

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04314

研究課題名(和文) 関節軟骨片とmicroRNA・エクソソームを用いた新規関節軟骨治療の開発

研究課題名(英文) Development of articular cartilage repair using minced cartilage and microRNA/exosomes

研究代表者

安達 伸生 (Adachi, Nobuo)

広島大学・医系科学研究科(医)・教授

研究者番号：30294383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 7,600,000円

研究成果の概要(和文)：広範囲軟骨欠損に対して自家培養軟骨細胞移植術(ACI)が行われるが、軟骨細胞を単離・培養するため、2段階手術が必要である。本研究では、細切軟骨片をアテロコラーゲンゲルに包埋し移植する一期的な軟骨修復治療の開発を目的とした。3週間の培養後、細切軟骨片を包埋した群が、単離した軟骨細胞群より、ゲル内に遊走・増殖した細胞が有意に多く、GAGの含有量も多かった。細切軟骨片の培養液には、骨形成や軟骨分化に促進的に働くmicroRNAが多く含まれていた。家兎の大腿骨滑車部に骨軟骨欠損部を作製し、細切軟骨片移植の軟骨修復効果を検討したところ、従来のACIと同等以上に軟骨・軟骨下骨修復が得られていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

広範囲軟骨欠損に対して自家培養軟骨細胞移植術が行われるが、軟骨細胞の単離・培養が必要で2段階手術となる等、様々な問題が存在する。本研究では、細切した軟骨片をアテロコラーゲンゲルに包埋し軟骨欠損部に移植することで、一期的な広範囲軟骨欠損修復が可能であることを証明した。この方法が臨床に応用されれば、低侵襲で短期間かつ有用な治療となり、医療費削減にもつながり、学術的意義だけではなく社会的意義もあるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Autologous chondrocyte implantation has been performed for large cartilage defect, but it requires two-stage surgery for chondrocyte culture. The purpose of this study was to develop a one-stage cartilage repair by atelocollagen gel embedded minced cartilage implantation. After 3 weeks culture, cell migration and proliferation in the gel and GAG contents in minced cartilage group was significantly higher than those in isolated chondrocyte group. The culture medium in the minced cartilage group contained a large amount of microRNAs which promote chondrocyte and osteoblast differentiation. For the large osteochondral defect model of rabbits, atelocollagen embedded minced cartilage implantation achieved excellent cartilage and subchondral bone repair. Atelocollagen embedded minced cartilage implantation will be good treatment option for large cartilage defect as one-step surgery.

研究分野：整形外科、再生医療、関節病学

キーワード：関節軟骨 microRNA エクソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節軟骨は、血管、神経、リンパ管が存在せず、少数の軟骨細胞が、豊富な軟骨基質に囲まれた構造であり、さらに軟骨細胞自身が高度に分化しており、ほとんど増殖しないことから、一度損傷してしまうと通常の修復機能が起きにくい。軟骨損傷を放置すると変形性関節症(OA)へ進行することから早期に関節軟骨を修復することが必要である。1994年、Brittbergらは、大腿骨非荷重部より採取した軟骨細胞を培養・増殖させ、軟骨欠損部へ移植する自家培養軟骨細胞移植術(Autologous Chondrocyte Implantation: ACI)を開発した。我々のグループはこの第1世代のACIを改良し、アテロコラーゲンゲル包埋自家培養軟骨細胞移植術を開発・臨床応用し、2013年より日本で保険適応となった(Ochi M, Adachi N et al. Artif Organs 2004, Adachi N et al. KSSTA 2004, Tohyama H, Adachi N et al. J Orthop Sci 2009, Taakzawa K, Adachi N et al. J Orthop Sci 2012, Kamei G, Adachi N et al. J Orthop Sci 2016)。しかし、この治療法には、正常軟骨組織を400mg採取しなければならない、採取した軟骨組織から軟骨細胞を単離・培養しなければならない、軟骨細胞によっては、増殖能、軟骨基質産生能が低いものがある、軟骨採取と培養した軟骨様組織を移植する2段階手術が必要、4週間培養した軟骨様組織内に十分な軟骨基質が存在していない、軟骨修復のメカニズムが不明といった問題点がある。さらに、この方法は、局所的な軟骨欠損には有用であるが、OAのような広範囲かつ軟骨下骨の状態が悪い例では困難である。このような問題点を解決するため、より軟骨基質を多く含有し、広範囲軟骨欠損に対応可能で、1回の手術で移植できる移植軟骨の作製が必要とされていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、培養を必要とせず、軟骨基質を多く含有した移植軟骨を作製し、一期的手術が可能で軟骨修復法を開発することである。

