

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：10105

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26850198

研究課題名(和文) 関節軟骨再生に対する軟骨膜誘導細胞シートフラップの影響の検討

研究課題名(英文) Effect of perichondrium-induced cell sheet flap on articular cartilage regeneration

研究代表者

都築 直 (TSUZUKI, Nao)

帯広畜産大学・畜産学部・准教授

研究者番号：60725430

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)：本研究は細胞をシート状に加工した、細胞シートによる関節軟骨再生を目指して実施した。しかしながら、研究開始後に明らかとなった問題により計画の大幅な見直しが必要とされた。本研究では明らかとなった課題のうち、関節軟骨損傷部位における活性酸素の産生状況の評価を行い、その結果、関節軟骨損傷部位には活性酸素が発生していることを示すことができた。本研究では関節軟骨再生に対する細胞シートの有効性を示す段階までは至らなかったが、解決すべき問題の一部を明らかにすることができた。今回明らかとなった課題を解決することが、細胞シートの関節軟骨再生への有用性を示す上で必要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：This study aimed at articular cartilage regeneration with a cell sheet, which processed cells into sheets. However, revise of the plan was necessary due to the problem that became clear after the start of the research. Among these proved problems, we evaluated the production of reactive oxygen at the site of articular cartilage injury in this study. As a result, it was showed that reactive oxygen is generated in the site of articular cartilage injury site. Although this study did not reach the stage showing the effectiveness of the cell sheet for articular cartilage regeneration, it was possible to clarify some of the problems to be solved before cell sheet application. It was thought to be necessary to solve the problems clarified from this study in order to show the usefulness of the cell sheet for articular cartilage regeneration.

研究分野：外科学、画像診断学

キーワード：関節軟骨 細胞シート 活性酸素

### 1. 研究開始当初の背景

関節軟骨疾患は獣医療に限らず、ヒトの医療でも大きな問題となっている疾患である。現在のところ、関節軟骨は従来の構成組織である硝子軟骨による再生は難しく、再生組織は再損傷の可能性が高い線維軟骨で置換されると考えられている。このため、硝子軟骨性の組織による再生を引き起こす手技の開発が求められている。そのために、生体組織工学を用いた再生医療の応用が期待されており、各種研究が進められているものの、現在までに完全な硝子軟骨による再生を引き起こしたという報告は存在しない。このことから、現在の生体組織工学の3要素(細胞、成長因子、足場材)では硝子軟骨の再生に必要な条件を満たしていないと考えられる。足りない条件として、細胞同士の接触・細胞にかかる物理的負荷・移植した細胞の周辺環境などが有力な条件として考えられている。

近年、間葉系幹細胞をシート状にした細胞シートの軟骨再生への有効性がマウス等の実験動物において示されている。また、関節軟骨の表層から分泌される PTHrP は関節軟骨の終末分化を抑制し、関節軟骨の形態維持に重要であると考えられている。以上の背景から、細胞シートから関節軟骨表層に類する構造物を作製し移植すれば、硝子軟骨による再生が起こるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

以上の背景から、本研究は細胞シートから関節軟骨表層に類する構造物を作製し、その関節軟骨再生への有効性を検討することを目的とした。

また、細胞シートの知見はマウス等の小型の実験動物における知見が主である。ヒトの骨格に大きさが近いウシにて検討することで、大型動物における細胞シートの移植効果を検討することも目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究は細胞シートの作製が前提条件となるが、細胞シートの作製報告はマウス、ヒトの細胞を用いたものが主であり、ウシの細胞を用いて細胞シートを作製した報告は研究開始時点では存在しなかった。このため、本研究はウシの間葉系幹細胞から細胞シートを作製するのを第一の目標とした。細胞シートの作製はヒトやマウスの細胞シート作製の成功が報告されている温度応答培養皿(UpCell, セルシード社)を用い、間葉系幹細胞は骨髄から分離培養したものをを用いた。

細胞シートが作製可能であった場合は、作製した細胞シートに軟骨分化培地による軟骨誘導を行い、関節軟骨表層と類似した構造物が作製可能か否かを検討することを第二の目標とした。軟骨誘導培地は他の報告を参考

に、通常培地に TGF- $\beta$ 3、アスコルビン酸リン酸エステル、ITS(インスリン、トランスフェリン、ウシ血清の混合物)を添加したものをを用いた。

関節軟骨表層と類似した構造物が作製可能であった場合、これを生体のウシに作製した関節軟骨欠損部位に移植し、その関節軟骨再生に与える影響を評価することを第三の目標とした。関節軟骨欠損はヒトの膝関節と同等の大きさを持つ、ウシの膝関節に対し、10mm 径のドリルにより穿孔することで作製を行う予定であった。

### 4. 研究成果

本研究は細胞シートの作製が前提条件となるが、細胞シートの報告はマウス、ヒトの細胞を用いたものが主であり、ウシの細胞を用いて細胞シートを作製した報告は研究開始時点では存在しなかった。このため、本研究はウシの間葉系幹細胞から細胞シートを作製することを第一の目標とした。

ヒトやマウスの細胞の報告を元に、ウシの間葉系幹細胞から細胞シートの作製を試みたが、作製した細胞シートは強度が低く、培地から剥離した後に形状を維持することは困難であった(縮まってしまふ、破れる等)。培地の条件や培養期間等の検証を行い、細胞シートの強度向上を試みたが、移植に用いることが出来るほどの強度をもった細胞シートの作製には至らなかった。

