

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10965

研究課題名(和文)高機能性コラーゲンによる軟骨欠損補填・再生デバイスの開発

研究課題名(英文)Functional collagen device for cartilage defect repair and regeneration

研究代表者

名井 陽(MYUI, Akira)

大阪大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：10263261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ウロコ由来型コラーゲンは、生体組織と同じ線維構造を再現できるという独自の特徴を持ち、従来のコラーゲン人工組織と比べ非常に強度に優れおり高い細胞分化促進効果、スポンジ状・シート状等、高い加工性も持ち合わせている。Cell free 軟骨欠損修復補填材料としても高安全性、高強度軟骨再生製品として軟骨欠損補填・再生デバイスとなる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟骨欠損のセルフリー修復材料はこれまでに開発されておらず、本材料は生体親和性が高く、有用な軟骨欠損補填デバイス/再生スキャフォールドとなる可能性が示唆された。この材料は魚類由来であり病原伝搬性の観点からも優れる可能性がある。軟骨疾患は高齢化社会における寝たきりの重大な原因の一つであり、その治療に貢献することは、公衆衛生の面でも、医療経済面でも高い意義が期待される。

研究成果の概要(英文)：Fish scale-derived type I collagen has the unique feature of being able to reproduce the same fibrous structure as biological tissue. It is extremely strong compared to conventional collagen-derived biomaterial and highly promotes cell differentiation. It also has workability to be prepared as sponge-like structure, sheet-like, etc. We examined the utility of this new biomaterial in the treatment of cartilage lesions. Our results suggest its usefulness as a highly safe and high-strength cell-free cartilage defect repair material and also as a scaffold for cartilage regeneration products.

研究分野：整形外科学

キーワード：ウロコ由来型コラーゲン 軟骨再生 高強度コラーゲン膜/コラーゲン多孔体複合デバイス

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ウロコ由来型コラーゲンは、生体組織と同じ線維構造を再現できるという独自の特徴を持ち、従来のコラーゲン人工組織と比べ非常に強度に優れているという特徴がある。また、高い細胞分化促進効果、スポンジ状・シート状等、高い加工性も持ち合わせている。そのため、本研究では、従来の素材にはないバリア機能兼縫合可能強度を併せ持つ線維膜と細胞担持構造と生体親和性を持つ多孔質の複合材料を作成し、軟骨補填材料の開発または軟骨再生技術の確立を目指して研究を行った。

### 2. 研究の目的

軟骨損傷を再生させることを目的とし、以下について検討を行った。

(1)in-vitro 実験系においてウロコ由来型コラーゲンスポンジ(以下、ウロコスポンジ)に対する軟骨細胞の細胞親和性、接着能、軟骨組織形成能、滑膜由来間葉系幹細胞の細胞接着能の検討を行う。

(2)in-vivo 実験系にて軟骨損傷モデルにウロコ由来型コラーゲンをを用いて作成した複合材料を移植し軟骨の再生能を評価する。

### 3. 研究の方法

(1)In-vitro 実験系において細胞接着評価、軟骨分化評価を行った。

#### 細胞接着評価

ウロコスポンジをウサギ滑膜 MSC 懸濁液中で数回圧迫させ scaffold 内への細胞播種を行った。24 時間 DMEM、10%FBS 中で培養したのち凍結切片を作成、DAPI 染色にて細胞接着評価を行った。

#### 軟骨分化評価

ミニブタ関節軟骨、ヒト滑膜より採取した細胞を培養増殖させ、ウロコスポンジに播種( $1 \times 10^6$ )し、軟骨分化培地(:DMEM-HG, 1mM sodium pyruvate, 1% ITS+premix, 40  $\mu$ g/mL L-proline, 0.2mM Asc-2P, 100nM DEX,BMP2 250ng/ml)で 2 週間培養の後、組織評価(H-E 染色、サフラニン O 染色)を行った。

