

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18451

研究課題名(和文) nanoPGA / PCL含有複合型吸収性スcaffold の軟骨再生誘導について

研究課題名(英文) Study of cartilage tissue engineering using nanoPGA / PCL composite scaffold

研究代表者

山内 誠 (Yamauchi, Makoto)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：90438060

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)：耳介形状PCLの表面をナノファイバー化したPGAで被覆した複合型吸収性スcaffold(nanoPGA / PCL)にヒト軟骨細胞を播種した結果、PGA群と比較して、nanoPGA群で優位に細胞生存率が高値であった。複合型吸収性スcaffoldをエタノール処置により親水性に表面改質し、軟骨基質の産生に及ぼす影響について検討したところ、SOX5は有意に発現亢進を示し、IL-1の発現は有意に低下した。また、軟骨再生面積比および軟骨被覆率ともに、優位に増加しており、経時的な軟骨基質産生を促進し、耳介形状を長期維持するため足場として適していることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小耳症や外傷後の耳介欠損の治療は、現在、自分自身の肋軟骨を採取し、耳介フレームを作成して移植するのが一般的である。しかし、手術侵襲が大きく、手術の難易度が高い点、複数回の手術が必要となる点などが問題点として挙げられる。本件研究により、高生体親和性の耳介形状足場に、耳介軟骨を微細加工しマイクロ軟骨を播種することにより細胞培養を必要としない軟骨再生の技術開発が可能となり、低侵襲で普遍的な治療方法となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Result of seeding human chondrocytes onto bioresorbable composite scaffolds (ear-shaped PCL with surface coverage of nanoPGA)(nanoPGA/PCL), cell viability rate was significantly higher in the nanoPGA group than in the PGA group. When the surface of nanoPGA/PCL scaffolds was modified to be hydrophilic by ethanol treatment and the effect on cartilage matrix production was examined. RT-qPCR analyses of chondrocytes grown on ethanol-treated scaffolds showed significantly increased SOX5 and decreased IL-1 expression levels. In addition, both cartilage regeneration area ratio and cartilage coverage rate increased significantly. These results suggest that ethanol-treated nanoPGA/PCL scaffolds promotes chronological cartilage matrix production and is suitable as a scaffold for long-term maintenance of the shape of the auricle.

研究分野：形成外科

キーワード：組織再生 軟骨培養 小耳症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体組織工学は1988年 Vacanti らによってその基本概念が提唱され、1997年 Cao らはこの基盤技術をさらに発展させ、ヒト耳介形状を有する軟骨を再生誘導し、耳介形成手術における新しい選択肢となりうることを示唆した。本技術をヒトへ臨床応用するためには、小動物実験および前臨床試験となる大動物を用いた自家移植モデルにおける軟骨再生が不可欠であるが、それらによる実験成績はいまだ不良である。小動物モデル(免疫不全マウス)では、移植後10ヵ月において耳輪・対耳輪・舟状窩など耳介の特徴的構造が部分的に消失し、大動物自家移植モデルでは、強い炎症反応などにより、移植後3ヵ月で耳介構造全体が消失してしまう。

組織再生誘導においては、(1) 播種細胞の種類および細胞密度、(2) 軟骨細胞増殖や基質産生を誘導するサイトカイン、(3) 細胞の分化増殖に必要な微小環境あるいは3次元形状を付与する足場材料(スカフォールド)の性状・力学的強度・組織親和性などが重要である。いずれの項目の改良も重要であるが、生体組織工学における3要素の中、特にスカフォールドの改良に焦点を絞り検討することにした。

### 2. 研究の目的

本研究ではスカフォールドの改良を目的としている。近年、ナノファイバーを用いて、本来の細胞外基質に近い微細構造をもつ足場材料を作製することが可能となり、軟骨組織再生用の新規素材として注目されている。これまで我々は、ナノファイバー化した生分解性ポリマーPGAとプロリンと組み合わせて複合型非吸収性スカフォールドとして用い、軟骨再生を試みてきた。その結果、播種軟骨細胞の接着効率は著しく向上し、大動物(イヌ)を用いた自家移植モデルにおいて良好な軟骨再生を示した。しかしながらプロリンでは正常耳介が持つ複雑な三次元形状・薄さ・しなやかさを長期間維持することは困難である。そのため、長期間三次元形状を維持するため、十分な剛性を持つpoly-ε-caprolactone (PCL)の使用を検討することにした。

