

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560246

研究課題名(和文)アテロコラーゲン細胞シート複合体による軟骨修復効果

研究課題名(英文)Effects of atelocollagen gel combined with cell sheets on articular cartilage repair

研究代表者

佐藤 正人(SATO, Masato)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：10056335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：アテロコラーゲンゲルは、透明性と強度に優れており、関節軟骨組織修復に重要な液性因子を考慮すると物質透過性に優れている点も有用である。アテロコラーゲンゲルからアセルラーシートを製作し検討した。細胞シートとの接着性並びにハンドリングは良好であった。家兎膝関節軟骨欠損モデルによる関節軟骨の修復・再生効果の検討から、アセルラーシート移植による治療効果への影響及び感染・炎症徴候などの有害事象は認められず安全性が確認され、またTGF- $\beta$ 1の含浸・徐放により治療効果が増強された。関節軟骨の組織修復は、内因性の修復機構を活性化させるだけで軟骨が再生可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Atelocollagen gel has the qualities of strength and transparency as well as permeability that make it suitable as carriers of humoral factors important for articular cartilage repair. Acellular sheets were fabricated from atelocollagen gel and evaluated. They attached well to and improved the handling of chondrocyte sheets. To evaluate articular cartilage repair, acellular sheets were transplanted to a rabbit osteochondral defect model and proved effective to some extent and safe without any indication of adverse events such as infection or inflammation. In a further study, the incorporation and release of TGF- $\beta$ 1 from the acellular sheets further improved the treatment effect. Our results suggest that the regeneration of articular cartilage may be induced by the activation of endogenous repair mechanisms.

研究分野：整形外科、軟骨再生医療

キーワード：関節軟骨修復再生 アテロコラーゲンゲル 細胞シート

## 1. 研究開始当初の背景

変形性膝関節症（OA）は、緩徐に進行する難治性の関節変性疾患であり、極めて罹患率の高い疾病であるが、現在までに根治的な治療法は開発されておらず終末期は人工関節への置換が必要となる。世界的な人口高齢化と共に OA 患者の増加が懸念され、新規治療法の開発が急務である。

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。しかし患者の正常な関節軟骨から採取する方法であるため関節軟骨細胞の採取量制限があり、広範囲の病変は適応外であるなどの限界があった。

軟骨細胞シートによる軟骨修復再生は、動物実験により従来修復困難と考えられてきた OA で見られる関節軟骨部分欠損（軟骨下骨に達しない軟骨内欠損）と軟骨全層欠損（軟骨下骨に達する骨軟骨欠損）の両欠損型で治療効果を認め、細胞シート工学という日本オリジナルな技術により、OA の治療にまで踏み込んだ再生医療の実現を目指し、臨床研究を実施している。

軟骨細胞シートによる軟骨修復作用機序として、シートからの修復細胞自体の供給や成長因子等の液性成分の持続分泌効果が指摘されているが、どちらが主体的に貢献しているかは未だ不明である。アテロコラーゲンゲルから作製したアセルラーシートの特性を活かし、軟骨細胞シートの詳細な作用機序を解明することは、修復再生に必須とされている外因性の細胞補充なしに、内因性の修復機構を活性化させるだけで軟骨が再生可能であることの証明につながるものである。

## 2. 研究の目的

本研究では、既存のアテロコラーゲンゲル内のコラーゲン架橋を修飾し、細胞を含有せ

ず、ハンドリングに優れたアセルラーシートを作製し、家兎疾患動物モデル（膝関節骨軟骨欠損モデル）を用いて関節軟骨の修復・再生効果を確認し、細胞シートの修復機序を解明すること並びにアセルラーシートの将来的な医療材料としての検討を行うため、安全性評価の1つとして関節軟骨並びに関節内周囲組織との接着性及び炎症反応の検討を行った。

## 3. 研究の方法

(1) アセルラーシートの作製と細胞シートの補助材としての有用性

ブタ由来アテロコラーゲンゲルに 100、400、800 (mJ/cm<sup>2</sup>) の UV を照射してコラーゲン架橋を修飾させた架橋構造の異なるアセルラーシートを作製し、UV 強度による軟骨細胞への影響について検討した。アセルラーシート上に軟骨細胞を播種し培養 7 日、14 日における細胞増殖率を確認した。また、細胞シート補助材としての強度の確認のため打ち抜き試験を行った。

さらにアセルラーシート上で細胞シートを積層化させ、アセルラーシートと細胞シートの接着性並びにハンドリングを確認した。

### (2) 細胞シート作用機序の解明

#### ①アセルラーシートの治療効果の検討

日本白色家兎片側大腿骨関節軟骨に軟骨欠損（直径 5mm、深さ 3mm）を作製し、3 群（A 群：非治療群、B 群：細胞シート移植群、C 群：アセルラーシート+細胞シート移植群）に分類した。

