

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17025

研究課題名(和文) ヒト軟骨前駆細胞由来膜状軟骨によるオーダーメイド軟骨再構築法の開発

研究課題名(英文) Tailor made cartilage regeneration method using human ear cartilage progenitor cells

研究代表者

鍵本 慎太郎 (Kagimoto, Shintaro)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：10737480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では耳介のような複雑な形状を持つ再生軟骨を任意に創出すべく、ヒト耳介軟骨前駆細胞由来の膜状軟骨を利用したオーダーメイド軟骨再構築法を開発、検討した。まずCTデータから耳介軟骨相当部分を描出し、3Dプリンターを用いて3次元実体モデル化した。この表面にヒト軟骨前駆細胞から作製した膜状軟骨組織を乗せ、耳介形態の作製を試みた。その結果CTデータからの実体モデル作製は最適化しえたが、膜状軟骨から形態を持つ軟骨再生に難渋した。そのためナノセルロースを用いた形態調整法も追加で検討した。この追加手法は形態調整に一定の成果を得たが、再生軟骨組織は非常に未熟であった。今後効率的な軟骨再生方法の検討を要する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟骨組織は顔などの形態変形治療の材料としてよく利用されています。ただし、治療で軟骨を用いるためにはあばらや耳、鼻などから軟骨を採取する必要があり、患者様の負担になってしまいます。また採取した軟骨組織の加工には職人のような技術が必要です。

今回私は再生医療技術と3Dプリンターを用いて、任意の形態の軟骨組織を自由自在に作製する「オーダーメイド軟骨再生法」を研究し一定の成果を得ました。まだ課題はありますが、治療が必要な患者様に早く研究成果が届けられるよう研究継続予定です。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research was to make regenerative cartilage with tailor-made shape and volume depending on the patients needs. Firstly, the CT data of human ear cartilage was used to create a 3D model. This model was then printed using a 3D printer. Secondly, membrane cartilage tissue derived from human ear progenitor cartilage cells was added to the 3D model to regenerate a human ear shape specific to the patient. As a result, I was successful in optimizing the 3D model but making an ear shape using membrane cartilage proved challenging. Because of this challenge I experimented using nanocellulose additionally. This method was superior at maintaining and controlling ear shape but the cartilage transferred to mice was found to have poor regeneration quality after 3 months. Going forward, we need more discussion about the efficacy of cell-handling procedures and cartilage regeneration.

研究分野：軟骨再生医療 形成外科

キーワード：軟骨再生医療 形成外科 耳介軟骨由来前駆細胞 3次元実体モデル 3Dプリンター

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

自家軟骨組織は顔面の形態変形治療に際し有用な再建材料であるため、形成外科分野において広く治療に利用されている。しかし現行の治療法では採取可能な軟骨組織量の制限や採取に伴う侵襲等、様々な課題がある。軟骨再生医療は現行治療法の課題を解決しうるため、その開発と臨床応用が期待されている。

我々はかねてより軟骨再生医療研究に取り組んでおり、過去にヒト耳介軟骨膜中の軟骨前駆細胞の同定、免疫不全動物を用いた軟骨組織再構築に成功した(*Kobayashi and Takebe, 2011*)。またカニクイザルを用いた免疫応答下での自家移植による軟骨再構築(*Kagimoto et al., 2016*)などを報告し、自家軟骨移植にかわる治療法となるよう、現行の臨床応用を目指し研究を継続している。しかし再構築軟骨組織の大きさや形態の調整方法は未だ確定しておらず解決課題となっていた。

2. 研究の目的

本研究の目的はヒト耳介のような複雑な形態を持つ軟骨組織を創出することである。そのため新規軟骨再生手法として膜状軟骨によるオーダーメイド軟骨再構築法に着目した。これは目的とする大きさや形態の3次元実体モデルを作製し、そこに *in vitro* で培養した膜状軟骨を重ね、任意形態の軟骨組織を創出する方法(*Liao et al., 2015*)である。