### 3. 研究の方法

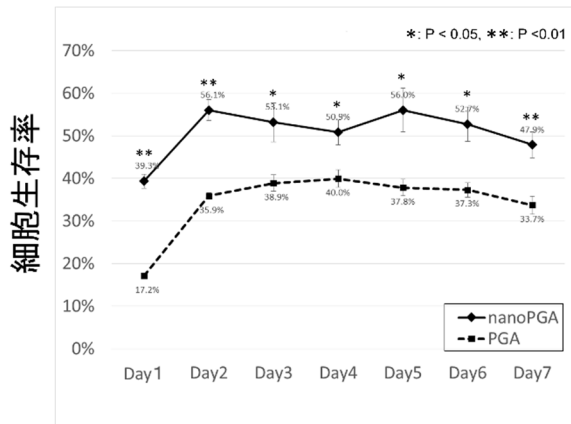
耳介形状PCLの表面をナノファイバー化したPGA (nano PGA) で被覆し、複合型吸収性スカフォールド(nano PGA / PCL)を作製し、この新規足場材料にヒト軟骨細胞を播種し、ナノファイバーにおける播種細胞の細胞分布および生存率を検討する。nano PGA シートおよび耳介形状PCLの表面性状はともに疎水性のため細胞接着を高めるためにエタノールを用いて複合型吸収性スカフォールドの疎水性表面を親水性に改質し、その複合型吸収性スカフォールドにヒト耳介軟骨細胞を播種した後にヌードマウス皮下に移植し、耳介形状軟骨の再生誘導を行い、その有効性を検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) ナノファイバー化PGAにおける播種軟骨細胞の分布、接着能、および生存率の評価

ヒト立ち耳軟骨より単離した軟骨細胞をnano PGA不織布に播種し、培養開始後7日目におけるnano PGA群とコントロール群であるPGA群のポリマー性状およびポリマー内部の細胞分布を顕微鏡にて評価した。nano PGA群では、倒立顕微鏡では薄いポリマーの両面に播種細胞が集積していたが、ポリマー内部への細胞浸潤像を認めなかった。偏光顕微鏡では、薄く密なナノファイバー構造を認めた。一方、PGA群では、倒立顕微鏡で播種細胞がポリマー線維束の周辺に散在するのみで、ポリマー間隙に細胞成分を認めなかった。偏光顕微鏡では厚いポリマー内部に散在するポリマーを認めた。以上より、nano PGA群の細胞分布はポリマー外部には高い細胞密度で集積

