

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32643

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2015

課題番号：24659790

研究課題名(和文)既存血管系再構築による大型臓器再生法の開発

研究課題名(英文)A new strategy of tissue-engineered chondrogenesis: Utilization of vascularized perichondrium for chondrogenic remodeling

研究代表者

権太 浩一 (Gonda, Koichi)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：50254925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨再生治療での軟骨細胞採取源には、耳介軟骨、肋軟骨、肋軟骨膜がある。我々は小耳症手術で余剰となったこれら3種の組織から軟骨細胞を採取し、各々の細胞収量、細胞増殖能、軟骨再生能を測定して比較した。組織単位重量当りからの細胞収量は肋軟骨膜が最大で、最低だった肋軟骨と比較すると10倍以上の差があった。細胞増殖能はどの採取源も同程度に高く、ヌードマウス皮下に移植した場合の軟骨再生能も同程度だった。これらの結果から考えられる軟骨再生の最も効率的な戦略は、軟骨実質は耳介軟骨・肋軟骨由来の細胞から再生し、その再生軟骨に血行を持つ軟骨膜を付着させて再生軟骨がリモデリングされるようにする、というものである。

研究成果の概要(英文)：Putative sources of human chondrocyte include auricular cartilage, costal cartilage and costal perichondrium. We harvested chondrocytes separately from these three sources in microtia patients and compared their cell yield, proliferative capacities and chondrogenic potentials. The largest number of chondrocyte was isolated from costal perichondrium, whereas costal cartilage produced the least, with the difference being the order of magnitude. Proliferative capacities were similarly high between these three sources of chondrocytes. They showed similar level of chondrogenic potentials in vivo, when implanted into nude mice. Based on these results, we here propose a refined strategy of therapeutic cartilage regeneration, where the cartilage matrix should be reconstituted as space-occupying and/or supporting substance by cell therapy and vascularized perichondrium should be attached to the matrix as a longstanding supply source of chondrocyte to enable the regenerated cartilage to remodel.

研究分野：形成外科学

キーワード：再生医療 臓器再生 軟骨再生 血管新生 軟骨リモデリング

1. 研究開始当初の背景

人体組織・臓器の再生治療における最も重要な材料は、細胞である。再生治療用の細胞の供給源としては、自家幹細胞と同種幹細胞が考えられるが、自家細胞には収量の問題が、また同種細胞には免疫拒絶の問題が立ちはだかっている。一方自家組織由来の iPS 細胞は、収量と免疫拒絶の問題を共にクリアできる解となりうるため、現時点では少なくとも原理的には、再生治療における細胞供給の問題は解決のめどが立ったと言える。一方で、現時点で実際に臨床応用が計画されている再生治療は、網膜黄班変性症に対する網膜色素細胞層や、心不全に対する心筋シートなど、組織液の拡散のみで栄養されるような薄い組織の再生・移植だけである。その理由は、組織液拡散のみでは栄養されない数十 μm 以上の厚みを持つ組織・臓器の再生には、血流を再生組織のすみずみまで行き渡らせるための血管系の再構築が必須であり、現在までのところ十分な血管系を再構築できるための血管新生治療法は開発されていないからである。したがって、ある程度の厚みや大きさを持った組織や固形臓器の再生には、再生組織を灌流する血管系の再生が必須となる。

2. 研究の目的

われわれは、厚みを持った組織や固形臓器の再生を可能とするためには血管系の再構築が必要であると考え、そのための方策として既存の血管網を利用して組織・臓器の再生を図る、という戦略の有効性を調べることにした。再生組織・臓器としては、軟骨組織および肝臓を取り上げ、この戦略でどの程度のサイズの組織が再生できるのかを検定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 小耳症患者に対する肋軟骨移植手術の際に余剰となった組織（肋軟骨、肋軟骨膜、および小耳症に罹患して切除された耳介軟骨）から、コラゲナーゼを用いた酵素法でヒト軟骨細胞あるいは軟骨前駆細胞を採取した。採取細胞は培養ディッシュ上に播種し、各々の細胞ラインの増殖速度に応じて継代し、継代時に細胞数を計測して収量を計算した。継代と継代の日数と細胞数から、細胞増殖能の指標としての細胞

数倍加時間を算出した。また、ヌードマウスの鼠径部脂肪組織内の血管網を顕微鏡下に剥離して単離し、採取された細胞を培養皿から物理的に剥離して、細胞シート形で血管網内に移植した。移植 2 週間後にマウス鼠径部に再生された軟骨組織を摘出して、組織学的に検索した。

(2) SD ラットの肝臓を採取して酵素法で分解し、培養ディッシュ上に播種して初代培養幹細胞シートを作成した。これを、培養皿から物理的に剥離して細胞シート形で、ヌードマウス鼠径部の剥離血管網内と、ヌードマウスの大網の血管網に包んで移植した。細胞シート移植 2 週間後に再生組織を摘出し、組織学的に検索した。