今回我々は前述したヒト耳介軟骨由来軟骨前駆細胞を細胞源として膜状軟骨、さらにはオーダーメイド軟骨再構築を試み、本手法の有効性について検討した。

3. 研究の方法

(1) 3Dプリンターを利用した3次元実体モデル作製

まず撮影した顔面部のCT画像から耳介部分のみをトリミングした。次に耳介部分から耳介軟骨部分のみを描出する(皮膚や筋肉・脂肪組織などを取り除く)ため、CT値の閾値を4種類設定した(研究成果図3参照)。この耳介軟骨部分DICOMデータを、ソフトウェア(SYNAPSE VINCENT、FUJIFILM、日本)を用いてSTLデータ化した。さらにこのSTLデータを3Dプリンター(Makerbot Replicator+)を用いてプリントし、3次元実体モデルを作製した。尚、今後の移植実験を考慮し作製する3次元実体モデルは通常の50%サイズとした。

(2) *in vitro* での膜状軟骨の作製と組織解析

実験に用いる耳介軟骨前駆細胞は横浜市立大学形成外科において十分なインフォームドコンセントの後同意を得た小耳症患者から採取した。個人情報の保護に関する法律(平成15年5月、法律57号)に基づき、提供された試料、個人データの利用については必要かつ適切な措置を講じた。本学倫理委員会の承認済みであり、適宜更新され現在に至っている。(横浜市立大学医学部附属病院 承認番号 064, B090702029)

耳介軟骨前駆細胞は全身麻酔下に施行される耳介形成手術時に余剰となる残存耳介軟骨から軟骨膜を分離し入手した。膜状軟骨は軟骨前駆細胞を利用し、先行文献(*Liao et al., 2015*)(*Wu Wet al., 2007*)の方法で作製した。まず6well plateに播種した軟骨前駆細胞に拡大培養した軟骨前駆細胞 6.0×10^7 cellsを加え、1週間 *in vitro* で培養した。作製した膜状軟骨を組織学的に評価した。染色はヘマトキシリン・エオジン染色(HE染色)とアルシアンブルー染色(AB染色)を施行した。

(3) 免疫不全マウスにおける皮下移植実験と組織学的解析

研究の方法(2)で作製した膜状軟骨を研究の方法(1)で作製した実体モデル上に乗せ、耳介形態を作製した後、免疫不全マウス皮下への移植し3か月後に回収する。回収前後で組織のサイズを比較する。また回収組織を組織学的に評価する。

(研究成果で後述するが、(2)の工程で移植に適した膜状軟骨が得られなかったため、本移植実験は断念した。)

(4) ナノセルロースを用いた形態調整法の検討

研究の方法(3)の代替としてナノセルロースを用いた軟骨形態調整方法実験を追加した。ナノセルロースはバイオインクとして広く利用されており、細胞にとって足場の役割を果たす。本研究ではナノセルロースファイバーに2.5%アルギン酸ナトリウムを加えたバイオインクを塩化カルシウムによりクロスリンクさせることで形態を保持させた(*A Al-Sabah et al., 2019*)。以下のように3種類のサンプルを準備し、免疫不全マウスの肩部、背部へ皮下移植した(N=3)。(図1、図2)3か月後に回収し、回収組織を組織学的に評価した。

4. 研究成果

(1) 3Dプリンターを利用した3次元実体モデル作製

閾値の最小値を図の左から -100, -75, -50, max の4種類に分け、3次元実体モデル形態の変化を比較した(図3)。は通常耳介形態を表し、耳介軟骨のみならず皮膚や筋体などを含むため、耳介軟骨再生の形態目標としては不適である。また は3次元実体モデルの辺縁に

欠損が生じた(図3白矢頭)ため、を閾値として採用した。以降の実験では の設定で得られた3次元実体モデルを利用した。

(2) in vitroでの膜状軟骨の作製と組織解析 & (3)免疫不全マウスにおける皮下移植実験と組織学的解析

先行研究と本研究、またヒト耳介軟骨を比較した(図4)。本研究で作製した膜状軟骨は先行研究のような撮子で把持しうる強度を持つ膜状軟骨よりはるかに脆く、通常の培養過程で容易に崩壊した(図4:1段目中央)。また先行研究に倣い(1)で作製したモデルを用いて3次元形態を持つ膜状軟骨組織作製を試みるも、まったく3次元形態は維持されず、先行研究やヒト耳介軟骨とは明らかに性質が異なっていた(図4:2段目中央)。そのため(3)で予定していた移植実験は断念した。組織学的にも軟骨分化が未熟であった(図4:4/5段目中央)。

