

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390394
 研究課題名 (和文) スキャフォールド[®]を用いない間葉系幹細胞由来三次元人工組織による骨軟骨再生
 研究課題名 (英文) Osteochondral regeneration using a scaffold-free tissue engineered construct (TEC) derived from mesenchymal stem cells
 研究代表者 中村 憲正
 (NAKAMURA NORIMASA)
 大阪大学・臨床医工学融合研究教育センター・招聘教授
 研究者番号：50273719

研究成果の概要 (和文)：本研究ではスキャフォールドフリー間葉系幹細胞由来三次元人工組織 (TEC) による骨軟骨再生研究を行った。膝関節大腿骨滑車部に骨軟骨欠損を作成し、欠損部に TEC 単体、およびハイドロキシアパタイトを沈着させた TEC、あるいは TEC と人工骨複合体を移植した。移植後 4、8、24 週の組織学的評価の結果 TEC+betaTCP 人工骨複合体が最も確実に骨軟骨再生を促進した。TEC は人工骨と安定した複合体形成を体内で持続することが可能であり、組織再生型バイオ人工関節としての発展が期待される。

研究成果の概要 (英文)：We investigated the effect of scaffold-free tissue engineered construct (TEC) on osteochondral regeneration. We implanted either of the basic TEC, hydroxyapatite-adsorbed TEC, or hybrid material of the TEC and artificial bone (beta-TCP). Histological analysis at 4, 8 and 24 weeks following implantation revealed that the hybrid material of the TEC and artificial bone most effectively promoted osteochondral regeneration of the lesion. The TEC can adhere to the surface of artificial bone rapidly and stably, and further maintain hybrid condition in situ to promote osteochondral regeneration and thus could be a promising material for biological joint resurfacing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2008 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2009 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

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：幹細胞、軟骨分化、骨分化、スキャフォールド、再生医療、メカニカルストレス、骨形成因子、ハイドロキシアパタイト

1. 研究開始当初の背景

関節内組織である関節軟骨は荷重衝撃の緩衝、関節滑動性の獲得に重要な役割を担っているが、血行に乏しく難治性の組織である。一旦損傷すると十分に修復されること無く、

損傷部の放置は軟骨下骨病変を合併し二次性の関節症変化へと進展することも多い。近年、軟骨組織を対象として再生医療的手法を用いた新規治療法が研究されている。これまで組織修復、再生をめざした細胞治療を行う

場合、細胞の集積の維持、細胞増殖、分化機能の安定化、さらには治療部位にかかる力学的ストレスからの保護などのために大多数の研究では生体基盤材料（スキヤフォールド）が使用されてきた。しかしスキヤフォールドの多くは生物（動物）材料、高分子化学材料等を含み、それらの材料の使用が生体に及ぼす影響は長期にわたっては予測しきれない問題があった。そこで我々は間葉系幹細胞を用いた細胞治療システムとして、スキヤフォールドを使用せずに培養幹細胞が産生する細胞外マトリックスを骨格とした3次元人工組織（Tissue Engineered Construct; TEC）を開発した。我々は、平成16年度基盤研究（B）助成（16-18年度）により3DBTの作成技術を確認し、また3DBTの生物学的、生体力学的特性、さらに、3DBTの軟骨修復・再生への有用性について検討を加えた(Ando et al. Biomaterials 2007, Tissue Engineering 2008)。

2. 研究の目的

本研究ではこれらの研究成果ならびに分担研究者である明石、松崎らのHAp複合化技術を背景に、TECを用いた再生型治療の適応をさらに拡大させ、最終的には変形性関節症治療を目的に、骨・軟骨複合体病変の修復・再生の可能性を検証した。

3. 研究の方法

(1) HaP結晶沈着TECの骨形成能の検討
共同研究者の松崎らは、カルシウムイオン溶液とリン酸イオン溶液にアガロースゲルを交互浸漬することで表面にハイドロキシアパタイト（HaP）結晶が沈着することを見出し、さらにHaP化したアガロースゲルが骨伝導能を有することを確認した。本研究ではHaPを表面にコートしたTECの骨分化能をアルカリフォスファターゼ活性の測定、アリザリンレッド染色、real time RT-PCR法により解析した。