4. 研究成果

(1) 3 種類の軟骨細胞採取源からの細胞収量の比較

組織単位重量当りからのヒト軟骨（前駆）細胞の収量は、肋軟骨からが最も高く、最も少なかった肋軟骨と比較すると、平均して 10 倍以上の差があった（図 1）。

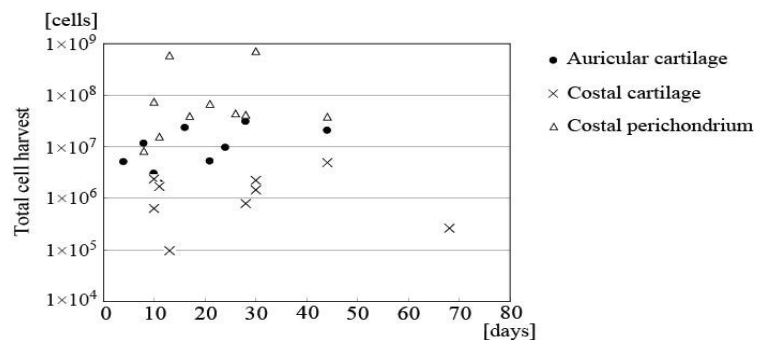


図 1 3 種類の細胞採取源からの細胞収量（ドットチャート）

(2) 3 種類の軟骨細胞採取源からの細胞の増殖能の比較

各細胞採取源からのヒト軟骨（前駆）細胞の倍加時間は、互いに有意差はなく、いずれも高い増殖能を持つことが示された（図 2）。

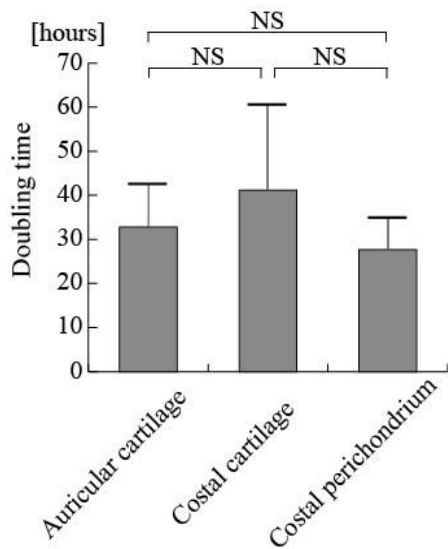


図 2 3 種類の軟骨細胞採取源からの細胞の増殖能

(3) 3 種類の軟骨細胞採取源からの細胞の軟骨再生能の比較

各細胞採取源からのヒト軟骨（前駆）細胞を、細胞シートの形でヌードマウス鼠径部の脂肪組織血管網内へ移植して再生された軟骨組織の体積は、互いに有意差はなく、いずれの採取源からの細胞も軟骨再生能を持つことが示された（図 3）。

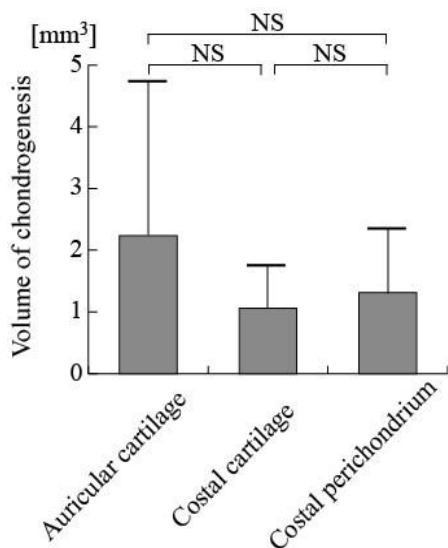


図 3 3 種類の軟骨細胞採取源からの細胞の軟骨再生能（再生軟骨体積）

(4) SD ラット肝細胞シート移植による肝組織再生

ヌードマウス鼠径部脂肪組織血管網内への移植により、類洞を伴う肝組織が皮下に形成された。一方、ヌードマウス大網内への移植でも肝組織が形成されたが、細胞のレシピエント動物は、移植後 2 週間までに全例死亡した（図 3a、3b）。