(4)ナノセルロースを用いた形態調整法の検討

本実験で作製した3種類のサンプルは(2)で作製した膜状軟骨と違い、移植に十分な強度硬さを認めたため、予定どおり移植実験を施行した。移植した免疫不全マウス3頭のうち、1頭は移植後29日で衰弱し死亡したためそこで組織回収したが、残り2頭は予定どおり移植後3か月で組織を回収した。経過とともに移植サンプルは縮小しているが、形態は維持されていた(図5)。また、術後創縫合部に離開が生じた。経過とともに縮小したが創の完全な治癒は得られなかった。

回収組織形態を移植前と比較したところ、それぞれ平均の最大長は -4.90 ± 5.87 、 -0.27 ± 12.1 、 $24.8 \pm 18.7\%$ 、平均の投影面積は 4.57 ± 9.57 、 18.9 ± 10.8 、 $39.8 \pm 23.7\%$ の減少を認められた(図6)。図6の結果より細胞を含むのほうが組織の縮小率の低下が示唆され、組織形態の維持に有効であることが示唆された。またの移植組織が縮小した理由としては、細胞数や移植部位、移植組織の大きさなどが関与していると思われる。

回収組織の組織学的評価(図7)では、は細胞が含まれないため、サンプルの崩壊がみられた。においても軟骨組織再生が弱く、一部に炎症細胞の浸潤もみられた。

本研究成果と今後の展望

オーダーメイド形態の軟骨を構築すべく施行した本研究の結果、任意形態の軟骨組織再生のモデルとなる3次元実体モデル作製に成功した。しかし先行論文を追従した膜状軟骨による任意形態の三次元軟骨組織再生は奏功せず本手法は断念した。そのため追加実験したナノセルロースを用いた形態調整法の検討では、再生軟骨の形態調整や形態維持に有用な方法であることが示唆された。

今後軟骨再生医療の臨床応用に向け、細胞のハンドリングや細胞播種方法、手術手技や移植期間などを検討し、より効率的な軟骨再生方法の開発が必要と考える。

<引用文献>

Shinji.K, Takanori T et al., Reconstruction of Human Elastic Cartilage by a CD44+ CD90+ Stem Cell in the Ear Perichondrium, PNAS, 108(35), 2011,14479-84

Shintaro.K.et al.,Autotransplantation of monkey ear perichondrium-derived progenitor cells for cartilage reconstruction, Cell Transplantation 25(5), 2016,951-62

Han Tsung Liao et al., Prefabricated, Ear-Shaped Cartilage Tissue Engineering by Scaffold-Free Porcine Chondrocyte Membrane, Plast. Reconstr. Surg. 135(2), 2015, 313e-321e.

Wu W et al. Tissue engineering of trachea-like cartilage grafts by using chondrocyte macroaggregate: Experimental study in rabbits, Artif Organs 31, 2007,826-834.

A Al-Sabah et al, Structural and mechanical characterization of crosslinked and sterilized nanocellulose-based hydrogels for cartilage tissue engineering, Carbohydrate Polymers, 212,2019,242-251

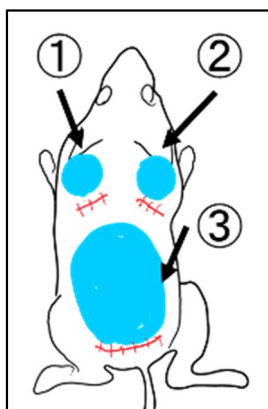


図1: サンプル詳細と移植部位

ペレット0.1ml:バイオインク + 軟骨前駆細胞 1.0×10^6 cells
ペレット0.1ml:バイオインクのみ
耳型3.0ml :バイオインク + 軟骨前駆細胞 2.0×10^6 cells

