

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月30日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21659357

研究課題名（和文）スフェロイド細胞複合体による関節軟骨修復効果

研究課題名（英文）The repairing effect of articular cartilage by cellular spheroids composed of synovial cells and chondrocytes

研究代表者

佐藤 正人 (SATO MASATO)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：10056335

研究成果の概要（和文）：自家軟骨細胞移植法は臨床応用されているが、高齢者に多い広範囲病変に適応困難であることや体外培養期間が長いことなど依然として解決すべき点がある。採取量に制限のある軟骨細胞に高度な増殖能と軟骨細胞への分化能を保有する滑膜細胞を加えた新規混合細胞体を作製した。本法により、日本白色家兎膝関節から単離した軟骨細胞と滑膜細胞からスフェロイド形態の細胞移植体が短期間内に多量準備が可能となり、ヒトへの応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Autologous Chondrocyte Transplantation (ACT) has been chosen as the treatment for Osteoarthritis. However, this technique needs the articular chondrocytes (AC) from healthy cartilage, which associates donor site morbidity. As AC from aged patents show limited proliferation in vitro, ACT is not accepted widely for treatment of osteoarthritic lesions. On the other hand, the synovium derived cells (SY) whose high proliferation potency does not changed regardless of age have been focusing the localization mesenchymal stem cells of differentiation potency into chondrocytes. AC and SY from 4 knee of a Japanese white rabbit were isolated with 2 step enzymatic digestion and cultured, the passage growth rate of the cells were compared. When AC and SY cultured it in a high density suspension state in non-adhesive culture plate, cellular spheroids were collected and then histological evaluated was conducted with toluidine blue, safranin O and immunohistochemistry of collagen type 1 and 2. The gene expressions concerning choncrocyte-specific differentiation were also tested by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. In results, we successfully prepared a large quantity of cellular spheroids in a short period using mixed AC and SY regardless of cellular component rates. Effective usage of SY is expected as a replacement of AC in ACT.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	0	1,700,000
2010年度	600,000	0	600,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,000,000	210,000	3,210,000

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：四肢機能再建学

1. 研究開始当初の背景

1994年Brittbergらが発表した自家軟骨細胞移植法 (Autologous Chondrocyte Transplantation, ACT) の臨床応用は、既に全世界で2万例以上に施行された実績がある。しかし、患者の正常軟骨部から採取する移植用の関節軟骨細胞では採取量制限があり、特に広範囲の病変は適用外であり、培養による準備期間が約4週間と長いことなど依然として改善すべき点がある。特に高齢者の場合の再生能が乏しい軟骨細胞(以下、AC)は、培養増殖能が低く広範囲治療は困難であった。一方、高い増殖能が変わらない滑膜細胞(以下、SY)は、間葉系幹細胞(以下、MSC)の存在と軟骨細胞への分化能が報告されている。今回、我々が考案した新規培養法によって、多量の細胞移植体を短期間で準備することが可能となった。

既にACI法の臨床応用の対象になっている外傷性の小さな軟骨全層欠損修復から、より広範囲の軟骨欠損を修復・再生する新規の治療法確立のため、組織工学または、生体材料工学的な手法を用いて基礎的検討を行い、エビデンスを創成することが必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ACとSYからなる軟骨滑膜混合細胞体を作製し、細胞移植体の性状を観察並びに分析して新規ACI法の細胞移植治療用としての可能性を明らかにすること、並びに骨膜の代替になる密封材料の検討が本研究の主な目的である。

3. 研究の方法

(1) ACとSYまたはMSCとの共培養における増殖能の評価

日本白色家兎由来の初代培養した軟骨細胞の増殖を早め、短期間で大量の軟骨細胞を獲得するために、増殖能の高い滑膜細胞(SY)および間葉系幹細胞(MSC)を用いて、一定期間培養して回収した培地から液性増殖因子供給源のconditioned mediaを作製した。作製したconditioned mediaを軟骨細胞の培養に利用し、通常の10%FBS入りの培地と細胞増殖を比較し、増殖能の向上を評価した。

(2) 正常軟骨への分化方法の検討

軟骨細胞は分化のtriggerとし、微細環境として働くことが可能か確認した。まず、SYおよびMSCを増殖させた後、浮遊培養用の培養皿単独およびシェーカーを用いて高密度浮遊振とう培養による3次元スフェロイド培養を行った。

①軟骨細胞由来の液性因子の供給(conditioned mediaを利用)および、insertを介在した共培養の効果を確認した。これらの方法は上記の共培養と同様だが、分化させる対象のMSC、SY由来細胞はスフェロイド形成による軟骨細胞分化に有利な細胞塊の3次元培養を行なった。

②軟骨細胞との直接的な接触のコミュニケーションによるMSCのACへの分化誘導作用を確認した。ACとMSCまたはSYの2つの細胞からなるスフェロイドを対象に、RT-PCR(1型と2型コラーゲンの発現)と組織学的な評価(トルイジンブルー、サフラニンO染色並びに免疫染色)を行なった。

(3)SYまたはMSCを用いたスフェロイド移植体作製後の、移植時に用いる密封材料の検討
短期間内に従来のACI法より効率の良い量質細胞材料(スフェロイド移植体)による新軟骨細胞移植法を検討した。