3. 研究の方法

(1)アテロコラーゲンゲル包埋細切軟骨片の有用性の検討(in vitro)

従来のACIは、採取した正常軟骨片を酵素処置により、軟骨基質を分解して軟骨細胞を単離する。しかし、培養した軟骨様組織で十分量の軟骨基質を再獲得するのは困難である。海外では、3cm²程度の軟骨欠損に対し、minced cartilageをフィブリン糊と共に軟骨欠損に移植する方法が存在しており、比較的良好的な成績が報告されている。本研究では、足場としての機能が非常に期待できるアテロコラーゲンゲルに細切した軟骨片を混入し、より大きな軟骨組織を作製する。

人工膝関節置換術を施行した7名(全例女性、平均年齢79.1歳)から外観上、正常と思われる関節軟骨を採取した。この関節軟骨を1mm³以下の大きさになるようにメスで細切した。IC(isolate chondrocyte)群として、細切した軟骨片をトリプシン、コラーゲナーゼ処理し、軟骨細胞を単離した後、2.0 × 10⁵個の細胞を100 μlのアテロコラーゲンゲルに包埋して培養した。Minced cartilage群は、100 μlのアテロコラーゲンゲルに12.5mgを包埋する群(M1群)、25mgを包埋する群(M2群)を作製した。3週間培養した後、パラフィン切片を作製し、組織学的評価(HE染色、サフラニンO染色、免疫染色)を行った。また、グリコサミノグリカン量を測定した。

日本白色家兔の膝、股関節、肩関節から軟骨を採取し、メスで1mm³以下の大きさになるように細切した。同様にIC群、M1群、M2群を作製し、3週間培養した。培養後、パラフィン切片を作製し、組織学的評価(HE染色、サフラニンO染色、免疫染色)を行った。

(2)軟骨と軟骨下骨における相互作用の解析

軟骨変性の進行に軟骨下骨が重要な役割を担っており、軟骨と軟骨下骨には何らかの情報伝達システムが存在し、互いに影響を与えながら軟骨の恒常性を保っていると考えられる。より正常に近い軟骨組織を作製し、移植すれば、硬化あるいは萎縮した軟骨下骨にも良い影響を与え、また、軟骨下骨からも移植した軟骨組織の成熟による影響を与える因子が分泌されることが考えられる。

ヒトの関節軟骨を用いてIC群、M2群を培養した際の培養液を採取し、small RNAを単離して、Taqman R Array microRNA cardsにて約700種のmiRNAにつき定量評価を行って培地中に存在するmicroRNAの発現を調べた。



図1 アテロコラーゲンゲルに包埋した細切軟骨片

(3)日本白色家兔を用いたアテロコラーゲンゲル包埋細切軟骨片による治療効果の検討

約3.0kgの日本白色家兔の大腿骨滑車部に縦6.0mm x 横4.0mm x 深さ3.0mmの軟骨欠損を作製した。ここに、アテロコラーゲンゲル(atelo)、アテロコラーゲンゲルに軟骨細胞を包埋し3週間培養した軟骨様組織(ACI)、アテロコラーゲンゲル包埋minced cartilage(minced cartilage)を移植し骨膜でパッチした群と、欠損部のみの群を作製した。4週、12週、24週に屠殺した後に、組織学的評価を行った(HE染色、サフラニンO染色、免疫染色)。

4. 研究成果

(1) アテロコラーゲンゲル包埋細切軟骨片の有用性の検討 (in vitro)

ヒトでの検討

IC 群では、ゲル内に細胞がまばらに存在していた。M1、M2 群では、軟骨片だけではなく、細胞もゲル内に多く存在していた。500 μm \times 500 μm の面積に存在する平均細胞数は、IC 群 15.2 個、M1 群 24.9 個、M2 群 35.4 個であり 3 群間に有意差を認めた。軟骨様組織の成熟度の評価法である Bern score は、IC 群 2.3 点、M1 群 3.9 点、M2 群 4.4 点で、3 群間に有意差を認めた。細胞増殖能を評価するために Ki67 の免疫染色を行った。Ki67 陽性細胞率は、IC 群 58.1%、M1 群 89.6%、M2 群 94.9% であり、M1、M2 群が IC 群より有意に高値であった。軟骨特異的に発現する lect1 の免疫染色では、全群に陽性細胞を認めたが、M1、M2 群では特に軟骨片周囲に多く発現していた。TGF も同様に全群で認めたが、M1、M2 群で多く発現していた。型、型コラーゲンの免疫染色を行ったところ、軟骨片は型コラーゲンで染色されていた。グリコサミノグリカン含有量は M2 群で最も多く認めた。