青部: 移植部位、赤線: 切開線

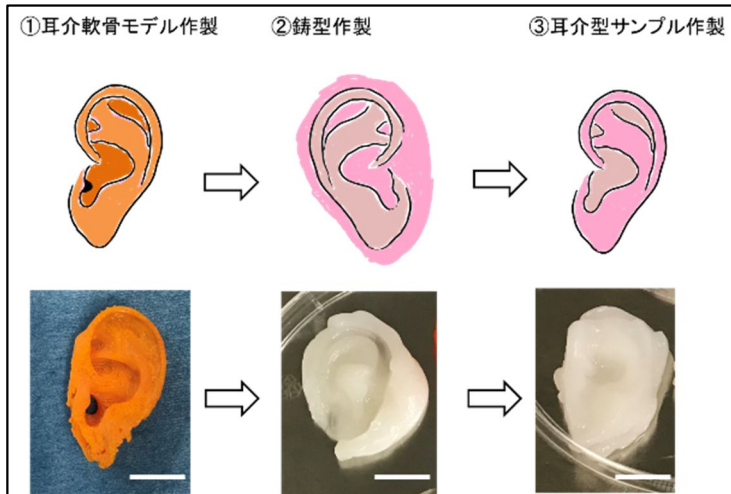


図2：耳介型サンプル（図1）作製方法

研究の方法(1)で作製した実体モデル（図2左）を型としたバイオインクの鋳型を作製（図2中央）し、この鋳型に細胞入りのバイオインクを流し込んで耳介型サンプルを作製した（図2右）。
Scale Bar: 10mm

	①	②	③	④
閾値範囲 (CT値)	-100~max	-75~max	-50~max	max~max
描出範囲 (STL data)				
3次元 実体モデル				

図3：閾値設定による3次元実体モデル形態の変化

(Scale Bar: 10mm、ヒト耳介 50%サイズ)

	先行論文 (写真、組織像は Liaoらの報告より 引用)	本研究	ヒト耳介軟骨
膜状軟骨			
3次元構築軟骨 移植前			
3次元構築軟骨 移植後 (2か月)			
Hematoxylin Eosin 染色組織像			
Alcian Blue 染色組織像			

図4：膜状軟骨の作製と組織像

左：先行論文より引用、中央：本研究結果、右：コントロール、ヒト耳介軟骨サンプル

Scale Bar: 白 10mm、黒 200 μm、
1: 移植後2か月組織、 2: 移植前組織、 3: ヒト耳介軟骨

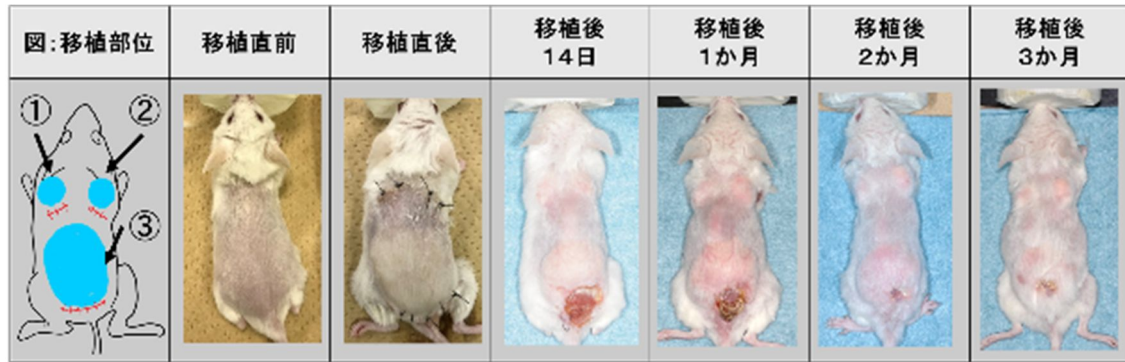


図5：移植実験経過

サンプルの移植部位と移植前・直後～移植後14日、1か月、2か月、3か月の経過

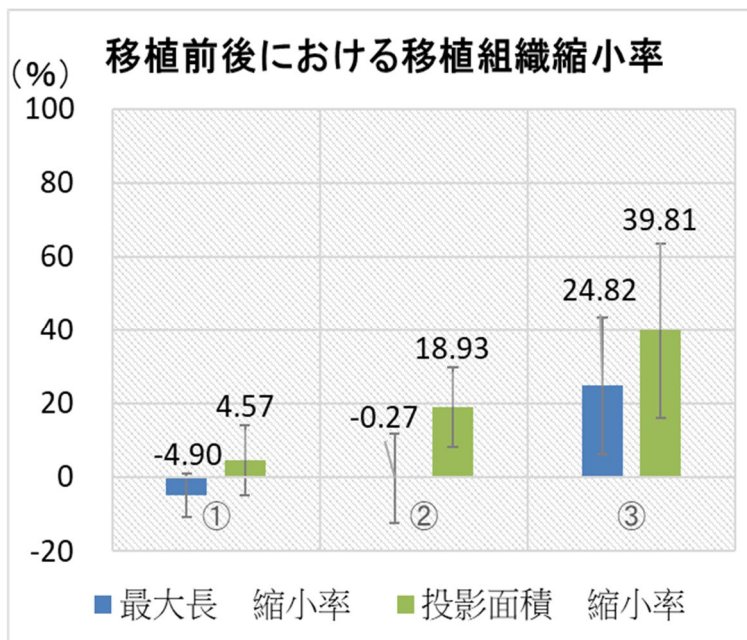


図6 移植前後における移植組織縮小率

の条件における移植サンプル組織の最大長(左:青)と投影面積(右:黄緑)の平均減少率
(N=3, Error Bar: ±SD)

