

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592650

研究課題名(和文) ヒト耳介軟骨前駆細胞と自己血清を用いた3次元形態を有する軟骨再生療法の開発

研究課題名(英文) The development of 3D cartilage regeneration therapy using the human auricular cartilage progenitor cells with autologous serum.

研究代表者

小林 眞司 (KOBAYASHI, Shinji)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・客員准教授

研究者番号：90464536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：頭蓋・顔面領域の組織変形に対して再生医療への期待が高まっているが、長期的な形態保持性などに未解決課題がある。我々は、これら諸問題を解決するために“ヒト弾性軟骨前駆細胞”を同定し、軟骨を再生することに成功した。我々の目的は、本細胞の培養技術を基盤として、3次元的なヒト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である。具体的には、(1)“ヒト弾性軟骨前駆細胞”の特性解析の推進(2)生体内での再生軟骨の評価(3)3次元形態を有する軟骨の再構築(4)自己血清培養法の開発である。

研究成果の概要(英文)：We have succeeded in isolating Human cartilage progenitor cells (hCPCs) and regenerating cartilage derived from them. The hCPCs which were isolated from auricular perichondrium had not only high proliferative and multipotent capacity that human chondrocytes (hCs) did not have, but had same cartilage extracellular matrix capacity as hCs. Our purpose is to develop handling skill that could apply hCPCs in clinical setting on the basis of their culture technique. Specifically, there are (1) Implementation of hCPCs characterization (2) Evaluation of regenerated cartilage in vivo (3) The development of 3D cartilage regeneration derived from hCPCs (4) The development of autologous serum technique.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：軟骨前駆細胞 軟骨再生 軟骨膜細胞 軟骨膜

1. 研究開始当初の背景

頭蓋・顎・顔面領域の先天奇形や外傷に起因する組織変形に対する新しい治療法の開発は、重要な臨床的解決課題である。現在の標準的な治療法は、自家軟骨/骨組織を移植する方法や合成高分子化合物などの医用材料を移植する方法である。しかし、自己組織移植では、採取量の制限と採取部位の侵襲があり、医用材料では、感染や炎症の問題がある。このような問題点に対する新しい治療法として、組織再生工学を用いたヒト弾性軟骨の臨床的再構築法の開発が切望されている。ヒト耳介軟骨細胞は良好な基質産生能などの優位性を有するものの、採取部位への侵襲に加え、自己複製能を有する幹細胞が存在しないために細胞寿命に起因する長期的な組織維持の困難性の問題点がある。骨髄由来のヒト間葉系幹細胞は、これらの問題を解決できる可能性を持つ細胞の一つであるが、骨髄穿刺の侵襲が大きいこと、成熟軟骨細胞への分化能が極めて低いこと、血管侵入や石灰沈着をきたすことなどの様々な問題がある。他にも脂肪組織由来のヒト間葉系幹細胞など候補となる細胞は存在するものの、いずれも成熟軟骨細胞への分化能力が低くヒト弾性軟骨の再構築法に応用可能な優れた細胞源は見いだされていないのが現状である。

我々は、これら従来の軟骨移植の問題点を解決するためにヒト耳介軟骨前駆細胞に着目した。我々はすでに、ヒト耳介軟骨膜から極めて高い増殖能と多分化能を有する軟骨前駆細胞を分離・培養することに成功している。本細胞を用いることにより、長期形態維持性に優れた軟骨再生が可能となることが期待される。一方で、臨床応用の際に、培養に際して使用する血清の問題や再構築し移植した細胞群・組織の長期結果に関する検討が必須である。

2. 研究の目的

本研究では、このヒト軟骨前駆細胞の分離・培養技術を基盤として、3次元的なヒト軟骨組織を

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試みる。すなわち、分離したヒト軟骨前駆細胞の操作技術を検討し、臨床応用の可能な優れた弾性軟骨再構築法の開発を行うために、生体内におけるヒト軟骨前駆細胞由来再生軟骨の免疫不全マウスへの移植による再生軟骨の評価を行う。さらに新規に開発した生分解性足場材料がヒト弾性軟骨の再構築に有用か否かを検討する。さらに、ヒト耳介軟骨膜細胞を臨床応用するにあたって、他種血清を使うことによって生じる感染症や免疫反応の問題を考慮し、自家血清を用いた培養法の検証を行う。

