様　式　C－19、F－19－1、Z－19　(共通)

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　５ 月 ３０ 日現在

機関番号：１２６０１

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：１９Ｋ１０２８１

研究課題名（和文）再生組織におけるECM-細胞間調節機構の解明とアログラフトの実現化

研究課題名（英文）Elucidation of ECM-cell regulatory mechanisms in regenerative tissues and practical application of allografts

研究代表者

浅輪　幸世（Asawa, Yukiyo）

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：１０７６９９１２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：再生組織の汎用化をさらに目指すためには、同種再生軟骨（アログラフト）の開発が不可欠である。先行研究より再生軟骨を脱細胞化させることに成功し、アログラフトに利用可能な足場素材の可能性を見出した（Watanabe T, AsawaY, et al. Reger Ther 2020）。さらにアログラフトを実現させるためには、脱細胞化した再生足場を用いて、細胞外基質（ECM）-細胞間接着およびECM分解機序を検討した。再生足場と再挿入細胞の異種による不適合性は、接着分子が密接に関与しており、組織再構築の再生誘導は接着分子の機能を制御することによりアログラフトの実現が加速できる可能性が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
米国では関節用軟骨組織アログラフトが市販されているが、本邦では倫理面より使用されていない。したがって、再生組織を脱細胞化し足場材料として活用することが最も有効で実現化が早い方法であると考えた。国内研究では三次元的な再生組織を脱細胞化させ、足場素材として使用している報告例はない。将来的には、臓器のアログラフトバンクの可能性が示唆され、再生医療の発展に多大なる貢献ができると考える。加えて、脱細胞化ECMに細胞が浸潤するプロセスは、生理的な組織構築やがん転移と共通なメカニズムによって制御されている可能性があるため、生理的なECMの機能を理解するうえでも貴重な情報提供となりうると考える。

研究成果の概要（英文）：The development of allogeneic regenerated cartilage (allograft) is essential for the further generalization of regenerated tissue. In a previous study, we succeeded in decellularizing regenerated cartilage and found a potential scaffold material that can be used for allografts (Watanabe T, AsawaY, et al. Reger Ther 2020). To further realize allografts, extracellular matrix (ECM)-cell adhesion and ECM degradation mechanisms were investigated using decellularized regenerative scaffolds. We found that adhesion molecules are closely involved in the incompatibility between the regenerative scaffold and reinserted cells due to their heterogeneity, and that the regenerative induction of tissue remodeling may be accelerated by controlling the function of adhesion molecules to realize allografts.

研究分野：再生医療

キーワード：軟骨再生　脱細胞化

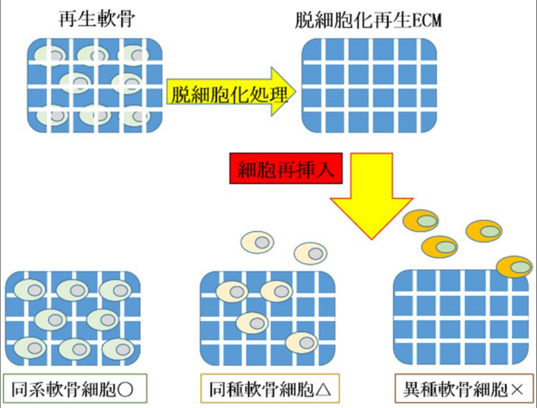
※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

顎顔面領域での再建治療や再生工学の研究は比較的に進んでおり、すでに自家軟骨・骨移植は臨床応用されている。しかし、取り出した組織をトリミングして移植する方法や欠損部に粉砕した組織片を充填する現行治療では、組織採取量の限界や侵襲による患者負担の大きさが問題となる。このような現状を打開するため、アログラフト（同種移植）の導入は非常に魅力的である。軟骨組織は従来より免疫原性の低い組織として知られている。また、軟骨細胞は、細胞周囲に複雑かつ緻密な細胞外基質（ECM）を形成するが、これが免疫抑制作用を発揮するという報告がされている（Arzi B, ActaBiomaterialia,2015，Bolano L,Orthopedics, 1991）。このように拒絶反応のリスクが低いと考えられる同種軟骨は、感染症などに関する安全性確保が課題となるものの、海外では数多くの使用実績がある。一方、本邦では同種軟骨を入手すること自体が困難である。

