

平成 21 年 6 月 4 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18591660

研究課題名 (和文) 濃度勾配コラーゲングルによる関節軟骨欠損修復に関する研究

研究課題名 (英文) Study on full-thickness articular cartilage defect using concentration-gradient collage scaffold

研究代表者

松末 吉隆 (MATSUSUE YOSHITAKA)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：30209548

研究成果の概要：関節軟骨の全層欠損を修復するため用いられるコラーゲンの足場について家兎を用いて実験を行った。濃度勾配を有するラーゲンの足場が、骨髄由来の未分化間葉系細胞の総員能力の違いについて差があるか否かを検討するため、濃度勾配の異なる2種類のコラーゲンを作成し家兎の膝関節内の軟骨欠損部位に埋入した。結果として33%の濃度勾配を有するコラーゲンが最も細胞動員が良好で、組織学的なスコアも他のものに比べて優位に良好であった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	700,000	0	700,000
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	780,000	4,080,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：細胞動員、関節軟骨、軟骨細胞、3次元培養、コラーゲン

## 1. 研究開始当初の背景

わが国における人口の高齢化は他の先進諸外国に例を見ない速度で進行しており、健全な長寿社会の確立はあまねく国民の希望するところである。先進医療による内臓疾患の克服によって平均寿命は延びているが、真に高齢者にとって望ましい健康が維持されているかについては疑問が残っている。「四肢運動器の健康獲得が他の内臓疾患の克服ほど進んでいないとの指摘は明らかな具体性を帯びている。

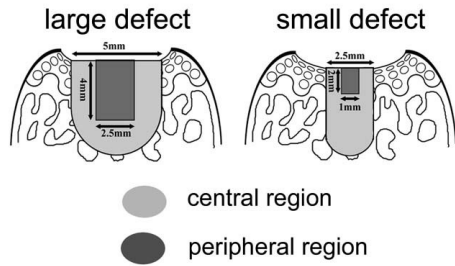
関節の軟骨は一旦、損傷されると修復されない

事実は古く中世から知られているが、現代医学でもこの域を脱していない。悪くなった関節は人工関節で置き換えることができるようになっただけで、傷んだ軟骨を治す方法は未だ明らかではない。近年、種々の細胞に分化できる未分化幹細胞の発見で、傷んだ臓器を再生する再生医療が脚光を浴びている。現在、盛んに未分化幹細胞から関節軟骨を再生する試みが行われているが、どの研究機関も未だ完全な関節軟骨の再生には成功していない。

これまでの多くの研究者は、培養未分化幹細胞

から軟骨類似器官を作成し、軟骨欠損部に移植するという手法を採ってきた。同様の手法による軟骨再生を模索する中で、我々はある一定の深さ以上、かつある一定の大きさ以下の軟骨欠損は完全修復することに注目した。すなわち、軟骨層のみの欠損では修復されませんが、欠損が骨髄にまで及ぶと修復機転が起こる。かつ、直径 3mm の欠損では軟骨は完全修復されるが、直径 5mm の欠損モデルでは不完全修復しか起こらない。

なぜこのような決定的な違いが起こるのか、



我々は、図に示すように修復不可能な大欠損と完全修復する小欠損のモデルを実験用家畜で作成し、未分化幹細胞の動態を詳細に調べた。軟骨を再生する未分化幹細胞は骨髄から動員されるが、興味深い事に修復不可能な大欠損でも十分量の未分化幹細胞が軟骨欠損周辺部に動員されていた。決定的な違いは欠損中央部にまで骨髄由来未分化幹細胞が動員されていないことにあった。欠損周辺部で滞った幹細胞は増殖能を失い、周辺部でのみ軟骨に分化していた。一方、完全修復される軟骨欠損では欠損周辺部にも中央部にも均一に未分化幹細胞が配置され、軟骨器質の再生の始まる 4 週目まで未分化幹細胞の増殖能が維持されていた。