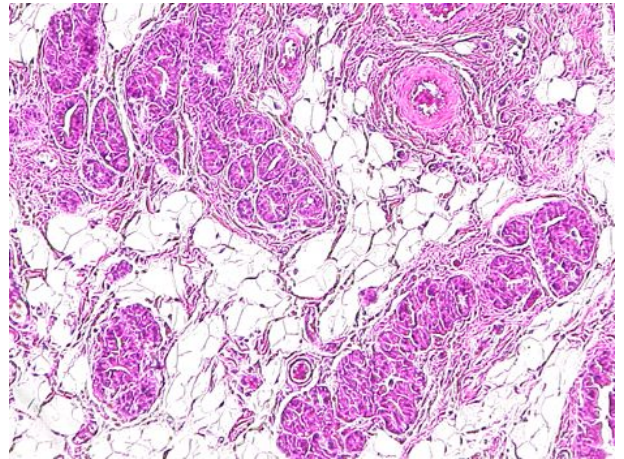


図 3a ヌードマウス鼠径部脂肪組織血管網内へのラット肝細胞シート移植：組織所見

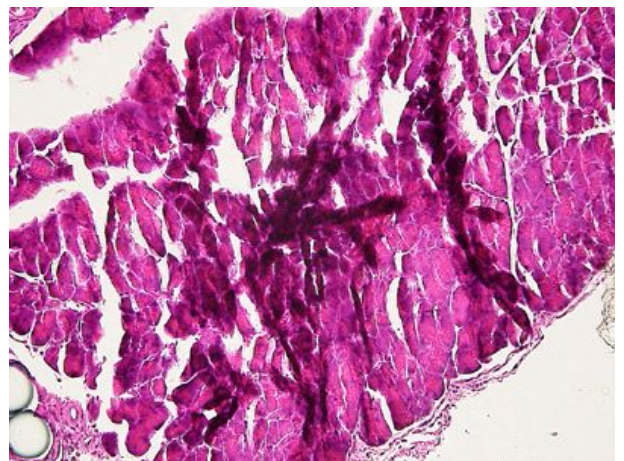


図 3b ヌードマウス大網内へのラット肝細胞シート移植：組織所見

(5) 考察

今回の実験結果から、マウス鼠径部脂肪組織血管網内へのヒト軟骨（前駆）細胞のシート移植により、軟骨組織が効率的に再生可能であるこ

とがわかった。一方、マウス鼠径部脂肪組織血管網内へのラット肝細胞シートの移植により、肝組織が再生されることがわかったが、同様に豊富な血管網を持つ大網内への肝細胞シートの移植では、肝組織が再生されたもののレシピエント動物は死亡した。恐らく、腹腔内で再生した肝組織から排出される胆汁が、腸管内に排泄されることなく腹腔内に排出され、腹膜炎で死亡したという可能性が考えられる。単に組織の再生だけでは、失われた機能の回復・レシピエント個体の病状改善に必ずしもつながらないということが、改めて示されたものと考えられる。皮下での肝組織再生においても、生成される胆汁の排出経路の確保など、異所性に肝組織を再生する場合の問題点があり、肝再生研究における今後の課題だと考えられる。軟骨再生に関しては、ヒトの耳介軟骨、肋軟骨、肋軟骨膜から得られた軟骨（前駆）細胞は、増殖能、生体内での軟骨組織再生能の採取部位による差はなかったが、組織単位重量当りの細胞収量は肋軟骨膜からが最も多かった。つまり、軟骨膜には軟骨前駆細胞が豊富に含まれていることが示唆される。既存血管網を利用して厚みのある軟骨組織を再生することができるという知見の他に、この結果から、耳介軟骨・肋軟骨に由来する軟骨（前駆）細胞から軟骨実質組織を再生する際に、血行のある軟骨膜に接した部位に再生させることにより、再生軟骨がリモデリングされて経時的な吸収を受けずに、永続的に維持される軟骨組織を再生できる可能性があることが示され、自家軟骨由来細胞による軟骨組織再生戦略として、軟骨膜を利用するという選択肢が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計4件）

権太浩一、五来克也．顔面神経麻痺における眼瞼部病態の基本病態単位への分解、およびそれに基づく顔面神経麻痺各評価法における眼周囲評価項目の妥当性の検討．*Facial Nerve Research*、査読有、Vol.35、2015、pp.77-80.

権太浩一．希有な症例の評価と治療～Bell麻痺後前頭筋・眼輪筋過緊張例から考える顔面神経不全麻痺の疾患分類について．*Facial Nerve Research*、査読有、Vol.34、2014、pp.51-53.

権太浩一、平林慎一．陳旧性顔面神経麻痺を合併した加齢性眼瞼下垂症の治療．*形成外科*、査読有、57巻5号、2014、pp.515-524.

Yamaoka H, Nishizawa S, Matsui M, Gonda K, Hirabayashi S, Hoshi K, Yamaoka K. The in vivo effect of esculetin ointment and esculetin-mixed Zyderm for Zyderm. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 134(1):50e-58e, 2014.

〔学会発表〕（計1件）

権太浩一、五来克也．骨再生：小動物で得られた知見から見通す霊長類での成功のカギ．第24回日本形成外科学会基礎学術集会．2015年10月8日～9日、岩手県・盛岡市．

6. 研究組織

(1) 研究代表者

権太浩一 (GONDA, Koichi)
帝京大学・医学部・教授
研究者番号：50254925

(2) 研究分担者

山岡尚世 (YAMAOKA, Hisayo)
帝京大学・医学部・講師
研究者番号：10444085

平林慎一 (HIRABAYASHI, Shin-ichi)
帝京大学・医学部・教授
研究者番号：60173259

浅野裕子 (ASANO, Yuko)
帝京大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：60626290