欠損部を覆うようにアセルラーシート及び細胞シートを移植した。ブタ由来アテロコラーゲンゲルから作製したアセルラーシート（直径 15mm）を使用した。

12 週後犠牲死させ、軟骨並びに軟骨下骨の組織学的評価（ICRS grading system）を行った。

## ②TGF-β1 含浸アセラーシートの治療効果の検討

日本白色家兎片側大腿骨関節軟骨に軟骨欠損（直径 5mm、深さ 3mm）を作製し、3 群（A 群：非治療群、B 群：アセラーシート移植群、C 群：TGF-β1 含浸アセラーシート移植群）に分類した。

欠損部を覆うようにアセラーシート及び細胞シートを移植した。ブタ由来アテロコラーゲンゲルから作製したアセラーシート（直径 15mm）を使用し、TGF-β1 含浸アセラーシートは、10ng/mL の TGF-β1 に 24 時間 4℃で浸透させ作製した。

12 週後犠牲死させ、軟骨並びに軟骨下骨の組織学的評価（ICRS grading system）を行った。

### (3) アセラーシートの将来的な医療材料としての検討

安全性評価の 1 つとして関節軟骨並びに関節内周囲組織との接着性及び炎症反応について日本白色家兎を用いて検討した。アセラーシート移植部位の周辺組織への癒着状況や炎症所見から、副作用について確認した。

## 4. 研究成果

### (1) アセラーシートの作製と細胞シートの補助材としての有用性

アテロコラーゲンゲルに照射された UV 強度による軟骨細胞への影響の検討では、UV 照射量が多くなるとアセラーシート上での細胞増殖能は明らかに低下した（図 1）。また、アセラーシートは固くもろくなる印象があり、打ち抜き試験では UV 照射が大きくなるとひび割れを認めるものもあった（図 2）。

通常、細胞シートの積層化は、細胞シートの収縮を防ぐために支持膜を使用して行う。アセラーシートに支持膜を使用せず細胞シートを重ね積層化細胞シートを作製する

ことが可能であった。このことから、ハンドリングの向上が期待できた（図 3）。

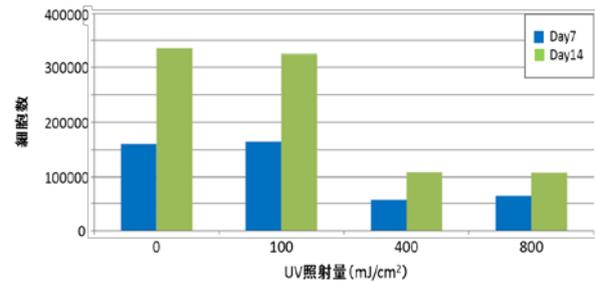


図 1. 細胞増殖率

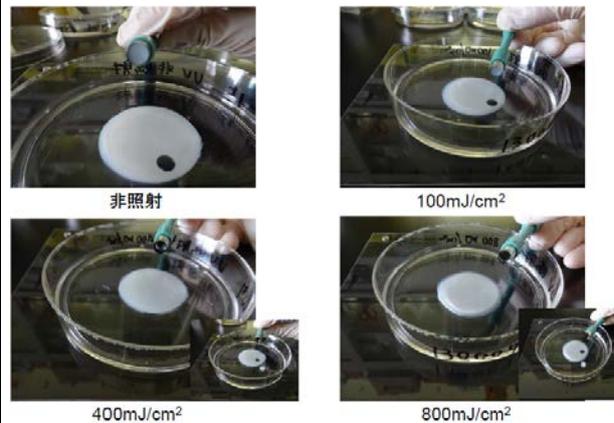


図 2. 打ち抜き試験

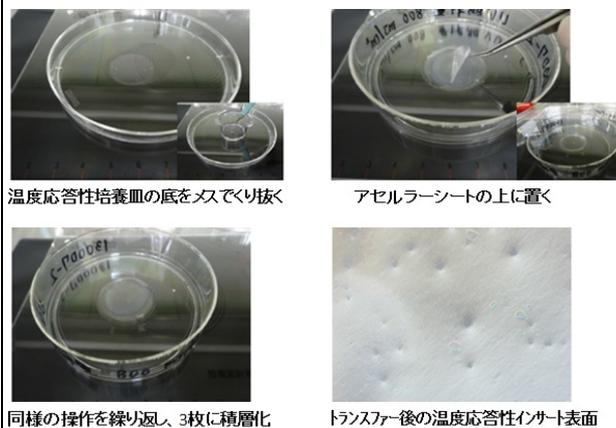


図 3. シートの積層化

### (2) 細胞シート作用機序の解明

#### ①アセラーシートの治療効果の検討

術後 1 週から 4 週における Linton Incapacitance Tester を用いた患肢重量配分比（疼痛評価）は、A 群で 36.3±2.3%から 42.1±1.5%、B 群で 35.6±1.1%から 49.6±0.1%、C 群で 37.7±1.1%から 49.7±0.2%に改善した。術後 12 週における ICRS grading