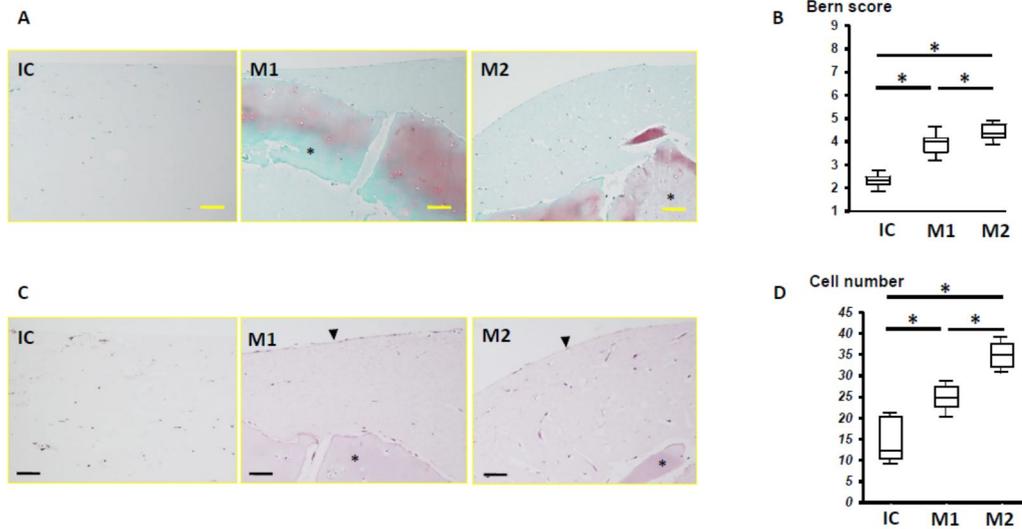


図2 ゲル内への細胞遊走の評価。A：サフランin O 染色 B：Bern スコア C：HE 染色 D：細胞数 *：細切軟骨片 矢頭：表層で増殖している軟骨細胞

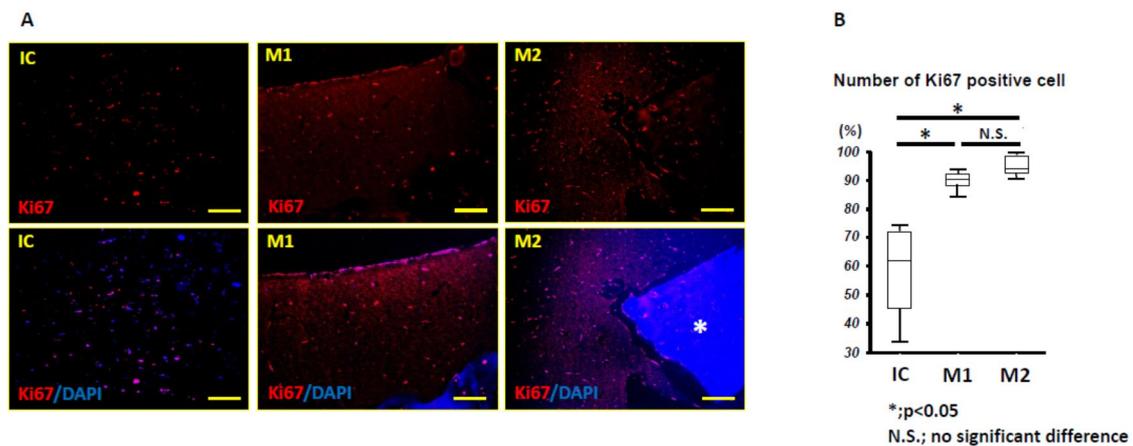


図3 Ki67 免疫染色による細胞増殖の評価。A：Ki67 免疫染色 B：Ki67 陽性細胞数

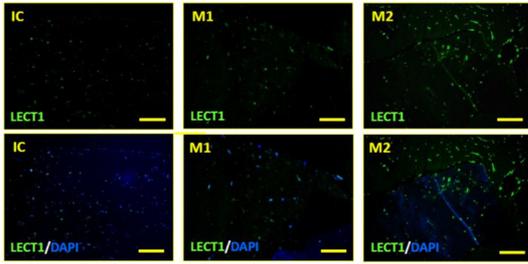


図4 LECT1 免疫染色

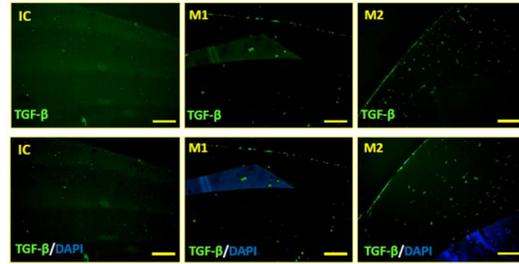


図5 TGF 免疫染色

日本白色家兎での検討

IC 群では、ゲル内に細胞がまばらに存在し、表層にサフラニン O 染色で赤染する薄い軟骨基質を認めた。M1、M2 群では、ゲル内に多くの細胞を認め、表層に厚い軟骨基質が確認できた。Bern score は、M2 群で有意に高値となった。細胞数は、M2、M1、IC 群の順に多く認めた。

(2)軟骨と軟骨下骨における相互作用の解析