するが、ポリマー内部にはnano PGA群およびPGA群の両群で細胞密度は低いことが判明した。

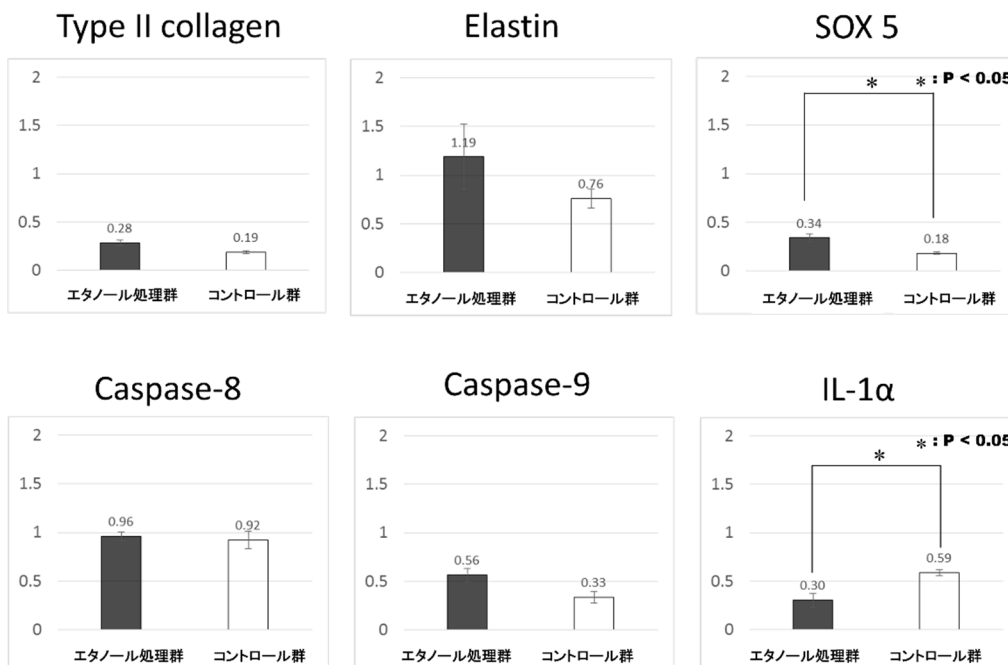


培養開始より7日間の培養過程における播種細胞の継時的な生存率を、プレートリーダーによる吸光度を計測し、総播種細胞数に対する生軟骨細胞の割合を1日毎に算出し検討した。培養1日目における生存率は、nano PGA群では約39%、PGA群では約17%で、nano PGA群で優位に生存率が高値であった。その後の培養経過において、両群とも生細胞数は急速に増加し、培養3日目でプラトーに達した。培養期間中の細胞生存率は、すべて nano PGA群が優位に高い結果であった。

## (2) 複合型吸収性スcaffoldsの表面改質が軟骨基質の産生に及ぼす影響の検討

エタノール処置した複合型吸収性スcaffoldsとエタノール処置を行っていないスcaffolds (コントロール群) にヒト立ち耳から単離した軟骨細胞を播種し、無胸腺マウスの背部皮下に移植し、移植後 10 週に標本採取し、複合型吸収性スcaffoldsの表面改質が軟骨基質の産生に及ぼす影響について、肉眼所見、組織学的所見、遺伝子発現について検討した。組織学的検討は、細胞を播種した複合型吸収性スcaffoldsの移植後 10、20週目に、トルイジンブルー染色、Safranin O 染色、Verhoeff 染色にて行った。肉眼所見および組織学的検討では、コントロール群では、軟骨再生はスcaffoldsの一部に限局して観察され、軟骨形成は全体的に不良な印象であったが、エタノール処理群では、スcaffolds表面は軟骨組織で覆われており、nano PGA領域に一致して再生軟骨が観察された。一方、両群ともスcaffolds内部はSafranin OおよびVerhoeff染色に陰性であり、軟骨再生を認めなかった。スcaffolds表面部の再生軟骨を比較したが、両群での組織学的差異は認めなかった。

遺伝子発現は、採取された再生組織における軟骨関連遺伝子 (Type II collagen、Elastin、SOX 5) およびアポトーシス関連遺伝子 (Caspase 8、Caspase9、IL-1 ) の発現を、定量的 RT-PCR 法にて解析した。

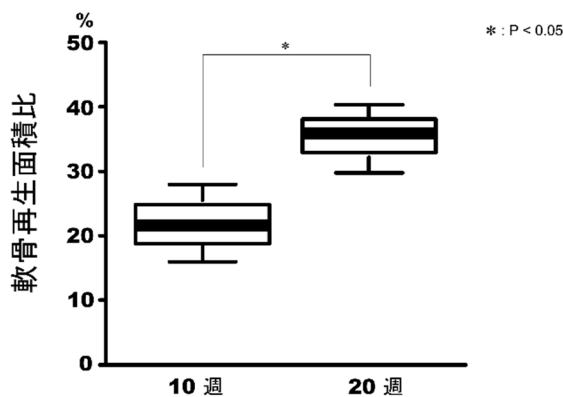


エタノール処理により、Type collagen、Elastin、SOX5、Caspase 8、Caspase 9の発現は亢進する傾向を示した。特に、SOX5は有意に発現亢進を示し、IL-1 の発現は有意に低下した。

