

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791911

研究課題名(和文) 生体内環境を模倣した革新的三次元培養技術に基づく軟骨幹/前駆細胞の培養法の検証

研究課題名(英文) Evaluation of culture cartilage stem / progenitor cells based on the innovative three-dimensional culture techniques that mimics the in vivo environment

研究代表者

矢吹 雄一郎 (Yabuki, Yuichiro)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・客員研究員

研究者番号：30610357

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)：供与頂いた軟骨、軟骨膜および血液より軟骨膜由来細胞と血清を生成した。自家血清(AS)含有培地とFBS含有培地で軟骨膜細胞を拡大培養し、その解析を行った。AS使用群とFBS使用群では前者の方が細胞倍加時間が短く、良好な増殖を認めた。ただし、いずれの群も同等に軟骨分化誘導が可能であった。重症免疫不全マウスにおける皮下移植実験では同等の弾性軟骨様組織の再構築を認めた。拡大培養した軟骨膜由来細胞をRWV内へ挿入し三次元培養した。再構築組織を比較検討したところFBS群の方がAS群より大きさ、形状ともに安定的であった。組織学的にはいずれの群においても軟骨様組織の再構築を認めたが、未熟なものであった。

研究成果の概要(英文)：I produced perichondrocytes and serum from the provided perichondrium and blood. The perichondrium cells are culture expanded with autologous serum (AS) containing media and FBS-containing media and subjected to the analysis. The former is shorter cell doubling time in the AS use group and showed good growth. However, any of the group also was able to equally cartilage differentiation. In vivo experiments in severe immunodeficient mice showed the regeneration of the equivalent elastic cartilage-like tissue. The expanded perichondrocytes were inserted three-dimensional culture, RWV. Regenerated tissue is compared, and it was stable in shape in FBS group. But admitted the regenerated cartilage-like tissue in any of the group in the histologically, it was those immature.

研究分野：再生医療

キーワード：軟骨幹/前駆細胞 三次元培養 自家血清 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

形成外科領域では顔面領域の変形や先天性奇形に対して、患者自身の軟骨組織を移植する手術が広く行われている。しかし、移植手術には自家組織の採取が必要であり、それに伴う侵襲が問題となる。組織移植に広く用いられている軟骨組織として肋軟骨が挙げられるが、採取に伴う術後の疼痛や胸部の瘢痕が問題となるばかりでなく、前胸部の変形をきたす症例もある。また、先天性の変形に対する手術は小児期に行われることが多いため、患者へ対する侵襲は相対的に大きく、その負担は計り知れない。

われわれはこれら従来の軟骨移植の問題点を解決するために軟骨幹 / 前駆細胞を利用した、低侵襲で長期形態維持性の高い培養再生軟骨医療の開発を試みた。そして、マウスやヒト耳介軟骨膜中に軟骨幹 / 前駆細胞が存在することを同定した (Kobayashi S, Yabuki Y, et al. *PLoS ONE*. 2011 ;6(10): e26393 / *PNAS*. 2011 ; 108(35): 14479-84)。また、その分離 / 培養法などの基本的な細胞操作法を世界に先駆けて確立している。この細胞群はヒト耳介軟骨膜を耳介後面から小範囲採取するという低侵襲な方法で回収が可能である上に、極めて高い増殖能を有しており、これらを用いることで長期形態維持性に優れた軟骨再生が可能となることが多いに期待される。

また、臨床応用に際して移植 / 再構築組織の形態コントロールに関しても根本的な問題となっている。現在、軟骨分化誘導した軟骨細胞をゲル状の基質を含めて直接皮下に注入する方法 (*Plast Reconstr*

*Surg.* 2006; 117(6): 2019-30) や、それらを一旦腹部皮下に移植し再構築された軟骨様組織を二期的に移植する方法、スキャホールドなど担体に播種したものを直接移植する方法などが開発されている。しかし、いずれも体内で軟骨基質を産生させる方法であり、再生軟骨を安定的に得られない。なぜならば、部位や血行、皮膚緊張などの局所的な要因と、栄養状態や免疫状態など全身的な要因は同一個体内であっても多様であるからだ。そのため、生体外で成熟した軟骨組織を安定的に産出する方法の開発が必要となっている。