SYとMSCは高齢者由来であっても高い増殖能を維持している。これらの細胞からなる各々の3次元のスフェロイド培養法でスフェロイドを形成させる際、スフェロイド体積の多くを占める部分を増殖能の高い細胞材料で作製し、軟骨細胞の含有は再生に必要な最小限の量で培養を行なった。日本白色家兎を用いて、上記(2)のスフェロイド単独、もしくは軟骨及び滑膜細胞シート・スフェロイド組み合わせ構造による治療効果を比較検討し、より有効性のある方法を選択して移植後の再生程度を評価した。

4. 研究成果

1994年Brittbergらが発表した自家軟骨細胞移植法ACIの臨床応用は、全世界で2万例以上に施行されている。しかし、患者の正常軟骨部から採取する移植用の関節軟骨細胞(AC)は採取量に限界があり、改善すべき点がある。特に高齢者の場合の再生能が乏しいACは、培養増殖能が低く広範囲治療が困難であった。一方、継代しても高い増殖能が変わらない滑膜細胞(SY)は、間葉系幹細胞(MSC)の存在と軟骨細胞への分化能が報告されている。

本研究の目的は、ACとSYからなる軟骨滑膜混合細胞体を作製し、細胞移植体の性状を観察並びに分析して新規ACI法への利用の可能性を明らかにすることである。

日本白色家兎の膝由来のACとSYを培養して蛍光標識した後、高密度浮遊状態で振とう培養し混合細胞スフェロイドを作製した。細胞スフェロイドの性状はRT-PCR(1型と2型コラーゲンの発現)と組織学的な評価(トルイジンブルー、サフラニンO染色並びに免疫染色)を実施した。

細胞スフェロイドは培養24時間から形成され、SYとAC混合比いずれにおいても作製が可能であった。通常培養条件下での異種細胞が混在する構造物を構築することは困難であるが、本研究の作製法では細胞同士の接触の機会が多く、種類の異なる細胞同士でも混合細胞スフェロイドの構築が可能であった。また、1型と2型コラーゲンの発現、トルイジンブルーの異染性とサフラニンOの染色性が乏しかった性状から、分化と脱分化の細胞が混在すると推測された。

ACへの分化可能な間葉系幹細胞を含むSYは高い継代増殖率を示し、ACの部分的な代替として低侵襲での組織採取とその効率的な活用法として期待できる。AC及びSYは、振とう運動による持続的な反復により培養容器の底部に留まらず、培養液中に浮く懸濁状態で維持でき、振とう初期段階に現れた小さいサイズの混合細胞塊を中心として多数の他の細胞同士が迅速に接着するようになり、経時的に細胞スフェロイドが成長した。5つの細胞含有条件のすべてにおいて細胞スフェロイドの作製が可能であった。この期間中に、混合細胞塊は、スフェロイド培養開始後12時間から肉眼的にも観察可能であった。さらにスフェロイド培養時間が経過すると振とう培養開始後125時間には細胞スフェロイドは凝縮して輪郭は滑らかになった。細胞スフェロイドのサイズは、小さい場合は、直径が $250 \pm 100 \mu\text{m}$ 、大きい場合は、 $700 \pm 250 \mu\text{m}$ 程度であった。

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2件)

① Lee JI, Sato M, Kim HW, Mochida J.

Transplantation of scaffold-free spheroids composed of synovium-derived cells and chondrocytes for the treatment of cartilage defects of the knee. European Cells and Materials, 査読有, Vol22, 2011, 275-290.

- ② 李 禎翼、佐藤正人、三谷玄弥、持田讓治.
関節軟骨修復・再生を目指した軟骨滑膜混合細胞体の開発. 東日本震災会誌、査読有、22 卷、2010、207-213.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 李 禎翼、佐藤正人、三谷玄弥、伊藤 聡、小久保舞美、持田讓治. 滑膜細胞と軟骨細胞の複合細胞移植体による軟骨再生効果. 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会、2010 年 10 月 14-15 日、京都.
- ② 李 禎翼、伊藤 聡、小久保舞美、三谷玄弥、佐藤正人、持田讓治. 自家軟骨細胞移植法における軟骨細胞と滑膜細胞からなる混合細胞スフェロイドの開発. 第 9 回日本再生医療学会総会、2010 年 3 月 18-19 日、広島.
- ③ 李 禎翼、佐藤正人、三谷玄弥、持田讓治.
滑膜細胞と軟骨細胞からなる細胞移植体の作製と評価. 第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会、2009 年 11 月 5-6 日、神奈川.
- ④ 李 禎翼、佐藤正人、三谷玄弥、持田讓治.
【ASIA NOW】関節軟骨修復再生をめざした軟骨滑膜混合細胞体の開発. 第 58 回東日本整形災害外科学会、2009 年 9 月 11-12 日、北海道.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：細胞混合物からなる細胞移植治療用スフェロイド及びその作製方法

発明者：佐藤正人、李禎翼、持田讓治

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2009-189672

出願年月日：2009 年 8 月 19 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

Dept. :http://ortho.med.u-tokai.ac.jp/public_html/

Lab. :http://www.u-tokai.ac.jp/international/twave/index.html#/masato_Sato/index

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 正人 (SATO MASATO)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：10056335

(2) 連携研究者

李 禎翼 (LEE JEONG-IK)
東海大学・医学部・客員研究員
研究者番号：30501803