

令和元年5月29日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11389

研究課題名(和文) 小耳症軟骨細胞を用いて誘導した再生軟骨とその長期移植成績

研究課題名(英文) Long term results of tissue-engineered cartilage regenerated by nanoPGA scaffolds seeded with human prominent and microtia chondrocytes

研究代表者

磯貝 典孝 (ISOGAI, Noritaka)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：90203067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの耳介形状軟骨の再生誘導に関する研究において、ヒト由来の軟骨細胞を用いた報告は数少なく、ヒト耳介軟骨細胞から耳介特有の質感を反映する軟骨再生が可能かどうか、さらに小耳症軟骨を細胞供給源として利用することは可能かどうかに関しては、未解決な問題として残されている。そこで、本研究では、ヒト耳介軟骨の性状に近いヒト耳軟骨および小耳症軟骨の2種類のヒト耳介由来軟骨組織から単離した軟骨細胞を用いて再生誘導を試みた。その結果、小耳症軟骨細胞を細胞供給源とする再生軟骨の成熟過程は、正常軟骨と同様な過程を経て進行することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果より、ヒトたち耳軟骨および小耳症軟骨細胞から誘導した再生軟骨組織において、軟骨関連遺伝子である型コラーゲン、Elastin、およびSox 5のmRNAは移植後の長期間にわたって増加しており、良好な再生組織の誘導と維持が示唆された。

この結果より、ナノファイバーナノファイバーPGAを細胞キャリア(足場材料)として選択する場合、小耳症軟骨細胞を細胞供給源とする軟骨の再生誘導は可能であることが結論づけられた。今後、播種細胞への栄養拡散や長期形状維持など生分解性高分子に残された課題を解決することにより、組織工学的手法は小耳症の新たな治療法として確立され臨床応用されることが予想される。

研究成果の概要(英文)：In previous studies on the regeneration of auricle-shaped cartilage by tissue engineering, it remained unresolved whether it is possible to regenerate cartilage reflecting the characteristic texture of the auricle using human auricular chondrocytes and microtia cartilage as a cell source. In this study, we attempted regeneration by combining chondrocytes isolated from the human protruding ear cartilage with almost normal auricular cartilage properties and human microtia cartilage with nanofiber PGA, and compared the long-term results of the regenerated cartilage. Cartilage could be regenerated from human auricular chondrocytes in both groups, and a favorable shape and expression of cartilage-related genes were maintained for a prolonged period after transplantation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：小耳症 軟骨再生

## 1. 研究開始当初の背景

これまでわれわれは、体内より採取が可能な軟骨（関節軟骨、肋軟骨、鼻中隔軟骨および耳介軟骨など）に注目し、動物（ウシ）由来の軟骨細胞をこれらの4部位から採取し、各軟骨細胞を *in vitro* にて培養して細胞増殖能および基質産性能を比較検討した。その結果、耳介軟骨細胞の基質には、（1）弾性繊維が大量に含まれる特徴を有していること、（2）正常耳介の軟骨基質に近似した mRNA 発現が認められたこと、を報告した。さらに、*in vivo* で再生誘導した耳介形状軟骨の3次元形状の再現性および mRNA 発現の長期結果について検討した。その結果、耳介軟骨細胞から再生誘導された軟骨組織では、長期的に3次元形状および細胞外基質が維持されていることを報告した。これらの報告から、耳介の軟骨再生における至適細胞供給源として、耳介軟骨細胞が有力な候補となりえることが示唆された。一方、これまでの耳介形状軟骨の再生誘導に関する研究において、ヒト由来の軟骨細胞を用いた報告は数少なく、ヒト耳介軟骨細胞から耳介特有の質感を反映する軟骨再生が可能かどうか、さらに小耳症軟骨を細胞供給源として利用することは可能かどうかに関しては、未解決な問題として残されている。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では、ヒト耳介軟骨の性状に近いヒト耳軟骨および小耳症軟骨の2種類のヒト耳介由来軟骨組織から単離した軟骨細胞を用いて再生誘導を試み、再生軟骨組織の性状に関する長期結果の比較検討を試みた。実験1では、培養したヒト耳軟骨細胞および小耳症軟骨細胞を生分解性高分子に播種した。長期移植成績の特徴を詳細に理解するため、無胸腺マウスの背部皮下に細胞・高分子の複合体を移植して軟骨再生を誘導し、再生軟骨の形状、組織像および mRNA 発現の変化について比較検討した。さらに実験2では、軟骨再生に重要な役割を果たすサイトカインとして OP-1 を選択し、細胞増殖因子 (OP-1) 徐放化システムが再生軟骨組織に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

