

令和元年5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11678

研究課題名(和文) 同種再生軟骨に対する細胞免疫機構の解明とスーパーアログラフトの有用性検証

研究課題名(英文) Elucidation of cellular immune mechanism for allogeneic tissue-engineered cartilage and the effectiveness of super allograft

研究代表者

浅輪 幸世 (ASAWA, YUKIYO)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：10769912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：まず、アログラフトに適した軟骨細胞の特性を検討するため、培養期間による異なる分化状態のビーグル耳介軟骨細胞とビーグル初代脾臓細胞の共培養を行ったところ、長期培養の軟骨細胞は、脾臓細胞の増殖を抑制した。したがって、移植細胞の分化状態によって免疫反応性に違いがあることが明らかとなった。

次に、アログラフトに適した基質を検討するため、in vitroで作製した再生軟骨による脱細胞化の最適化を実施し、アログラフトとしての有効性を検討した。再挿入したアログラフト再生軟骨は、自己再生軟骨とほぼ同等のGAGの蓄積の軟骨基質が形成され、軟骨細胞はアロ脱細胞化再生基質を足場として利用できることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔外科の主要な対象疾患である口唇口蓋裂の治療においては、すでに自家再生軟骨が導入されている。しかし、再生組織の汎用化を目指すためには、同種再生軟骨(アログラフト再生軟骨)の開発が不可欠である。申請者らは、アログラフト再生材料に対する免疫反応を詳細に解析し、細胞外基質の成熟や軟骨細胞分化の最適化を図り、免疫寛容性の高いスーパーアログラフトを作製した。本研究では作製した脱細胞化軟骨基質のアログラフト足場素材としての有効性を示すことが出来た。本研究によって得られた知見は、口腔外科・整形外科領域の軟骨・骨再生のみならず、移植医療に対して新技術、新概念が提示できると考える。

研究成果の概要(英文)：First, to investigate the characteristics of chondrocytes suitable for allograft, co-culture of beagle auricle chondrocytes and beagle primary spleen cells in different differentiation states depending on the culture period was performed. As a result, chondrocytes in long-term culture(3wks) suppressed proliferation of spleen cells. Therefore, it was clear that there is a difference in immunoreactivity depending on the differentiation state of the transplanted cells.

Next, to investigate the extracellular matrix suitable for allograft, optimization of decellularization by tissue-engineered cartilage prepared in vitro was performed, and the effectiveness as allograft was examined. It was revealed that the reinserted allograft regenerated cartilage forms the cartilage matrix with accumulation of GAG almost equal to that of the autograft, and that chondrocytes can use the allo-decellularized extracellular matrix as a scaffold.

研究分野：再生医療

キーワード：アログラフト 軟骨再生 脱細胞化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔外科領域の重要な対象疾患として、口唇口蓋裂が挙げられる。口唇口蓋裂は口唇、顎、口蓋、鼻などの複合形態異常である。これらの形態異常に対しては、口唇形成術、口蓋形成術、顎裂骨移植、長じては顎矯正手術や歯列矯正などで形態を修正する。しかし、鼻に関しては顔面の中心にあり、整容的には極めて重要である一方、適切な自家軟骨移植素材がないため、治療には極めて難渋するのが現状である。従来、口唇口蓋裂に伴う鼻変形（唇裂鼻変形）に対して自家腸骨移植が行われてきたが、侵襲が大きく、また本来柔軟であるはずの鼻が硬い鼻になってしまうため、改善の余地は多い。この課題を克服するために、申請者らは三次元形態と力学強度を併せ持った再生軟骨の開発を行ない、自己耳介軟骨細胞/アテロコラーゲン/ポリ L 乳酸足場素材による三次元形状が付与された再生軟骨を作製することに成功した。

一方、軟骨組織は無血管組織であり、従来より免疫寛容性の高い組織として知られている。軟骨細胞は、コラーゲンやプロテオグリカンを中心とするタンパク質を産生し、細胞周囲に複雑かつ緻密な細胞外基質を形成するが、これが免疫抑制作用を発揮するという仮説を提唱している研究グループがある (Arzi B, Acta Biomaterialia, 2015, Bolano L, Orthopedics, 1991)。実際に米国では関節用軟骨組織アログラフトがいくつか市販されている (Arthrex 社製 Allograft OATS, Zimmer 社製 Chondrofix® Osteochondral Allograft)。この原理を鼻軟骨の再生医療に応用すれば、細胞確保のための耳介軟骨採取などといった患者への侵襲を低減できる。さらに、近年、間葉系幹細胞 (MSC) などの間葉系の細胞もマクロファージや B 細胞に対して抑制作用を有し、Treg 発現を増加させ、免疫応答を抑制することができるという報告もなされている (Sbano P et al, Arch Dermatol Res 2008)。アログラフトへの応用に免疫抑制作用を有する間葉系幹細胞 (MSC) を組み合わせることで、軟骨組織アログラフトとして、より生体鼻軟骨組織に近い再生軟骨を得ることができると考えられる。しかしながら、軟骨組織に対する免疫寛容の機序は不明な点が多く、基質の構造に起因するものなのか、構成成分に起因しているのか、詳細な知見はなく、組織成熟度と免疫獲得の関連性など詳細なメカニズムは解明されていない。

そのため、本申請では、アログラフト再生軟骨組織の免疫寛容の機序を解明するとともに、その知見を活用し、免疫寛容性を高めた再生軟骨組織スーパーアログラフトの実現を最終目標とする。