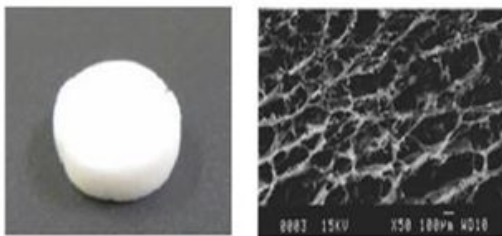
(2)In-vivo 実験においてウサギを用いて大腿骨滑車部に骨軟骨損傷モデルを作成した。

NewZealand White Rabbit(3000g 相当)の patella groove に 3mm、深さ 1mm の骨軟骨欠損作成を行った。

以下の群を設定し、骨軟骨欠損部と同サイズのウロコ由来型コラーゲンをを用いて作成した複合材料を移植した。

- Control 群 (欠損作成のみ)
- スポンジ移植群(欠損と同じ形状、サイズのウロコスポンジを移植)
- ハイブリッド群(高強度コラーゲン膜とウロコスポンジの複合デバイスを移植)

移植後 1 ヶ月、2 ヶ月で組織評価色 (HE 染色、サフラニン O 染色) を行った。



気孔径100-200 $\mu$ m

図 1. ウロコ由来型コラーゲンスポンジ



Newzealand White Rabbitの Patella grooveに骨軟骨損傷を作成

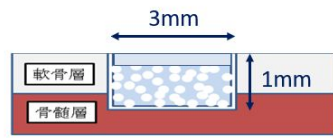


図 2. 大腿骨滑車部軟骨全層損傷モデル

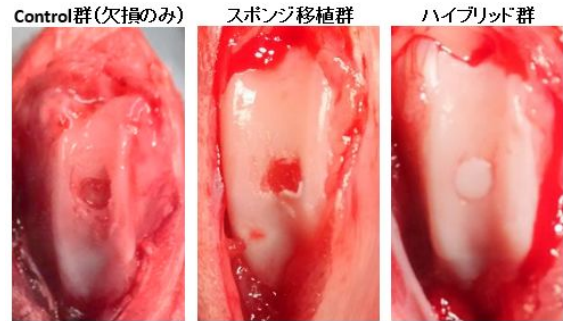


図 3. 軟骨欠損修復補填材料移植直後

#### 4. 研究成果

[1] ウロコスポンジに対する滑膜 MSC の接着評価では、細胞播種した翌日の組織評価でもスポンジの内部構造が保持、細胞が一様に播種されていることが確認された。軟骨細胞を用いた軟骨組織形成能の評価では良好な細胞接着性と軟骨組織の特徴であるサフラニンOに濃染する細胞外マトリックスの形成、成熟した硝子軟骨の特徴であるラクナ構造の形成を認めた。また、ヒト滑膜由来 MSC のウロコスポンジへの細胞接着性も確認された。

