

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09812

研究課題名(和文) ヒト軟骨前駆細胞由来軟骨組織の再構成のための3次元高速回転培養法の開発

研究課題名(英文) 3D High-Speed Rotational Culture for Reconstitution of Human Cartilage Tissue Derived from Human Cartilage Progenitor Cells

研究代表者

安村 和則 (YASUMURA, Kazunori)

横浜市立大学・医学研究科・共同研究員

研究者番号：40351621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：頭蓋・顔面領域の組織変形に対する自家軟骨組織移植には、軟骨採取に伴う高度侵襲や量的制約などの問題がある。新規治療法としてヒト軟骨細胞を用いた再生療法に対する期待が高まっているが、現在まで試験管内において、そのまま移植することができる軟骨組織を再構成することはできていない。今までに低速回転浮遊培養技術にて試験管内で足場材料を用いずに軟骨組織を再構成することができているが、組織学的にやや未成熟であった。我々はこの問題を解決するために、高速回転培養法を考案し試験管内で成熟軟骨組織を再構成することを試みた。その結果、フィルムから塊まで様々な成熟軟骨組織が再構成された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
世界に先駆けてヒト軟骨細胞を用いた高速回転培養における条件や手技などの基盤技術を確立し日本発の手技として世界に発信することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Autologous cartilage tissue transplantation for tissue deformities in the craniofacial region is fraught with problems such as the highly invasive nature of cartilage harvesting and quantitative limitations. Although there are growing expectations for regenerative therapy using human chondrocytes as a new treatment method, it has not been possible to reconstitute cartilage tissue that can be transplanted intact in vitro. Although it has been possible to reconstitute cartilage tissue without using scaffolds in vitro using a low-speed rotational suspension culture technique, the technique is still somewhat immature histologically. To solve this problem, we attempted to reconstitute mature cartilage tissue in vitro using a high-speed rotational culture technique. As a result, a variety of mature cartilage tissues were reconstituted, ranging from films to masses.

研究分野：小児形成外科

キーワード：軟骨再生 軟骨細胞 回転培養

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

頭蓋・顔面領域の組織変形に対する自家軟骨組織移植には、軟骨採取に伴う高度侵襲や量的制約などの問題がある。新規治療法としてヒト弾性軟骨細胞を用いた再生療法に対する期待が高まっているが、現在まで試験管内において、そのまま一期的に移植することができる軟骨組織を再構成することはできていない。我々は、低速回転浮遊培養技術にて試験管内で足場材料を用いずに軟骨組織を再構成することに成功したが、この軟骨組織の中心は組織学的やや未成熟であった。我々はこの問題を解決するために高速回転培養法を考案し試験管内で成熟軟骨組織を再構成することを試みた。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト軟骨前駆/成熟細胞の分離・培養技術を基盤として、移植前すなわち試験管内において足場材料を用いず 3 次元的なヒト成熟軟骨組織を再構成し、医療応用するための細胞操作技術を開発することを目的とする。

現在まで世界的に臨床応用に耐えうる試験管内で培養された 3 次元的な軟骨組織塊はできておらず 1cm 以上の成熟軟骨組織を再構成することは極めて困難であった。すでにヒト軟骨前駆/成熟細胞を生体内において、低速回転浮遊培養法(L-RWV)にて試験管内で軟骨組織塊ができていたが、この過程において疑似微小重力培養法である L-RWV 法で再構成された培養軟骨組織は一定の硬さを有するものの、大きな成熟軟骨組織を再構成することはできていない。

我々は、軟骨組織は本来、ストレス負荷が必要であるとの考えから、3 次元回転培養法において一定の高速回転を行うと試験管内で一定の硬さを持つ軟骨組織が再生されるのではないかと考えた。

本研究の目的は、ヒト軟骨前駆/成熟細胞由来のヒト軟骨組織を再構成するために高速回転培養法の細胞操作基盤技術を開発することである。

3. 研究の方法

(1) “ヒト軟骨前駆/成熟細胞”を用いた 3 次元高速回転培養法(H-RWV:High speed- Rotating wall Vessel Bioreactor)の開発

L-RWV 法と H-RWV 法は、全く別の基盤技術である。L-RWV 法は一般的に疑似微小重力培養と呼ばれ、細胞にかかる G は 0.01g 以下である。一方、H-RWV 法の至適回転数はまだ未確定であり、回転数に関する検討を行う。また、高速回転時には大きな熱量が発生しインキュベーター内の温度も上昇しかつ、培地にも変化を及ぼすと推測される。インキュベーター内の温度調節の確認など ECPC の生存環境を整える必要があり、それら諸条件の検討を行う。

(2) H-RWV により作製されたヒト軟骨前駆/成熟細胞由来軟骨組織の組織学的検討

(3) H-RWV により作製されたヒト軟骨前駆/成熟細胞由来軟骨組織の重症免疫不全ラットへの移植

試験管内で拡大培養した後に、再構築された培養軟骨組織をヌードラット(F3 4 4/NJcl-rnu/rnu)の膝に移植し、その後の軟骨組織の性状を分析する。

4. 研究成果

(1) “ヒト軟骨前駆/成熟細胞”を用いた 3 次元高速回転培養法(H-RWV)の開発

市販の低速回転浮遊培養法に用いられる装置を改良し、100rpm を達成した。

高速回転時の熱量も抑えられ、インキュベーター内の温度も上昇することなく、順調に培養ができていた。

さらに効率よく、かつ形状の異なる軟骨組織を再構成するために、H-RWV 用細胞容器を開発した(図 1)。この容器はフィルム状から塊まで様々な形状の軟骨組織を再構成することができた(図 2)。