これまで「関節の軟骨は一旦、損傷されると修復されない」と古くは中世から信じられてきた。近年では再生医学的アプローチで培養下に軟骨を再生させようとの試みが支配的発想となっている。我々はあえて培養再生軟骨を作成しなくても、未分化幹細胞を軟骨欠損部に均一に配置することができれば、軟骨も修復できるとの作業仮説の元に以下の研究を予定した。

## 2. 研究の目的

軟骨細胞に分化する未分化間葉系細胞も種々の接着因子を介して細胞外環境に反応している。軟骨の修復時に動員される骨髄由来未分化幹細胞もコラーゲンなどの細胞外器質タンパクに反応して動員されているはずである。

我々はプラスチックフィルタの一面にのみコラーゲンをコーティングし、骨髄由来未分化幹細胞をもう一方の面に配置したところ、未分

化幹細胞はコラーゲン・コーティング面に移動することを確認した。しかも細胞移動量はコラーゲンの濃度に依存していた。

この現象に注目し、中心部向かうほどコラーゲン濃度の高い濃度勾配コラーゲン円柱を軟骨欠損部に挿入することで、軟骨欠損の辺縁部で滞ってしまっている未分化幹細胞を欠損中央部にまで動員できないかと考えている。これまで軟骨欠損の修復を促進させる目的でコラーゲンを軟骨欠損部に挿入する試みはあった。コラーゲンの軟骨欠損部挿入は有為に修復を促進するがその機序については不明であった。我々の基礎実験では挿入されたコラーゲンが細胞動員の足場として機能するため、軟骨修復が促進されることが明らかになったが、依然として軟骨修復の程度は完全とはいえない。今回、濃度勾配コラーゲン円柱を軟骨欠損部に挿入することで、軟骨欠損の辺縁部で滞ってしまっている未分化幹細胞を欠損中央部にまで動員することで、これまで修復不能であった大きさの軟骨欠損の修復を試みる。

## 3. 研究の方法

### 1) 濃度勾配コラーゲンゲルの作成

コラーゲンは市販されている cellmatrix (0.3% type I collagen; Nitta gelatin Inc. Osaka, Japan) を用いた。直径 5mm、高さ 5mm の欠損を掘削したアルミを雛形に用い、3.3 倍濃縮 PBS を用いて、cellmatrix : PBS : 緩衝液 (cellmatrix に付属) をそれぞれ 6 : 3 : 1 の比率で混合させ、0.18% のコラーゲンゲルを約 82  $\mu$ L 作成する。次に、10 倍濃縮 PBS を用い比率 8 : 1 : 1 で 0.24% に濃度調節しゲル化させたもの (直径 2.4mm、高さ 4mm、約 18  $\mu$ L) をペニシリンカップで作成する。0.18% のコラーゲンゲルの中心部に 0.24% コラーゲンゲルを移植し、total 約 100  $\mu$ L (直径 5mm、高さ 5mm) の 33% 濃度勾配が存在する濃度勾配コラーゲンゲルを作成する (33% 濃度勾配群)。同様の方法で濃度を調整し 0.27% コラーゲンゲルを作成し、中心上方部に 0.27% コラーゲンゲルを移植し、濃度勾配が 50% 存在する 50% 濃度勾配群を作成。さらに対照群として 0.18% コラーゲンゲルのみを移植した non-composite 群も作成した。

### 2) 家兎への埋入実験

約 13 週齢の体重 2.5kg から 2.99kg の日本白色家兎を使用した。大腿骨膝蓋窩に直径 5mm、高さ 5mm の軟骨全層欠損をドリルを用いて作成し、関節軟骨全層欠損を作成した。

1 週、2 週、3 週、4 週、8 週、12 週に sacrifice し、これら 3 群を組織学的に比較検討した。4 週までは BrdU 陽性細胞数を欠損部の中心と辺縁とで比較し、4 週以降ではトルイジンブルー

で組織学的スコアを作成し、また type1、type2 collagen の免疫染色を行った。また In-vitro study として、濃度勾配差に対する骨髄間葉系幹細胞の遊走性を検証した。

