

機関番号：3 2 6 4 3

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：1 9 7 9 0 8 9 6

研究課題名（和文）間葉系幹細胞を用いた再生軟骨の MRI による多角的組織組成評価

研究課題名（英文）In vitro assessment of three-dimensional tissue engineered articular cartilage with a combination of quantitative MR imaging techniques

研究代表者

渡辺 淳也（WATANABE ATSUYA）

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：4 0 3 7 5 7 1 2

研究成果の概要（和文）：

関節軟骨の定量的評価が可能な遅延相軟骨造影 MRI、T2 マッピング、及び 3D-SPGR MRI を用いた、再生軟骨の MRI による多角的組織組成評価法を確立した。また同評価法を用いて、ウサギの間葉系幹細胞を用いた三次元培養軟骨における、良好な再生軟骨を得るための播種細胞数、足場素材の大きさ、生体移植までの三次元培養期間等の最適な条件を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we established an in vitro quantitative MR imaging technique of 3D tissue engineered cartilage with a combination of dGEMRIC, T2 mapping, and 3D SPGR MRI. Using the established MR imaging technique, we determined the optimal conditions for culturing 3D tissue engineered cartilage using rabbit mesenchymal stem cell, including seeding cell number, scaffold size, and in vitro culture duration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	100,000	30,000	130,000
年度			
総計	3,200,000	570,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：再生軟骨、間葉系幹細胞、三次元培養軟骨、磁気共鳴撮像

1. 研究開始当初の背景

増殖能の高い間葉系幹細胞を用いた軟骨再

生法は、変形性関節症の有効な軟骨治療法になると期待されている。間葉系幹細胞を用い

た軟骨再生技術の確立には、間葉系幹細胞を効率的に軟骨細胞へと分化誘導し、さらに軟骨細胞を軟骨組織に成熟させることが重要な鍵となる。また生体内では、移植された軟骨組織は細胞外基質の産生やリモデリングを繰り返して成熟するが、この際生体由来の様々なサイトカインや力学的刺激等に暴露される。より健全な軟骨に近い良好な再生軟骨を得るためには、移植軟骨組織の力学的特性、生化学的特性に大きな影響を与えるこれらの因子を効率的に制御する必要がある。一方、従来の病理組織検査や基質構成分子の生化学的検査は、対象軟骨組織を摘出する必要があるため、一定時期における横断的評価には有用であるが、一つの対象を経時的に評価することは出来なかった。このため、軟骨組織の成熟過程での組織組成変化を経時的に評価可能な非侵襲的技術の確立が望まれていた。

2. 研究の目的

最近のMRI撮像技術の進歩とともに、関節軟骨の基質構成高分子の詳細な情報を非侵襲的に評価可能なMRI撮影法が開発され、基礎研究が行われている。このうちその有用性が検証されている方法として、関節軟骨の機能に重要な軟骨中のGlycosaminoglycan (GAG)濃度が評価可能なMRI撮像法であるDelayed gadolinium-enhanced MR imaging of cartilage (dGEMRIC)、関節軟骨中のコラーゲン配列が評価可能なMRI撮像法であるT2 mapping、関節軟骨の詳細な形態評価が可能なthree-dimensional spoiled-gradient recalled (3D-SPGR) MR imagingなどが挙げられる。本研究の目的は、これらの新しいMRI撮影法を組み合わせることで、再生軟骨の多角的組織組成評価を行う方法を確立すること、及び間葉系幹細胞を用いた再

生軟骨の組織組成をMRIを用いて評価し、より良好な再生軟骨を得るための至適条件を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) MRIによる多角的組織組成評価法に関しては、まずin vitroで三次元培養軟骨組織の組織像、及び実際の組織中のGAG濃度、コラーゲン濃度、水分濃度などを評価し、MRIによる評価との相関を調べた。

次に多施設での研究、及び臨床使用を可能にするため、より簡便で再現性の高いMRI解析システムの開発を行った。開発目標としては、in vitro、in vivoともに利用可能で、基本的な機能として、①dGEMRIC、T2 mapping、及び3D-SPGR MRIによるデータを画像処理し、定量的解析結果の出力を行う、②詳細な形態評価が可能な3D-SPGR法による画像を参照画像として、半自動的にdGEMRIC、及びT2 mappingにおける軟骨部分の抽出を行う、③dGEMRIC、T2 mapping、及び3D-SPGR MRIの結果を三次元的にカラー表示し、経時的な変化を視覚的、定量的に評価する、を有することとした。

(2) 良好な再生軟骨を得るための至適条件に関しては、まずウサギ間葉系幹細胞を用いて、播種細胞数、軟骨厚、サイトカインの添加量や添加時期、培養期間等を変化させた三次元培養軟骨組織をin vitroで作成し、その組織学的、生化学的特徴を評価することで最適な条件を調べた。

次に最適化した条件で作成された三次元培養軟骨をヌードマウスの背部脂肪層内に移植し、移植後経時的にin vivoでのMRI評価を行うとともに、最終観察時に移植軟骨組織を摘出し、組織学的、生化学的評価とMRI評価との比較を行った。

4. 研究成果

MRI による多角的組織組成評価法に関しては、軟骨の質的評価が可能な MRI 撮像法である、dGEMRIC 及び T2mapping、詳細な形態評価が可能な 3D-SPGR 法を組み合わせた解析システムを開発した。また検証実験により、本解析システムは精度が高く、また高い再現性を持つことが確認された。また本解析システムは三次元培養軟骨組織だけでなく、軟骨再生手術を行った実際のヒト症例にも応用可能であることが示され、今後の臨床評価に有用であると考えられた。

良好な再生軟骨を得るための至適条件に関しては、播種細胞数、サイトカインの添加量や添加時期、三次元培養の期間と生体への移植時期等の条件の検討を行い、我々の用いた三次元培養軟骨組織の作成法における至適条件が判明した。またこれらの条件に加え、間葉系幹細胞を採取した個体の違いや、培養軟骨組織中に実際に生着した細胞密度の違いなどによって、サンプルの成熟速度にある程度の差違あることがわかった。この差違に関しては、MRI 解析システムにより個々のサンプルの経時的評価を行うことで、最適な生体への移植時期を把握し対応することが可能であった。

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 0 件)

投稿準備中

[学会発表] (計 5 件)

① Atsuya Watanabe、 Assessment of

three-dimensional tissue engineered articular cartilage with a combination of quantitative MR imaging techniques.

第 7 回 Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies、2010 年 10 月 16 日、日本、京都

② Atsuya Watanabe、 In vitro assessment of three dimensional tissue engineered articular cartilage with a combination of quantitative MR imaging techniques、2009 年度 Osteoarthritis Research Society International、2009 年 9 月 10 日、カナダ、モントリオール

③ Atsuya Watanabe、 Evaluation of three dimensional tissue engineered articular cartilage with a combination of quantitative MR imaging techniques、第 8 回 International Cartilage Repair Society、2009 年 5 月 23 日、米国、マイアミ

④ 渡辺淳也、三次元培養軟骨の MRI による多角的組織組成評価、第 23 回 日本整形外科学会基礎学術集会、2008 年 10 月 23 日、京都

⑤ 渡辺淳也、dGEMRIC 及び T2 マッピングを用いた三次元培養軟骨組織の多角的組織組成評価、第 36 回 日本磁気共鳴医学会大会、2008 年 9 月 12 日、旭川

[図書] (計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

該当なし

○取得状況（計0件）

該当なし

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 淳也 (WATANABE ATSUYA)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：40375712

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし