

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08094

研究課題名(和文) 骨関節疾患に対するバイオマテリアルを用いた硝子軟骨再生に関する研究

研究課題名(英文) Research of articular cartilage regeneration using biomaterials for bone and joint disease

研究代表者

佐々木 直樹 (SASAKI, NAOKI)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：00360975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：SEMでは、マイクロウエル内の均一な細胞塊形成および細胞外基質の産生が確認できた。リアルタイムPCRでは、軟骨誘導7日目の 2×10^6 および 5×10^6 cellsの検体においてペレット培養に比較してColIIIの発現量が有意に高値を示した。多孔質ジルコニアマイクロウエル法での培養において、細胞数を増やすごとにColIIIの発現量が多くみられたが、この原因として細胞数が少ない場合、細胞塊の大きさにばらつきが生じ、分化効率に影響を及ぼしたことが考えられた。本研究では、ジルコニア担体を用いることで従来の方法に比べてより硝子軟骨細胞に近い細胞塊を作製することが可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人を含めた動物における関節軟骨疾患は、疼痛と活動制限のためQOL(生活の質)低下などを引き起こす難治性疾患である。関節軟骨は硝子軟骨より構築されており、その再生能が低いことが問題となっている。バイオマテリアル技術により硝子軟骨の再生を試みた結果、境界面(tide mark)が形成されず、周囲との連続性欠如が明らかとなった。本研究では、これらの問題点を克服するため、関節軟骨表層の保護膜として硝子軟骨細胞塊の作出の技術を組み合わせることにより、関節軟骨疾患に有効な治療法の開発を目的とする。これにより荷重に耐えられる硝子軟骨の再生が可能となり、未だ実現していない関節軟骨疾患に対する治療法を確立する。

研究成果の概要(英文)：SEM confirmed the formation of uniform cell masses in the microwells and the production of extracellular matrix. In real-time PCR, the expression level of ColIII was significantly higher in the 2×10^6 and 5×10^6 cells specimens on the 7th day of cartilage induction as compared with the pellet culture. In the culture with zirconia carrier, the expression level of ColIII increased as the number of cells increased, but as the cause of this, when the number of cells was small, the size of the cell cluster varied and the differentiation efficiency was affected. Was thought. In this study, by using zirconia carrier, it was possible to prepare cell clusters that are closer to hyaline chondrocytes than conventional methods.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 馬救急医療 硝子軟骨再生 多孔質ジルコニアマイクロウエル法 3次元細胞塊

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

背景: サラブレッド種において、離断性骨軟骨症、軟骨下骨嚢胞および剥離骨折によって起こる関節軟骨の損傷は、跛行およびパフォーマンスにつながる重要な疾患である。現在、関節軟骨損傷に対する治療法として、主に関節鏡を用いた軟骨片除去および欠損部位のデブリドメントが行われているが、軟骨組織は再生能が乏しいため、関節本来の機能が回復しない場合もある。近年、ヒト間葉系幹細胞を用いた 3 次元多孔質ジルコニアマイクロウエル細胞培養担体 (ジルコニア担体、CERAHIVETM) による軟骨様細胞塊の作製が報告された。ジルコニア担体は直径 500 μm の U 字型細胞増殖空間を有し、多孔質構造により細胞塊の全方向からの培養液供給が可能となっている。このため、均一な細胞塊を大量に作製でき、高い分化効率と再現性を有するとされている。

2. 研究の目的

硝子軟骨再生における細胞外マトリクスの産生能を高めるために、骨髄由来間葉系幹細胞 (幹細胞) より分化・培養する培養軟骨細胞と幹細胞とを混合して使用する。幹細胞より培養軟骨細胞を樹立し、その生化学的特性 (細胞外基質産生能) の解析を行い、一連の研究で使用する培養軟骨細胞を分化誘導する技術を確認する。