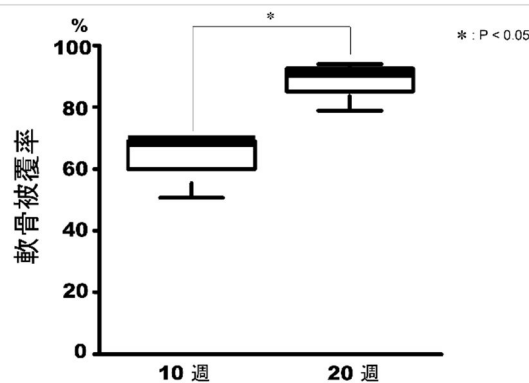
### (3) 複合型吸収性スcaffoldの表面改質が軟骨基質の産生および軟骨被覆率に及ぼす経時的な影響の検討

エタノール処置により表面改質された複合型吸収性スcaffoldと軟骨組織との親和性を評価した。肉眼所見および組織学的検討において、移植後 10 週目ではスcaffoldの一部に足場の小孔が透見され、移植後 20 週目には、スcaffold表面に白色色調や光沢が観察され、耳介特有の輪郭形状がより明瞭に表現された。組織学的には、移植後 10 週目では、Safranin 0 染色陽性領域がスcaffoldの表面部のみで、内部の陽性反応は不十分であったが、移植後 20 週目では、スcaffoldの辺縁部の Safranin 0 染色陽性領域が内部に向けて拡大し、表面のみでなく内部においても陽性領域が観察された。この結果、エタノール処理を行ったスcaffoldの表面に生じた軟骨再生は、経時的に進行し、中心部に向かって軟骨再生が促進することが示唆された。

軟骨基質の産生と軟骨被覆率の検討もにおいて、Safranin 0 染色された軟骨再生の面積比およびスcaffoldが再生軟骨により被覆される軟骨被覆率を調査した。



軟骨再生面積比は、移植後 10 週目 (約20%) に比較して、移植後 20 週目において有意な高値 (約40%) を示し、経時的な軟骨基質の増加が認められた。



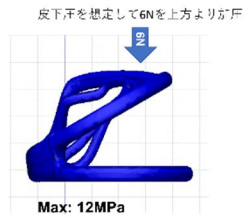
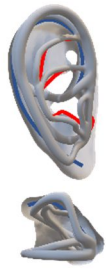
一方、軟骨被覆率は、10 週目において 63% であったが、20週目には88% に有意に増加した。

これらの結果より、表面改質した複合型吸収性スcaffoldは、経時的な軟骨基質産生を促進し、耳介形状を長期維持するための芯材として適していることが判明した。

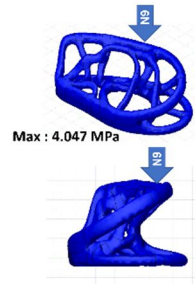
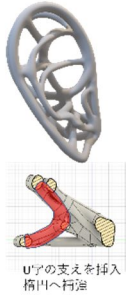
### (4) 臨床導入実用化のための複合型吸収性スcaffold形態の検討

今後、臨床導入するにあたり、現在、実際に使用されている肋軟骨移植と同様のデザインで耳介形態を再現した複合型吸収性スcaffoldでは、凹凸を表現しにくく、硬い耳介足場になってしまう。また、耳介挙上のための 2 回の手術が必要となるが、分解が進んだ足場が耳介挙上に抵抗する強度が維持できるかなどの懸念があり、作成する耳介形態のデザインを検討し

た。



ヒトの頭部 CT から耳介データを抽出し、凹凸のあるフレーム部分を立体的にトレースして、耳介拳上が必要とされない 3 次元形状足場と作成した。この構造に上方から皮下圧を想定した 6N をかけると耳介形態はしなり耐圧傾向を示すが、基部に 12MPa の圧が負荷されていることが判明した。そのため経時的に圧負荷が加わると耳介足場が破折するリスクが上昇することが示唆された。



フレームの太さを力方向へ変形させ剛性を上げる改良を行い、基部の圧負荷を 4.0MPa へ軽減することができた。

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------