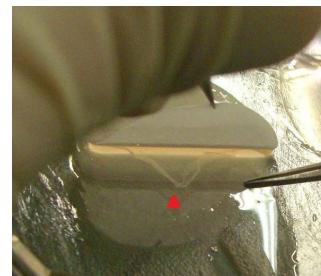


図1 形状を維持できなかった細胞シート

また、培地内では細胞シートの形状を維持していたため、軟骨誘導実施後に強度が向上することを期待して、温度応答培養皿中で細胞シートに対し、軟骨誘導培地による軟骨誘導を実施してみた。その結果、軟骨誘導培地に細胞シートを曝してから数時間程度で細胞シートの形状が崩壊する現象が確認された。

さらに、軟骨誘導培地の試験を実施中にアスコルビン酸リン酸エステルと誤って、アスコルビン酸ナトリウムを添加してしまったことがあった。アスコルビン酸ナトリウムは不安定な物質であり、分解時に活性酸素の発生源となる。アスコルビン酸ナトリウム添加をした場合、培養開始翌日に細胞は全て死滅

する現象が確認された。この現象に遭遇したため、アスコルビン酸ナトリウム添加培地による間葉系幹細胞培養を実施してみたところ、全て培養開始翌日に細胞が死滅することが確認された。このため、間葉系幹細胞は活性酸素に弱く、曝されると死滅すると考えられた。

炎症発生時は、活性化した好中球等から活性酸素が放出すると考えられている。関節軟骨損傷時には、関節軟骨損傷部位に炎症が発生し、関節炎を引き起こす。すなわち、関節軟骨損傷部位には活性酸素の発生が起きていると考えられる。人為的に作製した関節軟骨欠損部位も関節炎が発生する。したがって、実験モデルにおいても関節軟骨欠損部位には活性酸素の発生が起こると考えられる。そのため、細胞シートの移植は困難であると考えられた。

これらの結果から、研究開始後に細胞シートの強度の不足、軟骨誘導をかけた細胞シートの形状維持、活性酸素に対する脆弱性という新たな3つの問題が発生した。これらの解決をすることが生体移植による検討を行う前に必要不可欠であると考えられた。このため、研究計画の大幅な見直しが必要となった。

に関しては、細胞シートを複数重ね、層状とすることで解決できる可能性が他の研究により示され始めていたため、他の課題である活性酸素の評価を先に実施することとした。関節軟骨損傷などの関節炎発生時には、関節液に活性酸素が発生することがヒトで報告されている。そして、その関節液中の活性酸素は関節疾患の増悪因子である可能性が報告されている。しかしながら、ヒトでは健康側からのサンプル採取が不能という理由から、コントロールを設定した報告が少なく、実態は不明なことが多い。

したがって、関節炎発生時における関節液中の活性酸素の評価を実施した。本研究には、ウシと同様の大型動物であり、関節軟骨損傷を好発するウマを用いた。本研究には関節骨折により関節軟骨損傷を発生し、関節炎を発生した19頭のサラブレッド種競走馬を用いた。各馬とも臨床症状、X線検査により片側の骨折であることを確認した。また、その際に、罹患肢は関節炎を発生しているが、健康側では関節炎は発生していないことを確認した。両側の関節から関節液を1ml採取し、骨折を伴う肢を患肢、対側肢を健康肢とした。採取した関節液は測定まで-80の条件で保存した。採取した関節液から、活性酸素の指標である diacron-Reactive Oxygen Metabolites (d-ROMs)、抗酸化物質の指標である Biological Antioxidant Potential (BAP)を測定した。d-ROMs ならびに BAP は平

均±標準偏差で表記し、統計解析には対応のある t 検定を用いた。

d-ROMs は健康肢で  $76.7 \pm 16.3$  U.CARR、患肢で  $87.2 \pm 15.0$  U.CARR を示し、患肢で有意に高値を示した ( $p=0.02$ )。BAP は健康肢で  $2050.0 \pm 377.0$  mmol/l、患肢で  $1661.5 \pm 440.3$  mmol/l を示し、患肢で有意に低値を示した ( $p=0.0002$ )。

d-ROMs は高値であるほど活性酸素の産生が多いとされる値であり、BAP は高値であるほど抗酸化物質が多いとされる値である。本研究では、患肢にて d-ROMs の有意な上昇、BAP の有意な低下が確認された。このため、関節炎発生時は活性酸素が発生し、抗酸化物質が消費されていることが、コントロールを設定した状況で明らかとなった。

この結果から、抗酸化物質の関節内投与等により、活性酸素の除去を行ってから細胞シートの移植を試みる必要があると考えられた。

本研究では関節軟骨再生に対する細胞シートの有効性を示す段階までは至らなかったが、解決すべき問題を一部明らかにすることができた。今回明らかとなった課題を解決することが、細胞シートの有用性を示す上で必要であると考えられた。

## 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 0 件)

2018年5月現在、査読のある英文国際誌に投稿を行っており、審査中である。

[学会発表](計 1 件)

都築直、草野寛一、上林義範 腕節構成骨骨折時の関節液における酸化ストレスの評価 第29回日本ウマ科学会学術集会 2016年

[図書](計 0 件)

該当する事項なし

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

該当する事項なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

該当する事項なし

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等：該当する事項なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

都築 直 (TSUZUKI, Nao)  
帯広畜産大学・畜産学部・准教授  
研究者番号：60725430

##### (2) 研究分担者

該当者なし

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

該当者なし

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

草野 寛一 (KUSANO, Kanichi)  
上林 義範 (Kanbayashi, Yoshinori)