3. 研究の方法

サラブレッド種 5 頭 (平均 1.6 歳、375kg) の凍結間葉系幹細胞を用いた。接着培養を行いコンフルエントにした後、 8×10^5 、 2×10^6 および 5×10^6 cells の幹細胞をそれぞれジルコニア担体に接種した。4 日間培養を行い、ジルコニア担体に細胞塊を作製した後、軟骨誘導培地 (50 $\mu\text{g/ml}$ アスコルビン酸 2-リン酸、100nM デキサメサゾン、1% ITS、1% ペニシリン/ストレプトマイシン) に交換し、7 日間、14 日間および 21 日間培養を行った (37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2)。走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて細胞塊および細胞外基質の様子を観察した。また、細胞塊を採取した後、RNA の抽出および cDNA 合成を行い、リアルタイム PCR により硝子軟骨細胞特異的遺伝子であるタイプ コラーゲン遺伝子 (Col I) の発現量 (Col I /GAPDH) を測定した。コントロールとして、従来より行われているペレット培養法を用いて、比較検討を行った。

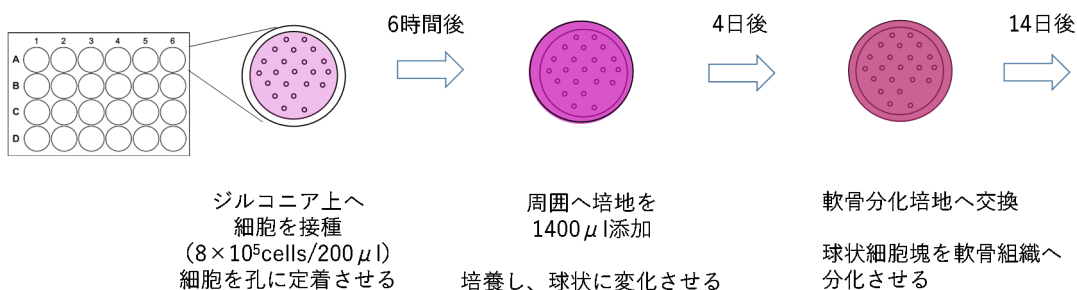


図 1. 多孔質ジルコニアマイクロウエルを用いた硝子軟骨細胞塊の作製方法



図 2. 多孔質ジルコニアマイクロウエル

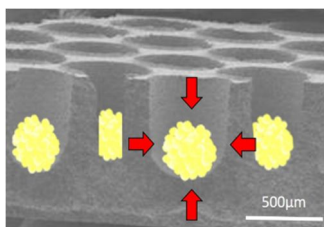


図 3. 多孔質ジルコニアマイクロウエルでの 3 次元培養

4. 研究成果

結果: SEM では、マイクロウエル内の均一な細胞塊形成および細胞外基質の産生が確認できた。リアルタイム PCR では、軟骨誘導 7 日目の 2×10^6 および 5×10^6 cells の検体においてペレット培養に比較して ColII の発現量が有意に高値を示した。ジルコニア担体での培養において、細胞数を増やすごとに ColII の発現量が多くみられたが、この原因として細胞数が少ない場合、細胞塊の大きさにばらつきが生じ、分化効率に影響を及ぼしたことが考えられた。本研究では、ジル

コニア担体を用いることで従来の方法に比べてより硝子軟骨細胞に近い細胞塊を作製することが可能であった。今後、ジルコニア担体を馬の離断性骨軟骨症の症例に対して応用していきたい。