実験1では、培養したヒト耳軟骨細胞および小耳症軟骨細胞を生分解性高分子に播種した。長期移植成績の特徴を詳細に理解するため、無胸腺マウスの背部皮下に細胞・高分子の複合体を移植して軟骨再生を誘導し、再生軟骨の形状、組織像および mRNA 発現の変化について比較検討した。さらに実験2では、軟骨再生に重要な役割を果たすサイトカインとして OP-1 を選択し、細胞増殖因子 (OP-1) 徐放化システムが再生軟骨組織に及ぼす影響について検討した。

### 実験1：ヒト耳および小耳症軟骨細胞を用いた軟骨再生と長期移植成績

**細胞・高分子複合体の作成：** ヒト耳軟骨および小耳症軟骨より単離した軟骨細胞を、シート状長さ1cm、幅1cm、厚さ80 $\mu$ mに加工した細径PGA不織布（線維径=1.1 $\mu$ m、面密度15mg/cm<sup>2</sup>、グンゼ株式会社、京都）に播種して2群の細胞・高分子の複合体を作製した。軟骨細胞の播種濃度は、100 $\times$ 10<sup>6</sup>個/mlに調節した。複合体は、播種細胞が高分子表面に細胞接着するために要する6時間の間、インキュベーター内（37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>）に静置した。その後、細胞

培養液（組成：F-12 培養液，10 %ウシ胎児血清（FBS；Sigma-Aldrich，St. Louis，MO，USA），アスコルビン酸 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，ペニシリン 100 unit / ml，ストレプトマイシン 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，アンホテリシン B 0.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を培養皿に静かに注ぎ，複合体をインキュベーター内（37  $^{\circ}\text{C}$ ，5 %  $\text{CO}_2$ ）で5日間培養した．培養液の交換は，週2回行った．

**複合体の移植：** 無胸腺マウスの背部皮下に複合体を移植して、軟骨再生を試みた．移植操作では，まず前麻酔としてトルブタミド（3 mg / kg），硫酸アトロピン（0.04 mg / kg）を皮下注射し，15分後にイソフルラン（Pittmann and Moores，Mundelein，IL，USA）にて導入および維持麻酔を行った．次に，無胸腺マウスの背部をポビドンヨード（The Purdue Frederick Company，Stamford，CT，USA）にて消毒し，約2 cmの皮下切開を加えた．皮下を剥離して形成した皮下ポケット内に複合体を挿入し，5-0ナイロン縫合糸（シグマ，Tokyo，Japan）を用いて閉創した．

**標本採取：** 複合体の移植後5週目（n = 3），10週目（n = 3），20週目（n = 3）および40週目（n = 3）に標本採取を行い，採取組織の肉眼所見および形状計測，組織学的検索，RT-PCRを検討した．

#### **実験2：細胞増殖因子（OP-1）徐放化システムが軟骨再生に及ぼす影響**

実験1と同様に、ヒトたち耳および小耳症軟骨より単離した軟骨細胞を細径PGA不織布に播種して、2群の細胞・高分子の複合体を作成した。それぞれの複合体に細胞増殖因子（OP-1）徐放化システムを導入した後、無胸腺マウスの背部皮下に移植してOP-1徐放化システムが再生軟骨組織に及ぼす影響について比較検討した。

## **4．研究成果**

**ヒトたち耳軟骨と小耳症軟骨における組織所見の比較：** ヒトたち耳軟骨と小耳症軟骨の組織学的所見を比較検討した．採取したヒトたち耳軟骨組織および小耳症軟骨の最表層は、ともに比較的厚い軟骨膜に覆われていた．軟骨膜は、本来、細長い線維芽細胞、type I collagen、elastin を含む外層、2～3層の中間層、および丸く大型の細胞が配列する内層の3層構造を示すが、組織学的判別は困難であった．たち耳軟骨の軟骨部は、均一で厚さは約500  $\mu\text{m}$ であった．大型で丸い軟骨細胞が、単独あるいは数個集って、基質の中の軟骨小腔に粗に存在していた．基質においては、サフラニンO染色にて強い陽性反応が観察され、豊富なプロテオグリカンが存在することが示唆された．一方、小耳症軟骨の軟骨部は、不均一であり、たち耳軟骨に比較して薄く、サフラニンO染色における染色性は減弱する傾向を示した．Verhoff 弾性線維染色を用いた検討では、たち耳軟骨および小耳症軟骨の両群において、軟骨膜に連続する弾性線維が密な網状構造を形成し、軟骨部の全体に広がっている像が観察された．弾性線維は、特に細胞周辺に密集しており、細胞間を走行する線維の配列は不規則であった．このことから、たち耳軟骨および小耳症軟骨の基質内線維成分には、大量の弾性線維が含まれ、この性状によって耳介軟骨に特徴的な弾力性が付与されることが示唆された．