#### DAPI染色

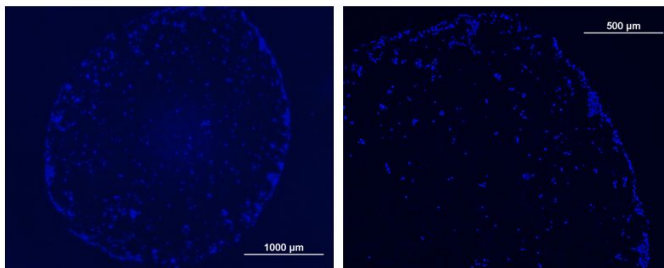


図 3. ウサギ滑膜 MSC による接着評価

#### Mini-pig chondrocyte P4 cells

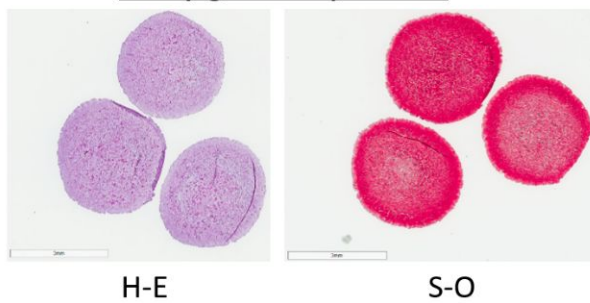


図 4. ミニブタ軟骨細胞を用いた軟骨分化評価

#### Human-Syn-MSC P3

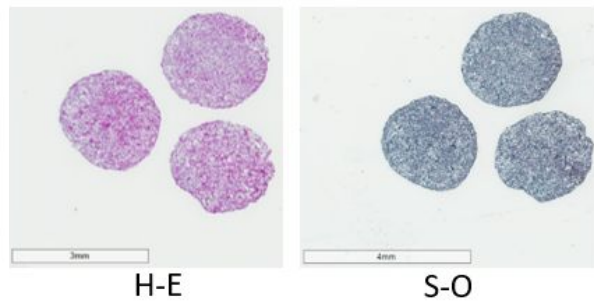


図 5. ヒト滑膜細胞を用いた軟骨分化評価

[2] 術後4週から8週にかけて、各群ともに損傷部周辺を中心とし軟骨様組織での修復を認めた。組織評価では1か月評価で軟骨層、軟骨下骨層のどちらにおいても移植組織と母床の良好な癒合を認め、2ヶ月ではスポンジ移植群で骨層の骨梁再生がみられ、軟骨層もサフラニンOで染色される再生組織を認めた。滑膜炎や移植部へのマクロファージの集簇等の有害事象は認めなかった。