3. 研究の方法

(1) “ヒト弾性軟骨前駆細胞”の特性解析の推進

① ヒト軟骨前駆細胞の分離・培養

小耳症患者より、手術の際に余剰となる残存耳介弾性軟骨を供与頂き研究を遂行した。軟骨膜部を分離し、組織を細切後、細胞を分取した。各組織の細胞懸濁液は 100 μ m ナイロンメッシュで濾過し、PBS による洗浄を3度行った。細胞懸濁液は、37 $^{\circ}$ C、CO₂ 5%に設定したインキュベータで 10% fetal bovine serum, 1% Antibiotic Antimycotic Solution を含有する Dulbecco's modified Eagle medium and Ham's F-12 medium を含む増殖培地により培養を行った。

② 多分化能解析

多分化能解析に関しては積層化培養法を用いた。各細胞を 2.5 \times 10⁴ cells/cm²の密度で播種し、播種後 48 時間まで増殖培地で培養を行った。5 日間の培養の後、さらに 2.5 \times 10⁴ cells/cm²の細胞を上にも播種し、同様の手順で培養を行うという操作を計 2 回繰り返した。骨および脂肪分化誘導に関しては、以前の報告に準じた。

(2) 生体内での再生軟骨の評価

軟骨分化誘導を行った細胞をその産生基質とともにシリンジに回収し、重症免疫不全マウス

(NOD/SCID)(三協)の背部皮下に 1 ml ずつ移植を行った。移植後、1 か月、3 か月、および 10 か月目に摘出を行い、組織学的に検討した。

(3) 3次元形態を有する軟骨の再構築

軟骨分化誘導を行った細胞をその産生基質とともにシリンジに回収し、Scaffold に細胞を播種した。重症免疫不全マウスの背部皮下に移植を行った。pCol-HAp/ChS (Tokyo Institute of Technology), Collagen sponge, ハイドロキシアパタイトスキャフォールドに計 1ml の細胞浮遊液を添加し、マウスの背部皮下に移植した。移植後、4 週目、12 週及び 40 週目に摘出を行い、組織学的に検討した。

(4) 自己血清培養法の開発

① 自家血清の調製および自家血清含有培地による軟骨膜細胞の初代培養

耳介弾性軟骨を供与いただいた同一患者から血液を採取した。検体のコラゲナーゼ処理で得られた軟骨膜細胞を 10%自家血清含有培地か 10%FBS 含有培地で拡大培養した。その際、細胞数を計測した。また、拡大培養時における軟骨膜細胞の形態を定性的に比較検討した。

② 血清濃度における増殖能の評価

各培養条件における軟骨膜細胞の増殖能を定量化するにあたり、MTT assay を施行した。血清の種類は FBS, 自家血清とした。まずは、血清濃度が 10%においても自家血清使用群で十分増殖が得られるかどうかを、FBS 使用群と比較し検討した。播種 24 時間後から 72 時間毎、計 6 点で観察した。次に、至適な自家血清濃度を評価すべく、異なる濃度における増殖能を評価した。培地の血清濃度はそれぞれ 0%, 1%, 5%, 10%とした。観察時点と方法は前述と同様である。

③ 重症免疫不全マウスへの皮下移植実験および組織再構築能の評価

初代培養より 10%FBS 含有培地か 10%自家血清含有培地を用いて増殖させた。重症免疫不全マウスの背部皮下に全量注入した。移植後 4 カ月目に摘出を行い、組織学的に検討した。移

植後 4 ヶ月目に摘出した組織は、H&E 染色、Toluidine Blue 染色 Elastica Van Gieson 染色を行った

4. 研究成果

(1) “ヒト弾性軟骨前駆細胞”の特性解析の推進

① ヒト軟骨前駆細胞の分離・培養

残存耳介軟骨を外科的に摘出後、軟骨膜部、軟骨-軟骨膜移行部、軟骨実質部の三層に分離し、各々から単離した細胞をそれぞれ培養することができた。

② 多分化能解析

軟骨細胞と同様に軟骨膜細胞は軟骨への分化能を認めた(図 1)。さらに、軟骨膜細胞の脂肪および骨分化能の有無を検討した。脂肪分化誘導培地による 3 週間の培養により、軟骨膜細胞は卵円形の形態に変化し、Oil Red O にて染色される脂肪滴を形成することが確認された。また、骨分化誘導培地による 3 週間の培養により、軟骨膜細胞は Alizarin Red S