system を用いた組織学的評価では、A 群は  $16.5 \pm 1.5$ 、B 群は  $35.8 \pm 3.8$ 、C 群は  $38.8 \pm 3.7$  であった (図 4)。患肢重量配分比並びに組織学的評価いずれにおいても B 群、C 群は A 群に比べ有意に ( $p < 0.05$ ) 高値であった。また、B 群と C 群間では、患肢重量配分比並びに組織学的評価はいずれも両群間に有意差は認めなかったことから、アセラーシートが治療効果に影響することはなく、細胞シート単独使用時と同等の治療効果が確認された。

(\*  $p < 0.05$ )

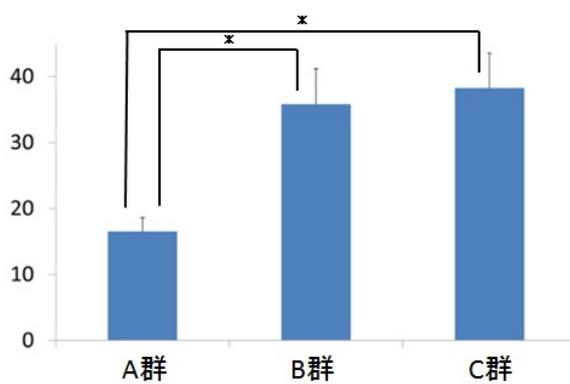


図 4. ICRS grading system による組織学的評価

## ②TGF- $\beta$ 1 含浸アセラーシートの治療効果の検討

術後 1 週から 4 週における Linton Incapacitance Tester を用いた患肢重量配分比は、A 群で  $36.3 \pm 2.3\%$  から  $42.1 \pm 1.5\%$ 、B 群で  $38.9 \pm 0.6\%$  から  $44.2 \pm 0.9\%$ 、C 群で  $37.2 \pm 1.2\%$  から  $46.9 \pm 1.5\%$  に改善した。術後 12 週における組織学的評価の ICRS grading system では A 群は  $15.5 \pm 0.5$ 、B 群は  $23.3 \pm 3.7$ 、C 群は  $30.7 \pm 0.8$  であった (図 5)。患肢重量配分比並びに組織学的評価いずれにおいても A 群、B 群、C 群の 3 群間で有意差 ( $p < 0.05$ ) が認められた。

TGF- $\beta$ 1 は、軟骨組織修復において重要な役割を果たすことが知られている液性因子の一つである。TGF- $\beta$ 1 は軟骨欠損部に一定

濃度維持させることで最も効果を発揮すると言われているが、添加物質を徐放する単体としての機能を持つアセラーシートの特性を活かすことで長期間の徐放を維持できる環境が期待できた。B 群、C 群は共に A 群に比べ修復効果を認めた。C 群は、欠損部表面を被覆したことによる修復効果に TGF- $\beta$ 1 の徐放効果が加わったことで、B 群に比べ組織修復の改善が認められたと考えられる。アセラーシートに TGF- $\beta$ 1 などの液性因子を含浸・徐放させることにより治療効果を増強する可能性が示唆された。

(\*  $p < 0.05$ )

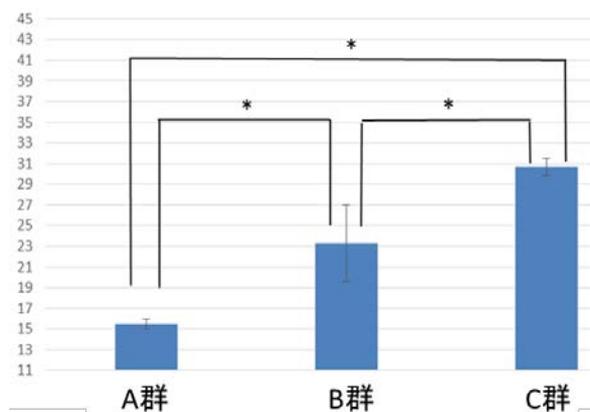


図 5. ICRS grading system による組織学的評価

## (3) アセラーシートの将来的な医療材料としての検討

アテロコラーゲンゲルは、透明性と強度に優れ、関節軟骨組織修復に重要な液性因子を考慮すると、物質透過性に優れている点も有用である。従来の生体分解性のポリマー (PLA や PLLA など) では、炎症反応を遅発性に惹起することが多かった。そこで、カタボリック因子が存在する関節液に暴露された状態でセルラーシートが分解時に炎症反応を惹起しないかどうかを組織学的に検討した。