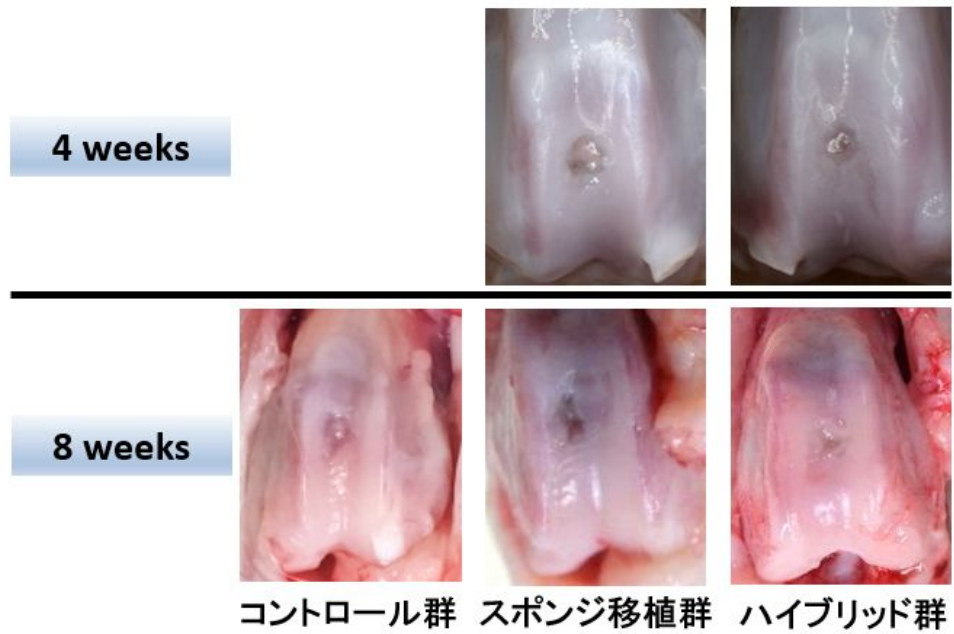


図 5. 軟骨欠損修復補填材料移植後経過

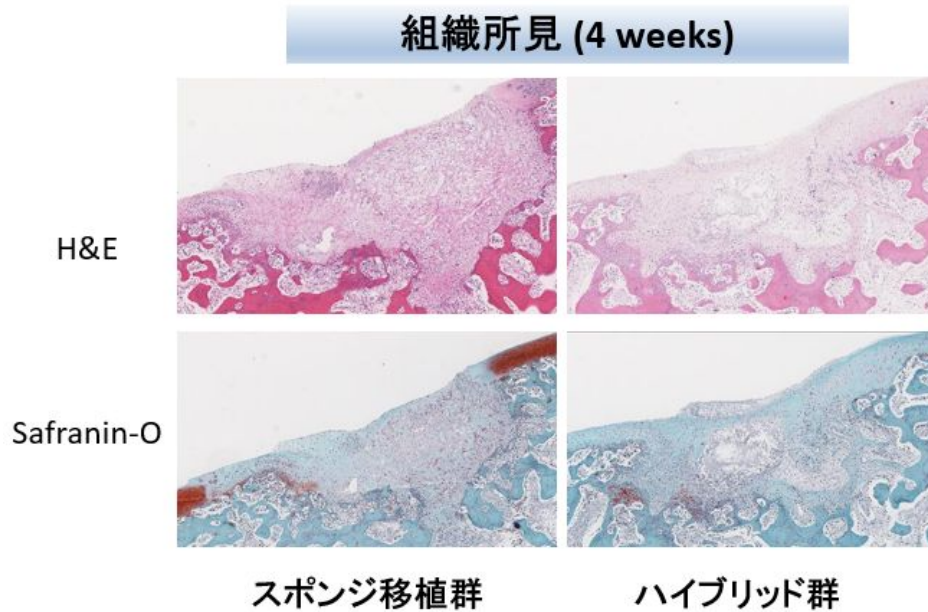


図 6. 組織所見 (術後 1 ヶ月)

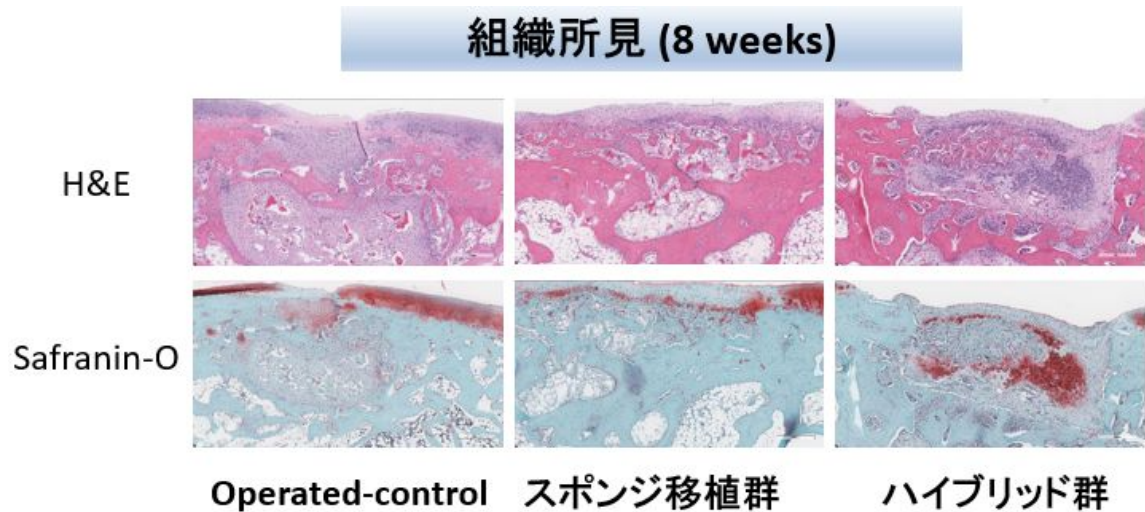


図 7. 組織所見 (術後 2 ヶ月)