2. 研究の目的

口腔外科の主要な対象疾患である口唇口蓋裂の治療においては、すでに自家再生軟骨が導入されている。しかし、再生組織の汎用化を目指すためには、同種再生軟骨 (アログラフト再生軟骨) の開発が不可欠である。申請者らは、アログラフト再生材料に対する免疫反応を詳細に解析し、細胞外基質の成熟や軟骨細胞分化の最適化を図り、免疫寛容性の高いスーパーアログラフト再生軟骨を作製する。本研究によって得られたスーパーアログラフト再生軟骨による知見は、口腔外科・整形外科領域の軟骨・骨再生のみならず、移植医療に対して新技術、新概念が提示できると考える。

3. 研究の方法

本研究では、生体軟骨基質の免疫寛容の機序を各 T 細胞の発現傾向、動的挙動を評価し、抗原提示細胞の樹状細胞やマクロファージとの相互作用を組織学的やプロテオーム解析を行うことにより、軟骨基質における免疫寛容の概要を明らかにする。さらに、軟骨組織を構成成分毎に分別し、各軟骨構成成分に対する免疫応答や免疫寛容の網羅的スクリーニングのデータをもとに、in vitro で軟骨基質、細胞成分の分化段階的な免疫応答性を詳細に評価する。以上の検討より、移植後の免疫寛容を誘導する制御機序を解明し、より免疫寛容性の高いスーパーアログラフトが可能な再生軟骨を作製する培養方法を確立する目的として、

以下の研究期間内 (平成 28 年-30 年、3 年間) に行なった。

- ・生体軟骨組織の同種異系 (アログラフト) 移植実験による免疫機構の解明
- ・各軟骨構成成分に対する免疫応答性
 - ・アログラフトに適した基質と細胞成分の *in vitro* 再構築と免疫寛容の誘導
 - ・スーパーアログラフトの作製方法の確立
 - ・スーパーアログラフト再生軟骨移植の検証

4. 研究成果

アログラフトに適した軟骨細胞の特性を検討するため、異なる培養期間 (短期、長期) でヒト耳介軟骨細胞を用いて単層培養を行い、免疫抑制下の免疫正常マウスの背部皮下に移植を行った。移植 2,4 週間後、長期培養を行った培養軟骨細胞のみ軟骨基質の形成が認められた。この結果より、培養条件によって異なる性質を有するヒト軟骨細胞は軟骨基質産生能が抑制され、

軟骨基質産生能に差異が生じることが示された。したがって、長期培養を行うことにより、培養細胞の特性が変化し、免疫抑制下でのゼノ移植において基質産生が可能であることが推測された。加えて、移植細胞の分化状態と免疫応答細胞の関連性を明らかにするため、培養期間による分化状態の異なるビーグル耳介軟骨細胞とビーグル犬から単離した初代脾臓細胞の共培養を行ったところ、長期培養を行った培養軟骨細胞との共培養では、脾臓細胞の増殖を抑制した。したがって、移植細胞の分化状態によって免疫反応性に違いがあることが示された。

次に、アログラフトに適した基質を検討するため、先年度に in vitro で作製した再生軟骨による脱細胞化までの培養条件や脱細胞化処理の最適を実施した。これら基礎検討をもとに、脱細胞化再生軟骨にアロの軟骨細胞を再挿入し、アログラフトとしての有効性を検討した。脱細胞化再生軟骨への細胞挿入の方法は、物理的な振盪や凍結乾燥後に浸潤させる方法や針での注入など、さまざまな条件を試行した結果、凍結乾燥後の浸潤と針での注入によって細胞が脱細胞化基質内に貯留し、培養することにより、基質内に生着、増殖することが確認された。再挿入したアログラフト再生軟骨をヌードマウスの背部皮下に移植し、4週間後に解析を行った結果、自己再生軟骨と同等の GAG の蓄積およびタイプ II コラーゲンの産生量の軟骨基質が形成され、軟骨細胞はアロ脱細胞化再生基質を足場として利用できることが明らかとなった。さらに、ゼノグラフトの可能性を検討するため、ヒト脱細胞化基質にヒト細胞もしくはマウス細胞を挿入すると、ヒト脱細胞化基質にはマウス細胞は遊走できず、生着できなかった。これらの結果より、基質と細胞間には密接な関連性があり、それは蛋白レベルでの種適合性が関与している可能性が推測された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 発表者(代表)名 渡邊 智彦
発表標題 再生軟骨細胞の脱細胞化基質の足場素材としての有用性の検討
学会等名 第 17 回再生医療学会総会
発表年 2018 年
2. 発表者(代表)名 浅輪 幸世
発表標題 軟骨細胞分化過程の免疫制御と軟骨形成の関連性
学会等名 第 16 回再生医療学会総会
発表年 2017 年
3. 発表者(代表)名 渡邊 智彦
発表標題 ヒト耳介軟骨細胞の培養から作製した脱細胞化組織の有用性の検討
学会等名 第 16 回再生医療学会総会
発表年 2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：西澤 悟
ローマ字氏名：Nishizawa Satoru
所属研究機関名：東京大学
部局名：医学部附属病院
職名：特任助教
研究者番号（8桁）：00646200

(1)研究分担者

研究分担者氏名：疋田 温彦
ローマ字氏名：Hikita Atsuhiko
所属研究機関名：東京大学
部局名：医学部附属病院
職名：特任准教授
研究者番号（8桁）：60443397

(1)研究分担者

研究分担者氏名：星 和人
ローマ字氏名：Hoshi Kazuto
所属研究機関名：東京大学
部局名：医学部附属病院
職名：教授
研究者番号（8桁）：30344451

(2)研究協力者

研究協力者氏名：渡邊 智彦
ローマ字氏名：Watanabe Tomohiko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。