(2) HaP結晶沈着TECの生体内での骨形成能の検討

膝関節切開し、大腿骨滑車部に直径4ミリ、深さ3ミリの円柱状骨軟骨欠損を作成した。そして欠損部に沈着量を変えたHap沈着TECを移植した。コントロール群としてTEC単体を移植した。移植後8週で修復組織における骨形成を組織学的に検討した。

(3) 骨軟骨移植モデルへのTECを含む複合素材の骨軟骨再生至適条件の検討
細胞採取用の動物より滑膜を採取し間葉系幹細胞を分離、培養する。4-7代継代した後にTECを作成した。移植実験としては、膝関節切開し、大腿骨滑車部に直径4

ミリ、深さ3ミリの円柱状骨軟骨欠損を作成した。そして骨欠損部に1. TEC単体、2. HaP添加TEC、あるいは3. betaTCP人工骨のいずれかを移植する。そして軟骨欠損部には1. TEC単体、2. 軟骨分化刺激を加えたTECを移植した。いずれも移植したTECには縫合などの内固定は行わない。術後は1週のギプスによる関節固定の後にケージ内で活動性制限を解除して飼育する。移植後6、12、24、48週後に修復組織の評価を行う。組織評価は形態学的に行った。

4. 研究成果

(1) HaP結晶沈着の骨形成能の検討
骨形成能とHap沈着量との相関をみると、TECには最大200mM、20回の浸漬までの範囲で、濃度、頻度依存性にHap沈着が増していくことを確認した。

Hap沈着させたTECを骨分化誘導培地で培養したところ、Hap沈着量に相関して、強いアルザリンレッド染色性およびアルカリフォスファターゼ活性の向上を認めた。またオステオカルシン遺伝子の発現も有意な相関を持って骨形成群で発現の更新を認めた。以上のことからHaP沈着TECは骨形成因子などの成長因子の使用や遺伝子導入などの生物学的改変の必要なく、TECの骨誘導活性をin vitroで亢進させることを確認した。本成果は、生物製剤を使用しない方法であるために臨床応用に適した骨誘導促進技術として期待されるものであり、さらなる技術改良と安全性の評価により近い将来の臨床応用が期待される技術と考えられる。

(2) HaP結晶沈着TECの生体内での骨形成能の検討

移植後8週における組織学的評価では、TEC単体では骨形成は一部に認められるのみで大部分は線維性組織であった。また軟骨下骨層の再生も認めることができなかった。これに対してHap沈着TEC移植群では有意な骨形成の亢進を認めた。ただし、Hap沈着量と骨形成の亢進との間には有意な相関を認めることはできなかった。本研究結果はHap沈着TECの骨再生エレメントとしての可能性を示唆するものである。しかし生体内での骨形成の至適条件を本研究では見出すことはできなかった。更なる条件設定を含め、骨形成促進への検討が必要と考えられた。

(3) 骨軟骨移植モデルへのTECを含む複合素材の骨軟骨再生至適条件の検討
組織学的評価によりTEC+betaTCP人工骨複合体が最も確実に骨軟骨再生させることが明らかとなった。TEC単体、あるいはHaP添加TECでは軟骨下骨の十分な構築を達

成することは困難であった。以上より骨軟骨組織の再生には軟骨用、軟骨下骨用に用途の異なる複合素材の組み合わせが効果的であることが判明した。本知見は今後の医療用具としての複合体開発に有用な指針を与えるものと期待される。また、BMPによる軟骨分化刺激を与えたTECは、異所性骨化などの有害事象を呈することはなかったものの、TEC単体と比較して、移植後明らかな軟骨再生促進効果を認めることができず、本研究での刺激条件ではBMPの有用性を示すことはできなかった。今後さらなる至適条件決定が必要と考えられた。以上の結果より骨軟骨再生に最も効果的な移植材としての複合体の構成を決定することができた。TECは人工骨と安定した複合体形成をin situで持続することが可能であり、本複合体は今後のバイオ人工関節として発展させるための構成要素としての使用が期待される。