図１　脱細胞化再生ECMに対する細胞浸潤の違い



申請者らは、この同種軟骨の入手困難性を解決するため、先行研究（図 1）において、再生軟骨を作製し、足場素材として利用するための再生軟骨の脱細胞化法を確立した。さらに、脱細胞化再生 ECM に同系軟骨細胞を注入したところ、細胞は注入した部位から離れたところにまで遊走し、脱細胞化前の軟骨組織のように間隔をもって配置した。一方、異種細胞を脱細胞化再生 ECM へ注入した際には、組織内への遊走がほとんど生じなかった。また、細胞再移植を行った脱細胞化再生 ECM をマウスに移植した実験では、細胞を注入しない組織に比べグリコサミノグリカン量が増加し、脱細胞化前の軟骨組織と同等であったことから、移植した軟骨細胞が基質を産生したと考えられた。一方、同種細胞を注入した脱細胞化再生 ECM をマウスに移植したが、軟骨基質再生は限局的にしか見られず、同系移植に劣っていた。この原因としては、1. 同種細胞に対するホストからの免疫反応の他に、上述の同系移植の結果を考慮に入れると 2. 細胞遊走が不十分なため、限局的な基質形成となった可能性や 3. 基質産生の不十分さやそれに伴う免疫抑制能の不完全性が考えられる。この脱細胞化再生 ECM を利用したアログラフトを実現させるためには、ECM と細胞間の相互作用を解析し、基質内の細胞の遊走や、基質産生を適切に行わせる必要がある。

２．研究の目的

現在までに、軟骨組織の ECM の各構成成分と細胞との関連性について様々な報告がある。軟骨組織は細胞外マトリックスにⅡ型コラーゲンやプロテオグリカンが多く含まれており、それらが構成する三次元的ネットワークが荷重やねじりに対して重要であると同時に、細胞生存性、増殖、分化制御にも大きく関与している。ECM と細胞の相互作用は基質の維持に重要であり、例えば細胞接着分子のインテグリンファミリーがコラーゲンなどの RGD 配列を認識して結合することで、細胞内に情報が伝達され、細胞制御や ECM の産生を担っている。一方で、細胞から

分解酵素である MMPs が産生され、ECM 分解シグナルが伝達されることにより ECM のリモデリングの調節機構が働いている。したがって、ECM は細胞による構成成分の産生と分解によってダイナミック且つ厳密な調節を受けている。そのバランスが破綻すると様々な疾患原因となると考えられている。また、インテグリンと MMPs は上述の脱細胞化再生 ECM における細胞遊走の際にも協調して重要な働きを行っていると考えられる。しかし、生体内を模倣した三次元的な ECM と細胞の相互作用についての検討は見当たらず、また細胞接着と基質分解の両者の関連性を詳細に明らかにしている報告はない。本研究ではインテグリン、MMP による細胞接着と基質分解を司る分子に着目し、三次元再生 ECM におけるそれぞれの作用の関連を解明するというこれまでに類を見ない研究である。

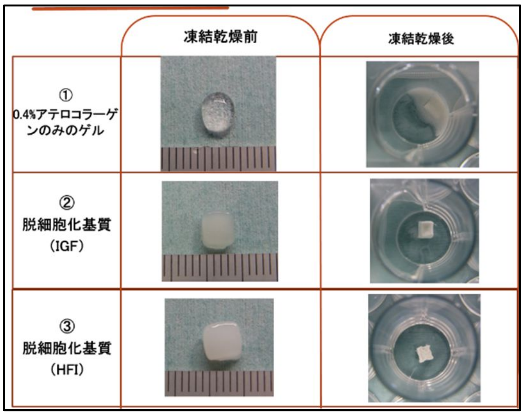
３．研究の方法

脱細胞化 ECM における同種および異種細胞の浸潤抑制は、細胞が ECM に浸潤する際、インテグリンが ECM に結合し、MMPs などの基質分解酵素を産生してルートを確保するが、同種および異種細胞では一連のプロセスが抑制されていることが推測される。この現象は、インテグリンによる ECM-細胞間接着の抑制か、MMPs による分解作用の抑制かは不明である。

本研究では、**オートグラフト（同系再生軟骨）の ECM-細胞間調節機構を解明し、アログラフト（同種再生軟骨）、ゼノグラフト（異種再生軟骨）の組織再構築の改善につなげる。**
そのため、以下の研究を、研究期間内（2019-21 年度、3 年間）に実施した。
①同系再生軟骨における組織再構築機序の解明
②組織再構築を促す再生誘導因子の同定
③同種および異種細胞における組織再構築誘導の検討
④in vivo 軟骨再生誘導と免疫特権獲得の検証