### 3) BMP2による軟骨分化の促進効果の実験

日本白色家兎を使用して、大腿骨膝蓋窩に直径5mm、深さ5mmの全層欠損を作成し、33%濃度勾配コラーゲングル (CG gel) を作成し、全ての膝に移植した。BMP-2を mini osmotic pump を用いて1週間持続的に1.12 $\mu$ g/週を投与した。以下の4群で実験を行った。1. 生食のみの投与群 (control)、2. 術直後から一週間のみ BMP-2を投与し、残りは生食投与の群 (BMP0-1)、3. 術後1週間目から1週間のみ BMP-2を投与し、残りは生食投与の群 (BMP1-2)、4. 術後2週間目から1週間 BMP-2を投与し、残りは生食を投与する群 (BMP2-3)。術後1, 2, 3, 4, 8週で安楽死させ、1, 2, 3週モデルではBrdU陽性細胞を比較し、4, 8週モデルではコラーゲンの免疫組織とトリジンブルー染色によるスコアリングを行った。

### 4. 研究成果

1) 0.24%コラーゲングル (33%濃度勾配) 群では、他の群に比して欠損部の中心部で細胞が多く観察され、中心への細胞誘導効果が認められた。また4週以降の組織では0.24%勾配 (33%濃度勾配) 群で組織学的に優れた軟骨修復が得られた。骨髄間葉系幹細胞の遊走性には、コラーゲンの適切な濃度差が存在することが判明した。

この濃度勾配コラーゲングルによって、従来の単純なコラーゲングルより効率よく骨髄間葉系幹細胞を欠損部に誘導することができ、結果的にも良好な組織で修復されていた。しかし、それでも完全な硝子軟骨での修復が得られたとは言えず、臨床応用に向けて今後さらに成長因子などを組み合わせた方法が必要と考えられた。

2) BMP2の初期投与 (BMP0-1群) が最も効果があった。1週でのBrdU染色ではBMP-2投与群で欠損中心部に多くのBrdU陽性細胞を認めた。2週ではBMP0-1で辺縁部における陽性細胞が最も少なかった。8週の組織学的評価では、BMP0-1群が有意差をもって良好な結果を示していた。

BMP-2の初期投与は、投与後1週間で欠損部に誘導された骨髄間葉系幹細胞をさらに増殖させ、その後2週間から起こる欠損部での骨髄間葉系幹細胞の軟骨分化を増強させる効果がある事が示された。一定期間が経った後に投与しても良好な結果は得られず、BMP-2は、修復初期に投与しなければ vitro で言われているような作用は示さなかった。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

1. Mimura T, Imai S, Kubo M, Isoya E, Ando K, Okumura N, Matsusue Y. A novel exogenous concentration-gradient collagen scaffold augments full-thickness articular cartilage repair. Osteoarthritis Cartilage. 16: 1083-1091, 2008. 査読有
2. Takahashi S, Morikawa S, Saruhashi Y, Matsusue Y, Kawakami M. Percutaneous transthoracic fenestration of an intramedullary neurenteric cyst in the thoracic spine with intraoperative magnetic resonance image navigation and thoracoscopy. J Neurosurg Spine 9: 488-492, 2008. 査読有
3. Kubo M, Imai S, Fujimiya M, Isoya E, Ando K, Mimura T, Matsusue Y. Exogenous collagen-enhanced recruitment of mesenchymal stem cells during rabbit articular cartilage repair. Acta Orthop 78:845-855, 2007. 査読有
4. Maki J, Masuda C, Morikawa S, Morita M, Inubushi T, Matsusue Y, Taguchi H, Tooyama I. The MR tracking of transplanted ATDC5 cells using fluorinate poly-L-Lysine-CF3. Biomaterials 28:434-440, 2007. 査読有
5. Hasegawa S, Ishii S, Tamura J, Furukawa T, Neo M, Matsusue Y, Shikinami Y, Okuno M, Nakamura T. A 5-7 year in vivo study of high-strength hydroxyapatite/poly(L-lactide) composite rods for the internal fixation of bone fractures. Biomaterials 27:1327-1332, 2006. 査読有

[学会発表] (計12件)