## 2. 研究の目的

我々は軟骨幹 / 前駆細胞を用いた低侵襲で長期形態維持性の高い培養再生軟骨医療の開発を試みており、生体外で安定的に再生軟骨組織を得る手法として Rotating Wall Vessel (RWV) を用いた三次元培養法に着目している。RWV を用いると、回転する培養器内に疑似微小重力環境が作成され、細胞同士が接近し細胞塊を形成する。それは重層化培養と同様の効果を生むばかりでなく、三次元で自由度の高い基質産生が期待される。本研究は軟骨幹 / 前駆細胞を利用し、自家血清と三次元培養法を駆使しながら培養再生軟骨を生体外で安定的に得る方法の開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 自家血清含有培地で培養した軟骨膜細胞の特性解析

まず 自家血清含有培地を用いて軟骨膜細胞の初代培養が可能か検証した。その後増殖能の評価として MTT アッセイを行い、細胞倍加時間を測定した。軟骨分化能の評価

として分化誘導後の可溶性グリコサミノグリカン含有量を測定した。組織再構築能を評価するために、重症免疫不全マウスへの皮下移植実験を行った。それぞれ分離培養した軟骨幹/前駆細胞を10%FBS含有培地か10%自家血清含有培地で拡大培養し、軟骨分化誘導をかけた。4週間程度経過したのち、ディッシュに固着した細胞塊をスクレーパーで回収し、NOD/SCIDマウスの背部に注射し皮下移植した。移植後2カ月経過した際、移植検体をサンプリングした。得られた検体はサイズ、湿重量などの一般的項目を計測した後、HE染色と特殊組織染色を施行した。具体的にはプロテオグリカンを評価する目的でToluidine blue染色、Alcian blue染色、Safranin O染色を行った。弾性繊維を評価する目的でElastica van Gieson染色を行った。

## (2)RWVによる再構築組織の解析

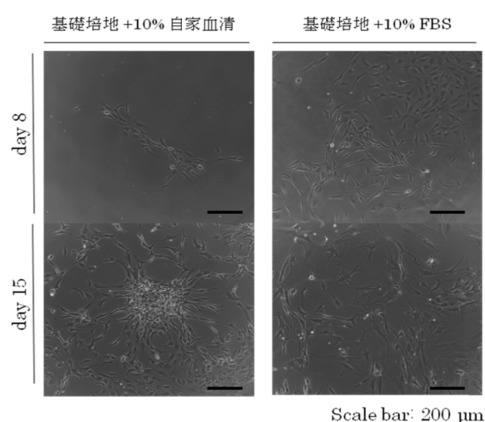
自家血清含有培地を用いて拡大培養した軟骨膜細胞をRWVへ挿入し、分化誘導培地を用いて培養した。FBS含有培地使用群と比較検討した。

## 4. 研究成果

### (1)自家血清含有培地で培養した軟骨膜細胞の特性解析

#### 軟骨膜細胞の初代培養

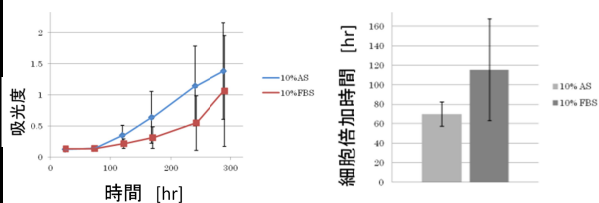
自家血清含有培地を用いて培養した細胞も良好にディッシュ底面へ付着し、良好な増殖を得た。細胞の形態に大きな差は認めなかった。



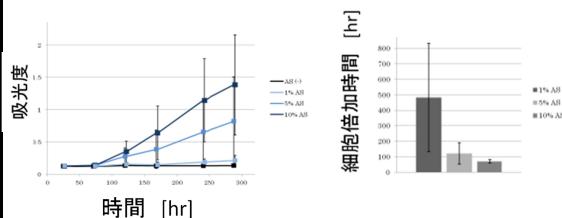
(図1)初代培養時の細胞形態の比較

#### 増殖能の評価

自家血清使用群で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 $69.8 \pm 12.0$  [hr]、10%FBS使用群は $115.1 \pm 49.8$  [hr]であった。そこで、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。