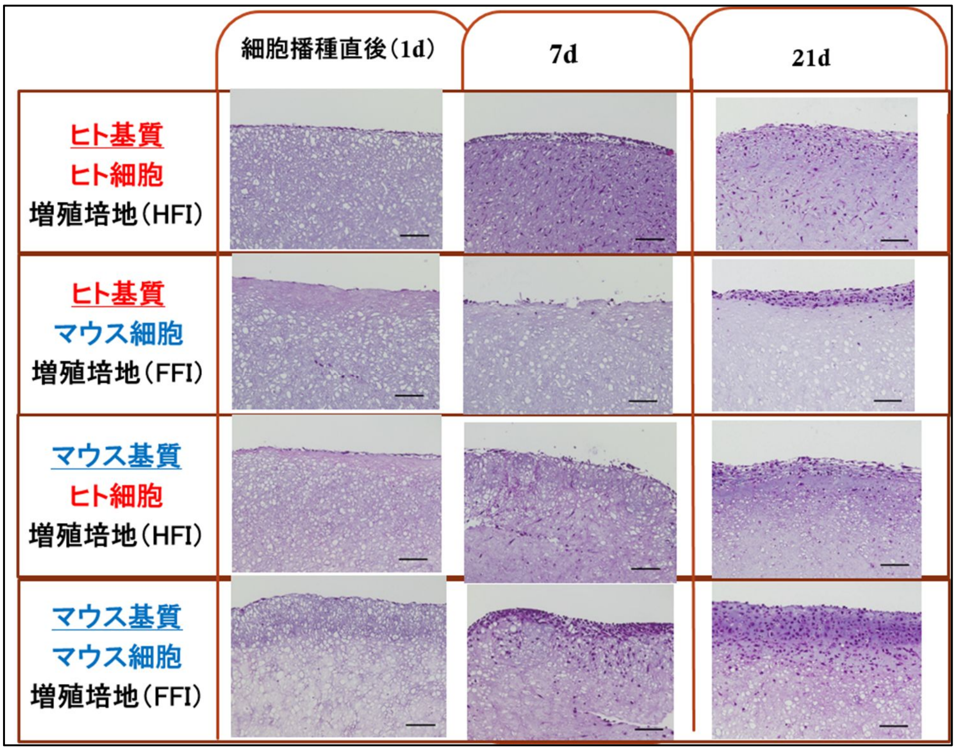
４．研究成果

まずは、アログラフトに適した軟骨 ECM-細胞間調節機構を明らかにするため、異なる動物種（ヒト、マウス）由来の耳介軟骨細胞を用いて単層培養を行い、再生軟骨を作製した。次に、本研究の基盤となる先行研究（The usefulness of the decellularized matrix from three-dimensional regenerative cartilage as a scaffold material. Watanabe T, AsawaY, et al. Reger Ther 2020 Dec 10;15:312-322.）の方法より作製した再生軟骨から脱細胞化し、再生足場を作製した。作製した再生足場の足場としての構造、有効性を確認するために、アテロコラーゲンゲル、分化誘導培地で作成した脱細胞化基質、増殖培地で作製した脱細胞化基質を凍結乾燥して再生足場を作製して比較したところ、アテロコラーゲンゲルのみでは凍結乾燥後固体としての物性はなく、既存のアテロコラーゲン構成要素のコラーゲンのみでは形状を有する足場には適さないことが明確になった。分化誘導培地で作成した脱細胞化基質、増殖培地で作製した脱細胞化基質においては凍結乾燥後も破損や型崩れなく液体部分のみが消失し、固体としての物性を維持する技術が確立された。（右図）



次に、作製した再生足場に同種もしくは異種の細胞を再挿入して生着性を検討したところ、再生足場と再挿入細胞が同種の場合は、内部にも細胞が

観察され再生足場に生着していることが確認された。しかし、再生足場と再挿入細胞が異種の場合は、内部まで細胞遊走が見られず、生着していなかった。これらの結果より、基質と細胞間には密接な関連性があり、それは蛋白レベルでの種適合性が関与している可能性が推測された（下図）。そこで、同系再生軟骨の細胞接着と分解酵素の阻害実験を行い、軟骨形成の影響を検討した。再生足場に同系マウス細胞を注入し、接着分子もしくは分解酵素の阻害剤の添加実験を検討した。軟骨組織で報告されているインテグリンの RGD ペプチド用いた。分解酵素である MMPs は軟骨細胞で発現が報告されている MMP-1、2、3、13 と膜型 MMPs の MT1-MMP に対する各インヒビターと内因性の阻害剤である TIMP を使用した。様々な検討結果より、凍結乾燥後に細胞を再挿入する場合、スポンジ状の足場に細胞含有培地が物理的に吸収され生着に繋がるため、足場に対する生着性は MMP などの分解酵素ではなく、インテグリンなどの接着分子が関与していることが推測された。インテグリンの阻害実験は現在も継続しており、再生誘導因子の選定中である。以上の研究結果より、再生足場と再挿入細胞の異種による不適合性は、接着分子が密接の関与しており組織再構築に関連する再生誘導には、接着分子の機能を制御することによりアログラフトの実現が加速できる可能性が見出された。



５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔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	西澤　悟 (Nishizawa Satoru) (00646200)	東京大学・医学部附属病院・特任助教 (12601)	
研究分担者	星　和人 (Hoshi Kazuto) (30344451)	東京大学・医学部附属病院・教授 (12601)	
研究分担者	疋田　温彦 (Hikita Atsuhiko) (60443397)	東京大学・医学部附属病院・特任准教授 (12601)	

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関