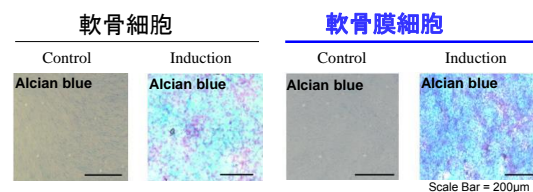


図 1 軟骨細胞と軟骨膜細胞の軟骨分化能解析

にて染色される Ca を多量に産生することが確認された。軟骨細胞でも同様の分化誘導を行ったが、脂肪滴形成も Ca 沈着も認めなかった。

長期間にわたって、前駆細胞が自己複製により維持されていることを証明するため、継代培養を行った軟骨膜細胞を対象として多分化能の解析を行った。第 3 継代、7 継代、10 継代培養後の各軟骨膜細胞は、細胞化学染色、RT-PCR の結果より何れも軟骨、脂肪、骨への多分化能を維持していたことから、これらの細胞のうち少なくとも一部は自己複製能を有している事が示唆された(図 2)。

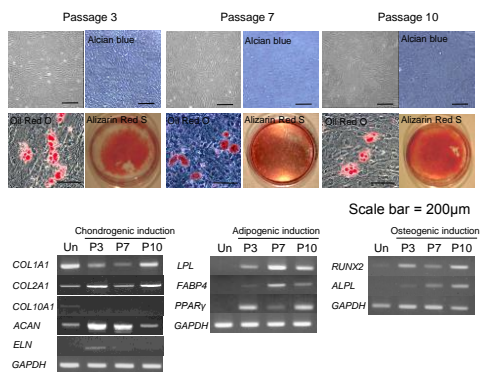


図2 軟骨膜細胞における長期間の多分化能の解析

次に、軟骨膜細胞の軟骨細胞への分化能を定量的に検討するため、リアルタイム PCR を用いた弾性軟骨分化関連遺伝子の発現変化を解析した。弾性軟骨に特徴的な基質である versican(CSPG2), elastin (ELN), alpha 1 type II collagen (COL2A1), fibrillin 1 (FBN1) 遺伝子の発現レベルは、各々4.2 倍, 9.6 倍, 2.1 倍, 17.2 倍に著明に上昇することが確認された。一方、軟骨膜部に特徴的な alpha 1 type I collagen(COL1A1)の発現は 0.18 倍に低下した。

(2) 生体内での再生軟骨の評価

ヒト軟骨膜細胞を軟骨分化誘導の後、重症免疫不全マウスの皮下に移植した。組織学的解析から、軟骨膜細胞は、軟骨細胞と同様に *in vivo* で成熟軟骨細胞へと分化し、その産生基質であるプロテオグリカンや弾性線維に富む弾性軟骨組織を再構築することが判明した。一方、免疫組織化学染色からは軟骨膜細胞より再構築された組織においてのみ、Col 2 陽性弾性軟骨組織の周囲を Type I collagen (Col 1)陽性の膜様組織が被覆していることが確認された。長期間に渡って再構築組織が維持されていることを示すため、軟骨膜細胞を移植後 10 ヶ月目に摘出した組織においても同様の解析を行った。摘出組織は Col 1 陽性膜様組織で被覆されており、成熟軟骨細胞とその産生基質から構成される弾性軟骨組織であることが判明した。

(3) 3次元形態を有する軟骨の再構築

ヒト軟骨膜細胞を用いた弾性軟骨組織の再構築に有益な新規スキヤフォールド

(pCol-HAp/ChS)の開発を行い、既存のスキヤフォールドとの比較検討を行った。ヒト軟骨膜細胞を5mm X 5mm X 5mm大のpCol-HAp/ChSに播種した後、重症免疫不全マウスの皮下へ移植した。既存のスキヤフォールドと比較するために、コラーゲンスキヤフォールド(Col)を用いた移植も実施した。移植1ヶ月後、Colを用いた移植では、スキヤフォールド全域への細胞浸潤は認められず、組織学的にも基質産生は一部に局限していた。一方、pCol-HAp/ChSを用いた移植では、表面に光沢を持つ軟骨様組織を再構築した。再構築組織の硬さは軟骨硬であり、用手圧迫後もその形態を留める弾力性を有していた。Alcian Blue染色からは、軟骨基質産生を行う成熟軟骨細胞が、スキヤフォールド全域にHomogenousに存在していることが明らかとなった(図3)。組織学的解析により、スキヤフォールド全域に成熟軟骨細胞が存在し、プロテオグリカン、弾性線維の産生が認められた。