家兎膝全層欠損モデルを用いたビトリゲルの関節内移植では、ビトリゲルを移植することによる炎症徴候や癒着等は確認されず、

安全性が確認された (図 6)。

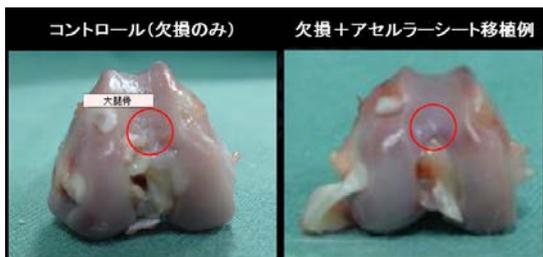


図 6. 炎症徴候・癒着等の有無 (大腿骨)

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Maruki H, Sato M, Takezawa T, Tani Y, Yokoyama M, Takahashi T, Toyoda E, Okada E, Aoki S, Mochida J, Kato Y. Effects of a cell-free method using collagen vitrigel incorporating TGF- $\beta$ 1 on articular cartilage repair in a rabbit osteochondral defect model. 査読有. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. Published online 2017. doi:10.1002/jbm.b.33792. [Epub ahead of print].

[学会発表] (計 7 件)

国際学会

1. Maruki H, Sato M, Takezawa T, Tani Y, Yokoyama M, Takahashi T, Kokubo M, Kawake T, Okada E, Yamato M, Mochida J, Kato Y. Effect of persistent controlled release of transforming growth factor beta 1 using collagen vitrigel on articular cartilage repair. Orthopaedic Research Society 2016 Annual Meeting, Florida, 2016. 3. 5-8.
2. Maruki H, Sato M, Takezawa T, Tani Y, Yokoyama M, Kobayashi M, Kokubo M, Kawake T, Okada E, Mochida J, Kato Y. The effect of using collagen vitrigel containing transforming growth factor beta 1 on articular cartilage repair. Orthopaedic Research Society 2015 Annual Meeting, Las

Vegas, USA, 2015. 3. 28-3. 31.

3. Tani Y, Sato M, Takezawa T, Yokoyama M, Kobayashi M, Toyoda E, Kawake T, Okada E, Mochida J. The effect on articular cartilage repair using collagen vitrigel and chondrocyte sheets. Orthopaedic Research Society 2015 Annual Meeting, Las Vegas, USA, 2015. 3. 28-3. 31.

国内学会

1. 丸木秀行, 佐藤正人, 竹澤俊明, 谷良樹, 横山宗昂, 小林美由希, 小久保舞美, 河毛知子, 岡田恵里, 持田譲治, 加藤義治. TGF- $\beta$ 1 含浸コラーゲンビトリゲルを用いた関節軟骨損傷の治療効果の検討. 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会, 富山国際会議場, 富山, 2015. 10. 22-23.
2. 丸木秀行, 佐藤正人, 竹澤俊明, 谷良樹, 横山宗昂, 小林美由希, 小久保舞美, 河毛知子, 岡田恵里, 持田譲治, 加藤義治. 細胞を用いない TGF- $\beta$ 1 含浸コラーゲンビトリゲルを用いた関節軟骨損傷の治療効果の検討. 第 14 回日本再生医療学会総会, パシフィコ横浜, 横浜, 2015. 3. 19-21.
3. 谷良樹, 佐藤正人, 竹澤俊明, 横山宗昂, 小林美由希, 小久保舞美, 河毛知子, 岡田恵里, 持田譲治. ビトリゲルと細胞シートを用いた移植手技向上を目指した検討. 第 14 回日本再生医療学会総会, パシフィコ横浜, 横浜, 2015. 3. 19-21.
4. 丸木秀行, 佐藤正人, 竹澤俊明, 谷良樹, 横山宗昂, 小林美由希, 小久保舞美, 河毛知子, 岡田恵里, 持田譲治, 加藤義治. 細胞を用いない TGF- $\beta$ 1 含浸コラーゲンビトリゲルを用いた関節軟骨損傷の治療効果の検討. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会, 城山観光ホテル, 鹿児島, 2014. 10. 9-10.
5. 谷良樹, 佐藤正人, 竹澤俊明, 横山宗昂, 小林美由希, 小久保舞美, 河毛知子, 岡田恵里, 持田譲治. Vitrigel と細胞シート

を用いた移植手技向上を目指した検討. 第  
29 回日本整形外科学会基礎学術集会, 城山  
観光ホテル, 鹿児島, 2014. 10. 9-10.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 正人 (SATO, Masato)

東海大学・医学部・教授

研究者番号 : 10056335