した軟骨膜由来細胞より軟骨様再構築組織を作成した。最大長 $8.0 \pm 6.2(1.2-20.4)$ [mm]、湿重量 $184.1 \pm 154.3(2-444)$ [mg]、最大投影面積 $49.2 \pm 37.4(0.8-99.1)$ [mm²]であった。(図1)

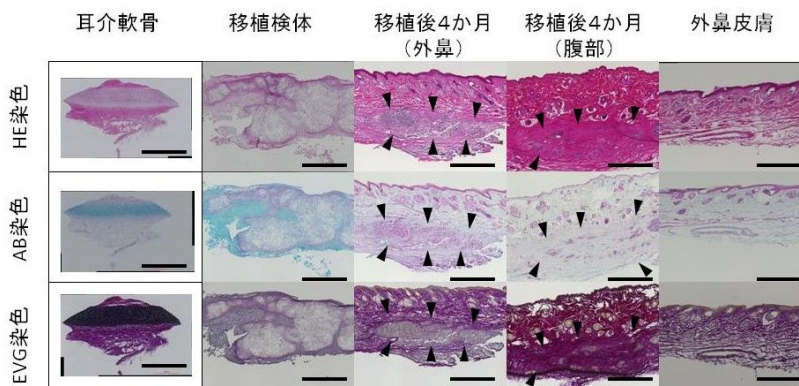
カニクイザル自家組織移植と組織学的解析

カニクイザルの外鼻や咽頭はヒトの組織とは異なり、薄く脆弱ではあったが、解剖学的構造は類似しており、外鼻形成術 (Open rhinoplasty) や咽頭弁形成といったヒトに対して行う形成外科的手術と操作で剥離を含め施行可能であった。軟骨様再構築組織の移植で外鼻であれば3mm程度隆鼻とすることが可能であった。しかし、移植後4か月は、外鼻1mm程度の变化にとどまった。咽頭後壁の組織は同定困難であった。腹部、外鼻の検体においては、皮下に線維性の軟骨様組織を認めたが、正常耳介軟骨と比較すると非常に幼弱で成熟していなかった(図3)。回収した組織の力学的特性や含有グリコサミノグリカン量の測定を試みたが、前者は適切な検体を採取できなく、後者においては検出可能範囲以下であった。



(図2) カニクイザル外鼻皮下への自家組織移植

ヒトに対して行う外鼻形成術 (Open rhinoplasty) と同様の手技で鼻柱基部を切開し、大鼻翼軟骨と外側鼻軟骨、鼻骨上を皮下剥離した。比較的疎な組織であり、容易に操作可能であった。移植後4か月においては鼻背の皮膚を含めて大鼻翼軟骨、外側鼻軟骨、鼻骨の直上まで切除し、多くを検体に含めるようにした。図に示した外鼻以外にも、腹部や咽頭後壁へも軟骨様再構築組織を移植した。



(図3) 組織学的解析 (Scale Bar: 1 mm)

移植検体は2.5mm程度の厚さがあったが、移植後4か月においては1mm未満になっている(黒矢頭)。ただし、浮腫状だった間質は充実性となっている。AB染色の青染性は低く、EVG染色の黒染性も低く、弾性軟骨として成熟はしていなかった。また、わずかに炎症性細胞の浸潤を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鍵本慎太郎, 三上太郎, 矢吹雄一郎, 廣富浩一, 森田健一, 小野貴弘, 桜井靖久, 植村寿公, 津村尚史, 武部貴則, 小林眞司, 谷口英樹, 前川二郎
2. 発表標題 耳介軟骨膜細胞を用いた軟骨再生
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鍵本慎太郎, 矢吹雄一郎, 三上太郎, 小林眞司, 谷口英樹, Iain S Whitaker, 前川二郎
2. 発表標題 小耳症治療を目指した軟骨再生医療研究
3. 学会等名 第28回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	武部 貴則 (Takebe Takanori) (20612625)	横浜市立大学・先端医科学研究センター・教授 (22701)	
研究分担者	前川 二郎 (Maegawa Jiro) (70244449)	横浜市立大学・医学研究科・教授 (22701)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	三上 太郎 (Mikami Taro) (90315804)	横浜市立大学・医学研究科・客員准教授 (22701)	
研究分担者	小林 眞司 (Kobayashi Shinji) (90464536)	地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター（臨床研究所）・臨床研究所・部長 (82729)	