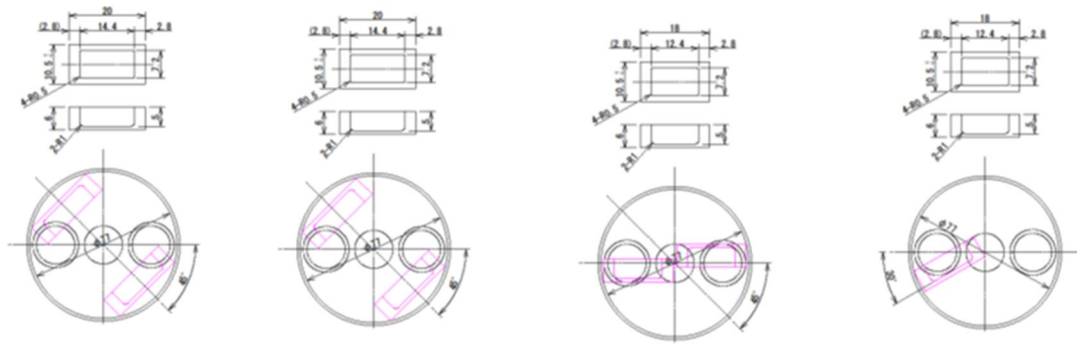


図1 H-RWV 用に開発された様々な新規軟骨培養容器

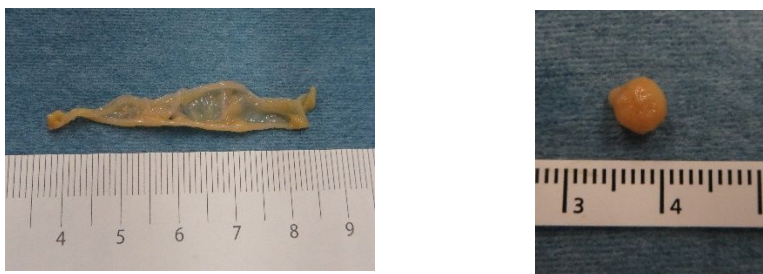


図2 H-RWV 用に開発された様々な新規軟骨培養容器から再構成されたフィルム状から塊まで様々な形状の軟骨組織

(2) “ H-RWV により作製されたヒト軟骨前駆/成熟細胞由来軟骨組織の組織学的検討

H-RWV を用いて安定的に軟骨フィルム・塊を再構成することができた。すでに再構築された軟骨組織の組織学的検討を行ったところ、組織の中心部を含めてアルシアンブルー染色陽性を示す軟骨組織が再構成されたことを確認した（図3）

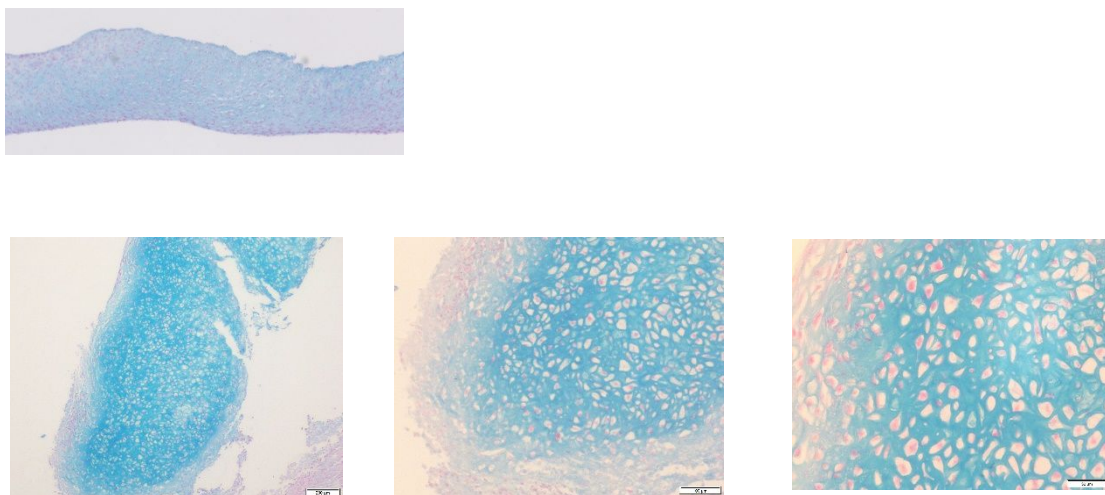


図3 軟骨組織のアルシアンブルー染色

上：軟骨フィルム 中心まで全て染まっている。下：軟骨塊 中心まで全て染まっている。
（左からX4,X10,X20）

(3) H-RWV により作製されたヒト軟骨前駆/成熟細胞由来軟骨組織の重症免疫不全ラットへの移植

膝関節軟骨を除去した群をコントロールとして、移植群は膝関節軟骨を除去した後に、再構成された軟骨フィルムを膝関節に縫合固定して移植した。移植 2 か月後に膝関節の可動性を確認した結果、コントロール群は全く可動性がなかったが、移植群は 20-30° の可動性を得ていた。今後、組織学的検討を行う予定である (図 4)。



図 4 膝関節軟骨を除去した後に、再構成された軟骨フィルムを膝関節に縫合固定して移植したところ

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	鍵本 慎太郎 (kagimoto sintarou) (10737480)	横浜市立大学・附属市民総合医療センター・助教 (22701)	
研究分担者	矢吹 雄一郎 (yabuki yuitirou) (30610357)	横浜市立大学・医学研究科・客員講師 (22701)	
研究分担者	小林 眞司 (kobayashi shinji) (90464536)	地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター(臨床研究所)・臨床研究所・部長 (82729)	
研究分担者	林 礼人 (hayashi akito) (10365645)	横浜市立大学・医学研究科・教授 (22701)	

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