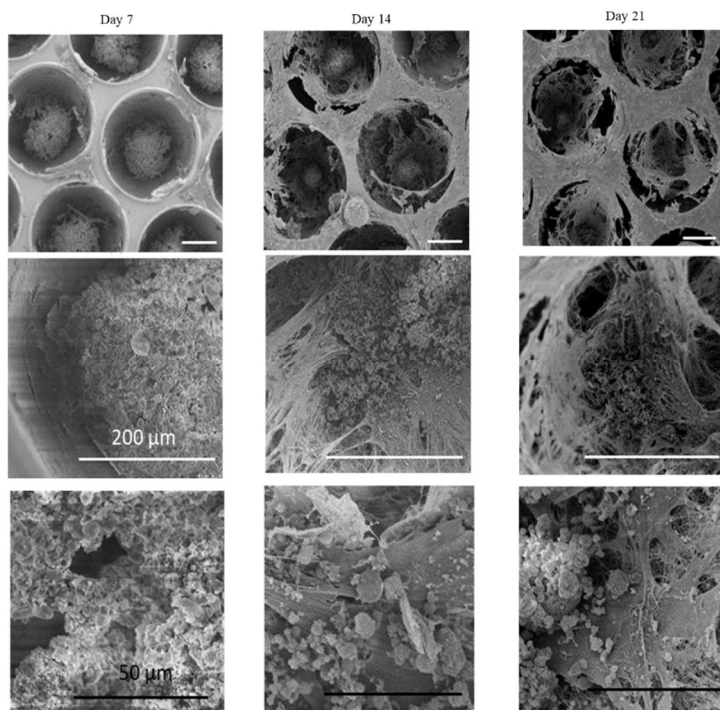


図 4. マイクロウエル内の均一な細胞塊形成

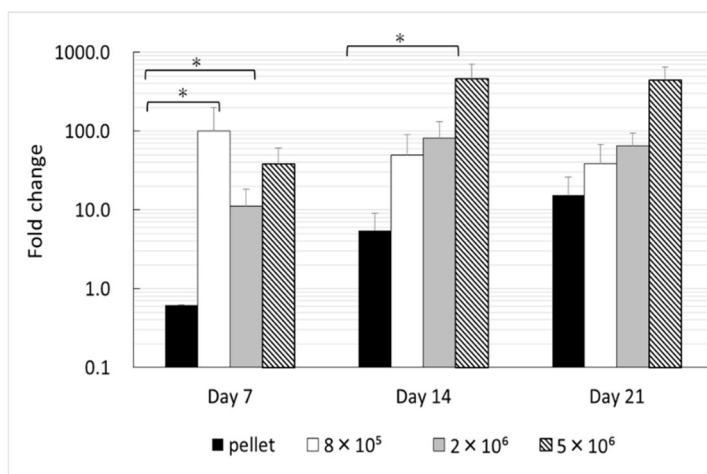


図 5. リアルタイム PCR では、軟骨誘導 7 日目の 2×10^6 および 5×10^6 cells の検体においてペレット培養に比較して Col III の発現量が有意に高値を示した。

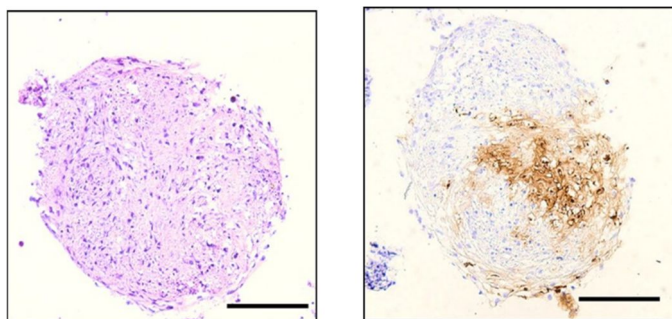


図 6. ペレット培養に比較して軟骨誘導培養では、Col III の発現量が著明に観察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tomohiro Inui, Shingo Haneda, Motoki Sasaki, Hidefumi Furuoka, Megumi Ito, Masashi Yanagawa, Yasuhiko Tabata, Naoki Sasaki
2. 発表標題 The formation of chondrocyte-like aggregates on zirconia porous three-dimensional microwell substrata using equine, bone marrow-derived mesenchymal stem cells.
3. 学会等名 2018 TERMIS (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomohiro Inui, Shingo Haneda, Motoki Sasaki, Hidefumi Furuoka, Megumi Ito, Masashi Yanagawa, Yasuhiko Tabata, Naoki Sasaki
2. 発表標題 Chondrocyte aggregate on zirconia microwell
3. 学会等名 ACVS2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 乾智博、占部眞子、羽田真吾、古岡秀文、伊藤めぐみ、柳川将志、佐々木基樹、田畑泰彦、佐々木直樹
2. 発表標題 3次元多孔質ジルコニアマイクロウエル細胞培養担体を用いた馬硝子軟骨細胞塊作製方法の検討
3. 学会等名 第30回日本ウマ科学会学術集会
4. 発表年 2017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
---------------------------	-----------------------	----