この培地中に含まれる RNA を抽出し、分泌 microRNA の発現解析を行った。軟骨片の群では、microRNA-24、microRNA-140 などの骨形成や軟骨分化に関与する microRNA が多く培地中に含まれていた。これらの結果から、従来の自家培養軟骨細胞移植術のように軟骨を酵素処理し、軟骨細胞を単離してアテロコラーゲンゲル内に包埋するより、軟骨片をゲルに包埋する方が、ゲル内での細胞増殖能は高く、また軟骨下骨・軟骨に有利に働く microRNA を分泌していることがわかった。

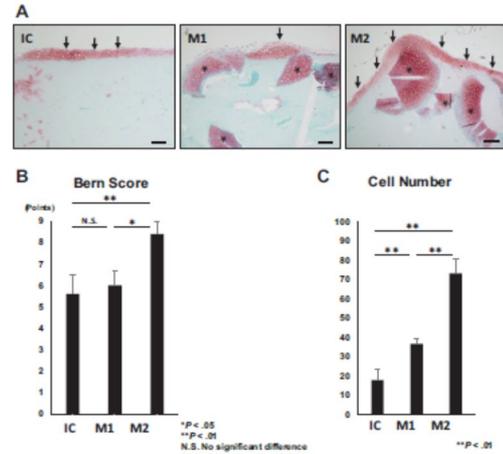


図6 日本白色家兎での細胞遊走・基質産生の評価。A: サフラニン O 染色 B: Bern スコア C: 細胞数

(3)日本白色家兎を用いたアテロコラーゲンゲル包埋細切軟骨片による治療効果の検討

骨軟骨欠損部の外観は、minced cartilage 群は、最も表層が平滑で、色調も周囲軟骨を同等であった。組織学的評価では、欠損群を除いて4週でサフラニン O 染色で赤染される組織を骨軟骨欠損部に認めた。24週になると、ACI 群、minced cartilage 群で良好な軟骨修復を認めたが、minced cartilage 群では、軟骨下骨の修復が最も良好であった。Minced cartilage 群の修復された軟骨は、型コラーゲンの免疫染色で濃染していた。