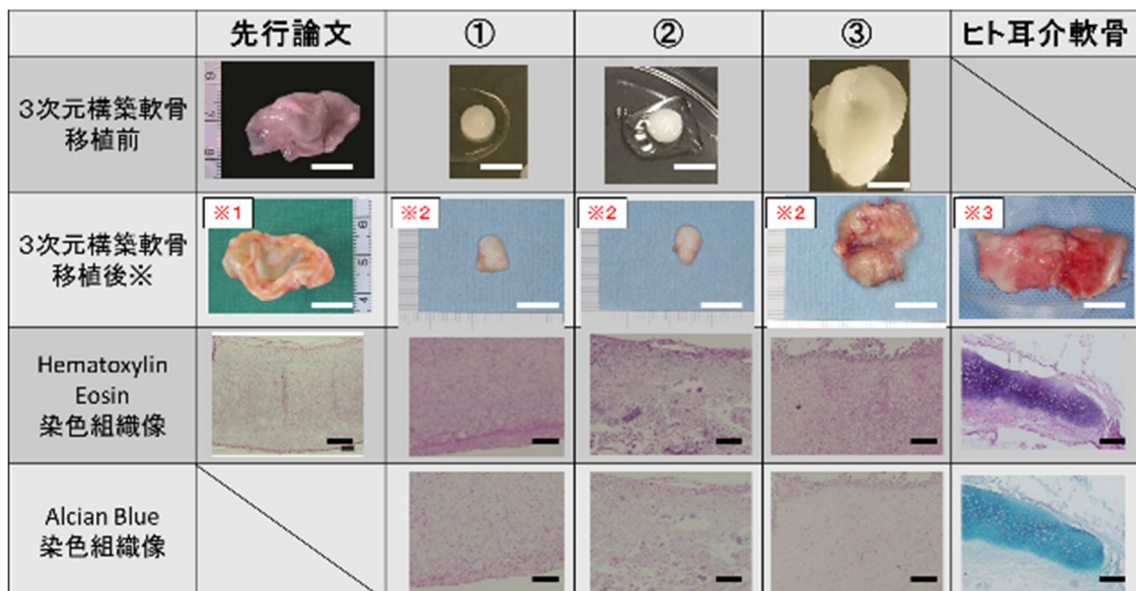


図7：移植前後のサンプル形態と移植後組織染色組織像

左：先行論文より引用、中央：本研究結果、右：コントロール、ヒト耳介軟骨サンプル
Scale Bar: 白 10mm、黒 200µm、 1: 移植後2か月組織、 2: 移植後3か月組織、 3: ヒト耳介軟骨

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 鍵本 慎太郎
2. 発表標題 耳介軟骨膜細胞を用いた軟骨再生（シンポジウム）
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
2. 発表標題 軟骨再生医療により形成外科治療はどうかかわるか（シンポジウム）
3. 学会等名 第61回日本形成外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shintaro Kagimoto
2. 発表標題 Autologous elastic cartilage regeneration for plastic surgery (Panel discussion)
3. 学会等名 The 14th Korea-Japan Congress of Plastic and Reconstructive Surgery (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shintaro Kagimoto
2. 発表標題 Pre-clinical study: Facial contouring therapy from autologous regenerative elastic cartilage using monkey auricular progenitor cells (oral presentation)
3. 学会等名 Ninth International Conference Regenerative Surgery (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鍵本 慎太郎
2. 発表標題 小耳症治療を目指した軟骨再生医療研究(パネルディスカッション)
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
研究協力者	前川 二郎 (Maegawa Jiro)		
研究協力者	三上 太郎 (Mikami Taro)		
研究協力者	矢吹 雄一郎 (Yabuki Yuichiro)		
研究協力者	小林 美保 (Kobayashi Miho)		
研究協力者	大河内 千鶴子 (Okochi Chiduko)		