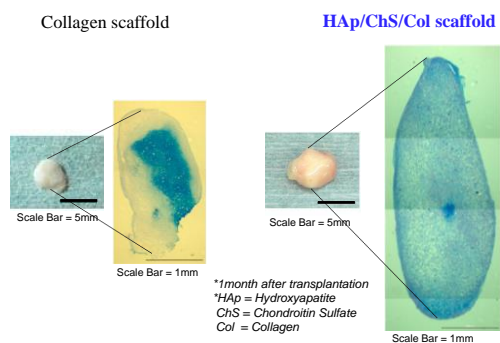


図3 3次元形態を有する軟骨の再構築

(4) 自己血清培養法の開発

① 自家血清の調製および自家血清含有培地による軟骨膜細胞の初代培養

10%自家血清含有培地を用いた培養法では、定着した細胞群は速やかに増殖し、FBS 使用群と同等の増殖を見せた。継代し、セルカウントを行ったところ、各群とも細胞数に大きな差が無いことを確認した。

② 血清濃度における増殖能の評価

10%自家血清含有培地使用群の方において増殖効率が高い傾向を認めた。細胞倍加時間を算出したところ、10%自家血清使用群は 69.8 ± 12.0 [hr], 10%FBS 使用群は 115.1 ± 49.8 [hr] ($p=0.088$, NS, Mann-Whitney U test)であった。次に、自家血清使用群において、含有自家血清濃度と増殖効率の相関性を評価した。その結果、10%自家血清を含有する培地において細胞倍加時間が最も短いことが明らかとなった。FBS 使用群において、含有 FBS 血清濃度と増殖効率の相関性を評価した。その結果、10% FBS を含有する培地において細胞倍加時間が最も短いことが明らかとなった(図 4)。

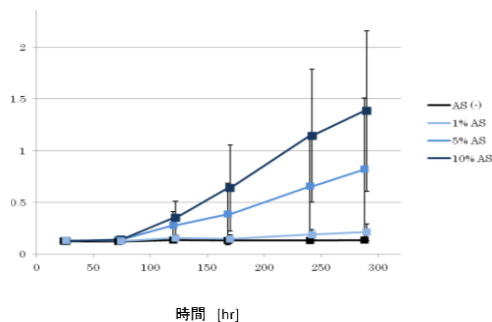
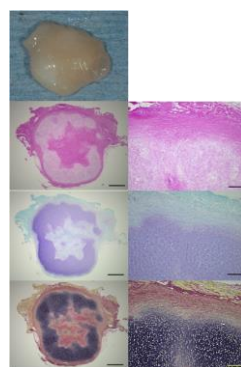


図 4 異なる自家血清濃度における軟骨膜細胞の増殖能の評価(n=3) 異なる自家血清濃度での軟骨膜細胞の増殖能の比較

③ 重症免疫不全マウスへの皮下移植実験および組織再構築能の評価

移植した細胞数はそれぞれ約 $1.5 \sim 3.0 \times 10^6$, 移植時は細胞がディッシュ内で産生した基質を含めた状態で約 1ml であった。得られた検体は、各群とも白色調、弾性硬であり、肉眼的には大きな差は認めなかった。Toluidine blue 染色で紫染されるプロテオグリカンの存在が確認された。加えて、Elastica van Gieson 染色で黒色に染色される弾性線維の存在が豊富に確認された。以上より再構築された組織は弾性軟骨組織と判断された。加えて、H E 染色において、軟骨膜様の線維性組織が軟骨組織周囲に存在することが確認された。その厚さは、軟骨細胞を移植した群と比較し厚い傾向にあった(図 5)。



a: 肉眼所見 $5 \times 4 \times 1.5$ mm b: Hematoxylin & Eosin 染色, c: Hematoxylin & Eosin 染色, d: Toluidine blue 染色, e: Toluidine blue 染色, e: Elastica van Gieson 染色, f: Elastica van Gieson 染色,

図 5 10%自家血清含有培地で増殖させた軟骨膜細胞の皮下移植実験

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 6 件)