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 9件)

- ① Katakai D, Imura M, Ando W, Tateishi K, Yoshikawa H, Nakamura N, Fujie H. Compressive properties of cartilage-like tissues repaired in vivo with scaffold-free, tissue engineered constructs. Clin Biomech (Bristol, Avon). 24(1):110-6, 2009. 査読有
- ② Nakamura N., Miyama, T., Engebretsen, L., Yoshikawa, H., Shino, K. Systematic Review. Cell-Based Therapy in Articular Cartilage Lesions of the Knee. Arthroscopy, 25:531-52, 2009. 査読有
- ③ Matsusaki M, Kadowaki K, Tateishi K, Higuchi C, Ando W, Hart DA, Tanaka Y, Take Y, Akashi M, Yoshikawa H, Nakamura N. Scaffold-Free Tissue-Engineered Construct-Hydroxyapatite Composites Generated by an Alternate Soaking Process: Potential for Repair of Bone Defects. Tissue Eng Part A. 15:55-63, 2009. 査読有
- ④ Tateishi K, Ando W, Higuchi C, Hart, DA, Hashimoto J, Nakata K, Yoshikawa H, Nakamura N. Comparison of human serum with fetal bovine serum for expansion and differentiation of human synovial MSC -Potential feasibility for clinical applications. Cell Transplant. 17:549-57, 2008 査読有
- ⑤ Kita K, Kimura T, Nakamura N, Yoshikawa H, Nakano T. PI3K/Akt signaling as a key regulatory pathway for chondrocyte terminal differentiation. Genes Cells. 13:839-50, 2008 査読有
- ⑥ Ando W, Tateishi K, Katakai D, Hart DA, Nakata K, Hashimoto J, Fujie H, Shino K, Yoshikawa H, Nakamura N. In Vitro Generation of a Scaffold-Free Tissue Engineered Construct (TEC) Derived from Human Synovial Mesenchymal Stem Cells: Biological and Mechanical Properties and Further Chondrogenic Potential. Tissue Eng Part A. 2008 14:2041-2049, 2008 査読有
- ⑦ Kanamoto T, Nakamura N, Nakata K, Yoshikawa H. Update on Tissue Engineering : Bone and Cartilage. Articular cartilage regeneration using stem cells. Clin Calcium. 18:1744-9, 2008. 査読有
- ⑧ Ando W, Tateishi K, Hart DA, Nakata K, Hashimoto J, Fujie H, Shino K, Yoshikawa H, Nakamura N. Cartilage repair using an in vitro generated scaffold-free tissue-engineered construct derived from porcine synovial mesenchymal stem cells. Biomaterials. 28:5462-70, 2007. 査読有
- ⑨ Tateishi K, Higuchi C, Ando W, Nakata K, Hashimoto J, Hart DA, Yoshikawa H, Nakamura N. The immunosuppressant FK506 promotes development of the chondrogenic phenotype in human synovial stromal cells via modulation of the Smad signaling pathway. Osteoarthritis Cartilage. 15:709-18, 2007. 査読有

[学会発表] (計 19件)

- ① Nakamura N, et al. Evidence-based cell-based therapy in chondral lesions A systematic review. 34th Singapore Orthopaedic Association, November 16-18, 2009, Singapore.
- ② Nakamura N, et al. Scaffold-free tissue engineered construct derived from synovial mesenchymal stem cells in cartilage repair. 3rd International Conference on Cell Therapy November 12, 2009, Seoul, Korea
- ③ 中村憲正 他 スキャフォールドフリー間葉系幹細胞由来三次元人工組織 (TEC) による軟骨修復 日本整形外科学会基礎学術集会 2009年11月5日 横浜
- ④ 中村憲正 他 スキャフォールドフリー間葉系幹細胞由来三次元人工組織 (TEC) による軟骨修復 -生体力学的解析-