**ヒトたち耳および小耳症軟骨細胞を用いた軟骨再生と長期移植成績：** ヒトたち耳および小耳

症軟骨細胞を高分子に播種して、2群の複合体を作製した。複合体を無胸腺マウスの背部皮下に移植し、*in vivo*における再生軟骨組織の経時変化を、肉眼所見、組織学的、分子生物学的に検討した。その結果、両群のすべての複合体から、白く光沢があり、本来の高分子形状が比較的維持された再生軟骨が観察された。さらに、再生軟骨組織のサイズ(長さ,幅,厚さ)の変化を検討した。その結果、移植後5週目の小耳症軟骨細胞より再生誘導された軟骨組織において、長さおよび幅は移植前の高分子形状(長さ1cm×幅1cm)に近似していた。一方、たち耳軟骨細胞に由来する再生軟骨組織では、長さおよび幅が減少していた。両群において、経時変化は認められなかった。両群の厚さは、移植後5週目には約600 $\mu$ mに増加したが、その後の経時変化は認められなかった。サフラニンO染色を用いた組織学的検索では、両群の複合体において、軟骨基質は経時的に強い陽性反応を示し、軟骨細胞から産生されるプロテオグリカンは、経時的に増加する傾向が示唆された。一方、Verhoff弾性線維染色を用いた検討では、軟骨の生成部位に一致して、細胞を取り巻くように存在する網目模様を呈した弾性線維が観察され、経時的に増加する傾向が観察された。RT-PCR法により、軟骨関連遺伝子である型コラーゲン、Elastin、およびSox5のmRNA発現の経時変化を調べ、再生軟骨組織の制御機構を検討した。その結果、両群において、再生軟骨組織におけるmRNA発現は、経時的に増加傾向を示した。一方、未熟な線維芽細胞において特徴的に認められる型コラーゲンのmRNA発現は、両群ともに経時的に抑制される傾向を認めた。**これらの結果より、再生軟骨組織における軟骨細胞および細胞外基質の成熟過程は、移植後の長期間に及んで進行していることが判明した。**

**細胞増殖因子(OP-1)徐放化システムが軟骨再生に及ぼす影響：** 実験1と同様に作製した複合体に、細胞増殖因子(OP-1)徐放化システムを導入して、OP-1徐放化システムが再生軟骨組織に及ぼす影響について検討した。その結果、肉眼所見および組織所見において、サフラニンO染色およびVerhoff弾性線維染色の染色性は経時的に増強し、実験1と同様の傾向が観察された。RT-PCR法により、軟骨関連遺伝子である型コラーゲン、Elastin、およびSox5のmRNA発現を調べた。その結果、発現量は経時的に増加したが、実験1において認められた発現量に比較して差異は認められなかった。**このことから、再生軟骨組織において細胞増殖性サイトカインであるOP-1を添加しても細胞外マトリックス形成が促進する所見は観察されなかった。**

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Plast Reconstr Surg. 2017 Apr;139(4):911e-921e. doi: 10.1097/PRS.00000000000003201. Long-Term Comparison between Human Normal Conchal and Microtia Chondrocytes Regenerated by Tissue Engineering on Nanofiber Polyglycolic Acid Scaffolds. Nakao H, Jacquet R D, Shasti M, Isogai N, Murthy AS, Landis WJ. 査読有

Cells Tissues Organs. 2017;204(5-6):251-260. doi: 10.1159/000479790. Epub 2017 Oct

4. A Novel Method to Induce Cartilage Regeneration with Cubic Microcartilage. Nishiwa ki H, Fujita M, Yamauchi M, Isogai N, Tabata Y, Kusuhara H. 査読有

[学会発表](計3件)

N.Isogai. Tissue engineering Technology of bFGF slow release system for various plastic surgical reconstructions. 5th TERMIS World Congress-2018 (Symposium) (Kyoto, Japan).2018.09.06

磯貝典孝 形成外科領域における再生医療の現状 第39回日本炎症・再生医学会 シンポジウム 2018.07.11

H. Nakao, N.Isogai Effect nano PGA to tissue engineer cartilage with human microtia chondrocytes 23th Congress of the European Association for Cranio Maxillo-Facial Surgery (London, UK) 2016.09.13

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件) 取得状況(計0件)

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 諸富 公昭

□-マ字氏名:(MOROTOMI, tadaaki)

所属研究機関名: 近畿大学

部局名: 医学部

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 10388580

研究分担者氏名: 楠原 廣久

□-マ字氏名:(KUSUHARA, hirohisa)

所属研究機関名: 近畿大学

部局名: 医学部

職名: 講師

研究者番号(8桁): 50388550

研究分担者氏名: 朝村 真一

□-マ字氏名:(ASAMURA, shinichi)

所属研究機関名: 和歌山県立医科大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 20340804