## 考察

関節軟骨は無血管組織であり、軟骨下骨の液成分や関節液の受動的な浸透により栄養・代謝を受ける。そのため、外傷などにより軟骨が損傷を受けても血管や周囲の組織からの各種炎症性細胞、幹細胞の誘導が起りにくく、軟骨組織の自然な再生、リモデリングが生じにくい。軟骨損傷に対する治療法として、骨軟骨柱移植、軟骨下骨中の幹細胞を誘導するためのドリリング法等がある。従来法（骨髄刺激）は小サイズの軟骨損傷には有効であるが、大きい損傷に対しては十分な結果は得られていない。大型の軟骨欠損に対しては骨軟骨柱移植が行われるが、正常軟骨のドナーサイトを要する。そのため、再生医療として幹細胞移植が近年行われており、幹細胞を単独で関節内に投与方法、組織工学と組み合わせることにより、立体構造を持った再生医療製品を足場として細胞を担持させ移植する方法、さらに、成長因子、遺伝子導入を併用する方法等が研究されている。我が国で使用されている再生医療製品のうち、合成ポリマーは炎症が惹起される危険性があり、ブタ、ウシ由来コラーゲンでは病原伝播性、免疫原性が危惧される。これらを解決するために今回我々はウロコ由来 Ⅰ型コラーゲンからなる足場素材に着目した。ウロコ由来 Ⅰ型コラーゲンは、生体組織と同じ線維構造を再現できるという独自の特徴を持つため、従来のコラーゲン人工組織と比べ非常に強度に優れている。今回、我々の行った In-vitro 実験でウロコスポンジは細胞親和性、接着能をもつことが確認された。力学強度に優れ扱い易いことは今後臨床応用を想定した場合に汎用性が高く大きなメリットと考えられた。In-vivo では Cell free での移植にて移植組織と母床の良好な癒合を認め、スポンジ移植群で特に経過での骨層の骨梁再生と軟骨層の組織再生を認めた。このことからウロコ由来 Ⅰ型コラーゲンは Cell free 軟骨欠損修復補填材料であり、高安全性、高強度軟骨再生製品として軟骨欠損補填・再生デバイスとなる可能性が示唆された。

## 結語

ウロコ由来 Ⅰ型コラーゲンは Cell free 軟骨欠損修復補填材料であり、高安全性、高強度軟骨再生製品として軟骨欠損補填・再生デバイスとなる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hashimoto Yusuke, Nishida Yohei, Takahashi Shinji, Nakamura Hiroaki, Mera Hisashi, Kashiwa Kaori, Yoshiya Shinichi, Inagaki Yusuke, Uematsu Kota, Tanaka Yasuhito, Asada Shigeki, Akagi Masao, Fukuda Kanji, Hosokawa Yoshiya, Myoui Akira, Kamei Naosuke, Ishikawa Masakazu, Adachi Nobuo, Ochi Mitsuo, Wakitani Shigeyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Transplantation of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells under arthroscopic surgery with microfracture versus microfracture alone for articular cartilage lesions in the knee: A multicenter prospective randomized control clinical trial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 106 ~ 113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2019.06.002	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oka K, Tanaka H, Okada K, Sahara W, Myoui A, Yamada T, Yamamoto M, Kurimoto S, Hirata H, Murase T.	4. 巻 101
2. 論文標題 Three-Dimensional Corrective Osteotomy for Malunited Fractures of the Upper Extremity Using Patient-Matched Instruments: A Prospective, Multicenter, Open-Label, Single-Arm Trial.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Bone Joint Surg Am	6. 最初と最後の頁 710-721
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	岡本 美奈  (OKAMOTO Mina)  (50457008)	大阪大学・医学部附属病院・助教   (14401)	
研究分担者	吉川 秀樹  (YOSHIKAWA Hideki)  (60191558)	大阪大学・医学系研究科・理事・副学長   (14401)	

## 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
研究協力者	濱本 秀一  (HAMAMOTO Shuichi)		
研究協力者	太田 陽香  (OTA Haruka)		
研究協力者	折戸 良  (ORITO Ryo)		