1. Mimura T, Imai S, Nishizawa K, Okumura N, Ando K, Kubo M, Matsusue Y. Combination of collagen scaffold and timely release of bone morphogenetic protein-2 enhances the repair of full-thickness defect of articular cartilage. OARSI World Congress on Osteoarthritis 2008. 2008-09-19, Rome, Italy.
2. Okumura N, Toyota F, Isoya E, Imai S, Matsuura H, Matsusue Y. The role of the volume-sensitive Cl<sup>-</sup> current in the process of regulatory volume decrease

- (RVD) in freshly isolated articular chondrocytes. OARSI World Congress on Osteoarthritis 2008. 2008-09-19, Rome, Italy.
3. Uenaka K, Imai S, Andou K, Matsusue Y. The effect of low-intensity pulsed ultrasound for formaitn of scaffold-free cartilage. OARSI World Congress on Osteoarthritis 2008. 2008-09-19, Rome, Italy.
  4. Nishizawa K, Imai S, Mimura T, Kubo M, Matsusue Y. In-advance transmedullary stimulation of mesenchymal stem cells enhances spontaneous repair of full-thickness articular cartilage defect. OARSI World Congress on Osteoarthritis 2008. 2008-09-19, Rome, Italy.
  5. Ando K, Imai S, Shioji S, Mimura T, Okumura N, Uenaka K, Kasahara T, Nishizawa K, Kubo M, Matsusue Y. Mechanical stress-induced chronological phenotypic changes of chondrocytes in three-dimentional scaffold. OARSI World Congress on Osteoarthritis 2008. 2008-09-19, Rome, Italy.
  6. Kasahara T, Imai S, Matsusue Y, Fujimiya M, Kojima H. Diabetes impairs fracture healing by repressing the osteoclast function. OARSI World Congress on Osteoarthritis 2008. 2008-09-19, Rome, Italy.
  7. Shioji S, Imai S, Ando K, Mimura T, Okumura N, Matsusue Y. Mechanical stress modulates chondrocytes phenotype via IL-4. OARSI World Congress on Osteoarthritis 2008. 2008-09-19, Rome, Italy.
  8. Ando K, Imai S, Isoya E, Kubo M, Okumura N, Mimura T, Matsusue Y. Effect of dynamic compressive loading in combination with growth factor on the cartilage-specific gene expression of 3D scaffold-embedded chondrocytes. OARSI World Congress on Osteoarthritis 2007. 2007-12-07, Fort Lauderdale, Florida, USA
  9. Mimura T, Imai S, Kubo M, Isoya E, Okumura N, Ando K, Matsusue Y. A novel concentration-gradient collagen scaffold augments due. OARSI World Congress on Osteoarthritis 2007. 2007-12-07, Fort Lauderdale, Florida, USA
  10. Matsusue Y, Kubo M, Kikkawa M, Nakagawa Y. Repair of joint surface by autogenous osteochondral graft transplantation for steroid-induced osteonecrosis of the knee. International Cartilage Repair Society 6th Symposium. 2006-01-08, San Diego, CA, USA
  11. Isoya E, Matsuura H, Toyoda F, Imai S, Kubo M, Matsusue Y. Swelling-activated chloride current and its inhibition by arachidonic acid in rabbit articular chondrocytes. International Cartilage Repair Society 6th Symposium. 2006-01-08, San Diego, CA, USA
  12. Kubo M, Imai S, Isoya E, Ando K, Matsusue Y. Collagen scaffold augments large full-thickness articular cartilage repair by active mesenchymal cell recruitment. -detaild cellular events during cartilage repair-. International Cartilage Repair Society 6th Symposium. 2006-01-08, San Diego, CA, USA
- [図書] (計1件)
1. 今井晋二、松末吉隆. 関節軟骨：最新整形外科学大系1. 運動器の生物学と生体力学 (越智隆弘監修), 東京, 中山書店. 93-98, 2008
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
松末 吉隆 (MATSUSUE YOSHITAKA)  
滋賀医科大学・医学部・教授  
研究者番号：30209548
  - (2) 研究分担者  
今井 晋二 (IMAI SHINJI)  
滋賀医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：90283556