- ① M Mizuno, T Takebe, S Kobayashi, Shintarou Kimura, M Masutani, S Lee, YH Jo, J Ik Lee, H Taniguchi. Elastic cartilage reconstruction by transplantation of cultured hyaline cartilage-derived chondrocytes. Transplant Proc,46(4):1217-21,2014 査読有
- ② M Mizuno, S Kobayashi, T Takebe, H Kan, Y Yabuki, T Matsuzaki, H Y. Yoshikawa, S Nakabayashi, J,I Lee, J Maegawa, H Taniguchi. Reconstruction of joint hyaline cartilage by autologous progenitor cells derived from ear elastic cartilage. Stem Cells, 32(3):816-21, 2014 査読有
- ③ T Takebe, S Kobayashi H Kan, Hiromu Suzuki, M Mizuno, Y Yabuki, T Adegawa, T Yoshioka, J Tanaka, J Maegawa, H Taniguchi. Human elastic cartilage engineering from cartilage progenitor cells using rotating wall vessel bioreactor. Transplantation Proceedings. 44(4): 1158-61,2012 査読有
- ④ S Kobayashi, T Takebe, M Mizuno, J Maegawa, H Taniguchi Presence of cartilage stem/progenitor cells in adult mice auricular

- perichondrium PLoS ONE 2011 6(10): e26393. 査読有
- ⑤ S Kobayashi, T Takebe, M Inui, S Iwai, H Kan, Y Zheng, J Maegawa, H Taniguchi Reconstruction of human elastic cartilage by a CD44⁺CD90⁺stem cell in the ear perichondrium. Proc Natl Acad Sci USA, 108 (35): 14479-14484,2011 査読有
- ⑥ 小林眞司、谷口英樹 軟骨再生医療:こどもの心をいやす医療に向けて 最新のコーゲンサイエンスー生物多様性が促進するバイオ新素材の変革ー BIO INDUSTRY シーエムシー出版 BIO INDUSTRY Vol 18 No11 32-37,2011 査読無
〔学会発表〕(計 7 件)
- ① 矢吹雄一郎、小林眞司、水野 満、廣富 浩一、安村 和則、武部 貴則、前川二郎、谷口英樹 ヒト耳介軟骨幹/前駆細胞における自家血清培養法の検証 第 21 回形成外科学会基礎学術集会 2012.10.4-5 福島
- ② 武部貴則、小林眞司、矢吹雄一郎、鈴木啓、水野満、安村和正、広富浩一、鄭允文、前川二郎、谷口英樹ヒト耳介軟骨膜由来幹/前駆細胞を用いた弾性軟骨再構築法の開発 第 11 回日本再生医療学会 1.12-14,2012 横浜
- ③ Suzuki H, Kobayashi S, Takebe T, Mizuno M, Murata S, Yabuki Y, Hirotoimi K, Yasumura K, Maegawa J, Taniguchi H: Reconstruction of human elastic cartilage by progenitor cells in the ear perichondrium. International Society for Stem Cell Research 10th annual meeting. Yokohama,Japan, Jun 13-16,2012
- ④ Mizuno M, Kobayashi S Takebe T, Suzuki H, Murata S, Yabuki Y, Hirotoimi K, Yasumura K, Maegawa J, Taniguchi H: Reconstitution of Articular(joint) cartilage defects by auricle(ear) derived stem/ progenitor cells. International Society for Stem Cell Research 10th annual meeting. Yokohama,Japan, Jun 13-16,2012
- ⑤ 小林眞司、武部貴則、水野 満、鈴木 啓、矢吹雄一郎、鄭 允文、前川二郎、谷口英樹 ヒト弾性軟骨膜細胞由来の再生軟骨を構成する軟骨膜の特性解析 第20回日本形成外科学会基礎学術集会 10.6-7,2011 東京
- ⑥ Suzuki H, Kobayashi S, Takebe T, Mizuno M, Yabuki Y, Yasumura K, Murata S, Maegawa J, Taniguchi H:Identification and utilization of human cartilage stem cells from the ear. The 12th Congress of the Asian Society of Transplantation Sep.25-28,2011 Seoul, Korea
- ⑦ 水野満、小林眞司、武部貴則、鈴木啓、村田駿介、矢吹雄一郎、安村和則、前川二郎、谷口英樹 イヌ耳介由来軟骨幹/前駆細胞を用いた関節軟骨再生療法の開発 第 152 回日本獣医学会学術集会、大阪.9.19-21, 2011
〔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
小林眞司 (KOBAYASHI Shinji)
横浜市立大学・医学研究科・客員准教授
研究者番号:90464536
- (2) 研究分担者
前川二郎 (MAEGAWA Jirou)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号:70244449
谷口英樹 (TANIGUCHI Hideki)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号:70292555
- (3) 連携研究者 該当なし