- 日本臨床バイオメカニクス学会学術集会
2009年10月16日 松山
- ⑤ Nakamura N, et al. Evidence-based cell-based therapy in chondral lesions A systematic review. Korea-Japan Joint Symposium 2nd International Cartilage and Osteoarthritis Symposium October 10, 2009, Seoul, Korea
- ⑥ Nakamura N, et al. Translational stem cell research for cartilage and meniscal repair. Prague Arthroscopy Symposium on Cartilage Surgery, September 17-19, 2009, Prague, Czech
- ⑦ Nakamura N, et al. Evidence-based cell-based therapy in chondral lesions A systematic review. 1st I INTERNATIONAL CONGRESS OF SPORT TRAUMATOLOGY AND ARTHROSCOPY FOR CENTRAL -EASTERN EUROPE June 13-15, 2009, Warsaw, Poland
- ⑧ Nakamura N, et al. Translational research of cell-based therapy for chondral lesions in Japan. 8th World Congress of the International Cartilage Repair Society, May 23-26, 2009, Miami, USA
- ⑨ Ando W, Nakamura N, et al. Comparison of the mesenchymal progenitor cells derived from different porcine tissues for lineage-specific potential. 8th World Congress of the International Cartilage Repair Society, May 23-26, 2009, Miami, USA
- ⑩ 中村憲正 軟骨損傷に対する先端医療と未来 第19回日本臨床スポーツ医学会 2008年11月2日 幕張
- ⑪ 中村憲正 他 スキャフォールドフリー間葉系幹細胞由来三次元人工組織 (TEC) 移植による軟骨修復 シンポジウム 軟骨再生 温故知新 日本整形外科学会基礎学術集会 2008年10月23日 京都
- ⑫ Nakamura N, et al. Stem cell-based therapy for musculoskeletal tissues. Lecture. 9th Turkish Sports Traumatology, Arthroscopy and Knee Surgery Congress, October 14-18, , 2008, Istanbul
- ⑬ Nakamura N, et al. Evidence-based medicine in cell-based cartilage repair. Panell13: Knee and cartilage 9th Turkish Sports Traumatology, Arthroscopy and Knee Surgery Congress, October 14-18, 2008, Istanbul.
- ⑭ Nakamura N, et al. Stem cell-based therapy for musculoskeletal tissues. Lecture 9th Turkish Sports Traumatology, Arthroscopy and Knee Surgery Congress, October 14-18, 2008, Istanbul
- ⑮ Nakamura N, et al. Meniscal Repair using Scaffold-free Tissue Engineered Construct (TEC) derived from synovium. 8th World Biomaterials Congress, June 3, 2008, Amsterdam.
- ⑯ Nakamura N, et al. In Vitro Generation of a Scaffold-Free Tissue-Engineered Construct (TEC) Derived from Human Synovial Mesenchymal Stem Cells. 8th World Biomaterials Congress, June 3, 2008, Amsterdam.
- ⑰ Nakamura N, et al. Translational stem cell research for cartilage and meniscal repair. 13th ESSKA Congress 2000 , May 22, 2008, Porto, Portugal
- ⑱ Nakamura N, et al. Cartilage and Meniscus -Future- 5th World Congress of Sports Trauma and 6th Asia-Pacific Orthopaedic Society for Sports Medicine Meeting, April 11, 2008, Hong Kong
- ⑲ 中村憲正 他 スキャフォールドフリー間葉系幹細胞由来三次元人工組織 (TEC) 移植による軟骨修復 シンポジウム 三次元組織構築のための戦略 第7回日本再生医療学会総会 2008年 3月13日 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 憲正 (NAKAMURA NORIMASA)
大阪大学・臨床医工学融合研究教育センター・招聘教授

研究者番号：50273719

(2) 研究分担者

橋本 淳 (HASHIMOTO JYUN)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40237938

中田 研 (NAKATA KEN)
大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：00283747

吉川 秀樹 (YOSHIKAWA HIDEKI)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60191558

(3) 連携研究者

藤江 裕道 (FUJIE HIROMICHI)
工学院大学・工学部・教授

研究者番号：20199300

明石 満 (AKASHI MITSURU)
大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：20145460

松崎 典弥 (MITSUSAKI MICHIIYA)
大阪大学・大学院工学研究科・講師

研究者番号：00419467