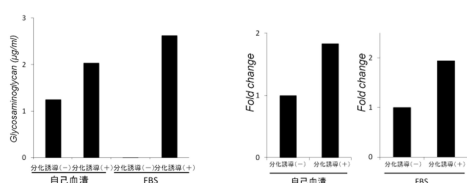
(図2)10%血清含有培地における軟骨膜細胞の増殖能の比較



(図3)各自家血清濃度における軟骨膜細胞の増殖能の比較

### 軟骨分化能の評価

細胞分化の定量化として、ELISAと定量PCRを行った。軟骨分化誘導した培養上清をサンプリングしELISAを施行したところ、自家血清使用群においてもFBS使用群と同等のグリコサミノグリカン量を認めた。また、分化誘導がかかった細胞群を用いてmRNAの定量をしたところ同様の結果が得られた

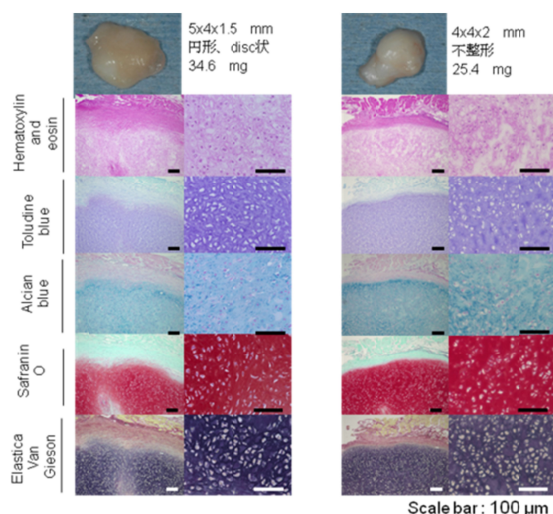


(図4)軟骨分化能の評価

含有グリコサミノグリカンの比較(左)  
アグリカンmRNAの比較(右)

### 組織再構築能の評価

両群ともに約 5mm 大で弾性硬、白色調組織の構築を認めた。形状は円形のものや一部不整形のものが回収された。Toluidine blue 染



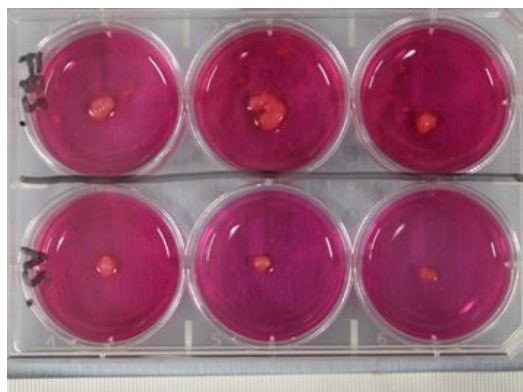
(図5)組織再構築能の評価

自家血清含有培地使用群(左)と  
FBS含有培地使用群(右)

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。加えて、HE 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。

### (2)RWVによる再構築組織の解析

十分に自家血清が得られた症例(n=1)において、拡大培養した軟骨膜由来細胞をRWV内へ挿入し8週の期間において三次元培養したところ、組織の再構築を認めた。再構築された組織を両群で比較検討したところFBS含有培地使用群の方が自家血清含有培地使用群より大きさ、形状ともに安定的であった。組織学的に検証したところ、いずれの群においても軟骨様組織の再構築を認めたが、軟骨組織としては未熟なものであった。



(図6)組織再構築能の評価

FBS含有培地使用群(上段)と  
自家血清含有培地使用群(下段)

### 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計1件)

矢吹雄一郎、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、日本形成外科学会総会基礎学術集会、2012年

10月4日、ホテルリステル猪苗代（福島県耶麻郡猪苗代町）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

矢吹 雄一郎 (YABUKI, Yuichiro)  
横浜市立大学・医学研究科・客員研究員  
研究者番号： 30610357

### (2) 研究協力者

前川 二郎 (MAEGAWA, Jiro)  
小林 眞司 (KOBAYASHI, Shinji)  
武部 貴則 (TAKEBE, Takanori)  
上條 亜紀 (KAMIJO, Aki)  
谷口 英樹 (TANIGUCHI, Hideki)