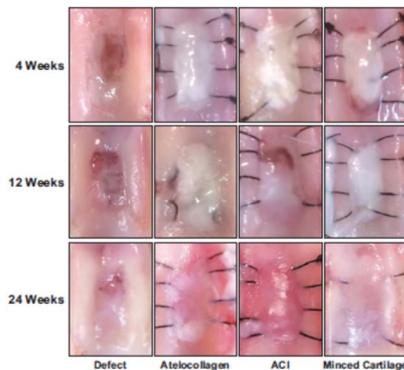


図7 骨軟骨欠損部の外観

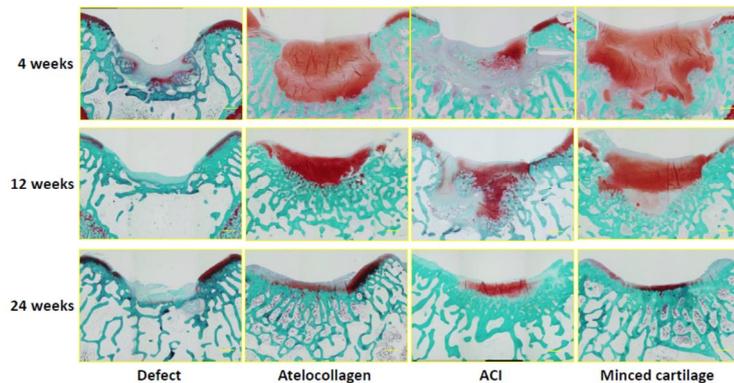


図8 骨軟骨欠損部の組織像。サフラニン O 染色

以上の研究により、従来の ACI のような 2 段階手術でなく、細切した軟骨片を使用した軟骨修復術で十分に良好な軟骨修復が得られることがわかった。細切軟骨片を使用すると、軟骨細胞を単離するための酵素処理が必要なく、細胞障害がないことも細切軟骨片で良好な細胞遊走を認めた一因と思われる。また、細切軟骨片から軟骨分化や骨分化に促進的に作用する microRNA が多く分泌されていたことから、アテロコラーゲンゲル包埋細切軟骨片移植で、軟骨修復だけではなく、軟骨下骨の修復も良好な結果が得られたと考えられる。アテロコラーゲンゲル包埋細切軟骨片移植術は、培養が必要なく、コスト的にも時間的にも従来の ACI よりも有利であり、また ACI と同等以上の軟骨修復が得られるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsuyuguchi Y, Nakasa T, Ishikawa M, Miyaki S, Matsushita R, Kanemitsu M, Adachi N.	4. 巻 -
2. 論文標題 The Benefit of Minced Cartilage Over Isolated Chondrocytes in Atelocollagen Gel on Chondrocyte Proliferation and Migration.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cartilage	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1947603518805205.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsushita R, Nakasa T, Ishikawa M, Tsuyuguchi Y, Matsubara N, Miyaki S, Adachi N.	4. 巻 47(9)
2. 論文標題 Repair of an osteochondral defect with minced cartilage embedded in atelocollagen gel: rabbit model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Sports Medicine	6. 最初と最後の頁 2216-2224
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0363546519854372.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松下亮介、中佐智幸、石川正和、露口勇輔、安達伸生
2. 発表標題 関節軟骨欠損に対するアテロコラーゲン包埋軟骨片移植術の効果
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 露口勇輔、中佐智幸、石川正和、松下亮介、金光宗一、味八木茂、安達伸生
2. 発表標題 細碎軟骨を用いた組織工学的治療法の有用性の検討
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 露口勇輔、中佐智幸、石川正和、松下亮介、中前敦雄、須賀紀文、林 聖樹、好川真弘、住田佳應、安達伸生
2. 発表標題 アテロコラーゲンゲル包埋細碎軟骨片と軟骨細胞における細胞増殖能の比較
3. 学会等名 第9回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 露口勇輔、中佐智幸、石川正和、松下亮介、味八木 茂、安達伸生
2. 発表標題 アテロコラーゲン包埋細碎軟骨片による軟骨細胞増殖・基質産生の検討
3. 学会等名 第32回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yusuke Tsuyuguchi, Tomoyuki Nakasa, Masakazu Ishikawa, Shigeru Miyaki, Ryosuke Matsushita, Munekazu Kanemitsu, Nobuo Adachi.
2. 発表標題 The advantages of minced cartilage on chondrocyte proliferation and migration compared to isolated chondrocyte in atelocollagen gel.
3. 学会等名 Othopaedic Research Society 2018 annual meeting. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安達伸生、中佐智幸、石川正和、松下亮介、松原紀昌
2. 発表標題 新規アプローチによる膝治療
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	味八木 茂 (MIYAKI Shigeru) (10392490)	広島大学・病院(医)・講師 (15401)	
研究分担者	石川 正和 (ISHIKAWA Masakazu) (60372158)	広島大学・医系科学研究科(医)・寄附講座准教授 (15401)	
研究分担者	中佐 智幸 (NAKASA Tomoyuki) (60467769)	広島大学・病院(医)・講師 (15401)	