

平成 21 年 3 月 2 日現在

研究種目：基盤研究（C）	
研究期間：2007～2008	
課題番号：19592082	
研究課題名（和文）	メカニカルテストを用いた再生耳介軟骨の物理学的性状の検討
研究課題名（英文）	Tissue engineering a model for the human ear: Assessment of the mechanical property
研究代表者	磯貝 典孝（ISOGAI NORITAKA） 近畿大学・医学部・教授 90203067

## 研究成果の概要：

複雑な三次元形状を有する再生耳介形状軟骨に対して、生理的な変形を加えた場合の再生軟骨の折り曲げ応力を検討した。実験群は、耳介軟骨細胞、肩関節軟骨細胞、鼻中隔細胞、肋軟骨細胞に由来する再生軟骨群の4部位から採取した軟骨細胞を使用して、耳介形状軟骨の再生を行った4群を設定した。再生軟骨は、臨床使用に長期間耐えうる力学的特性を持つことが必要と考えられ、今後、さらに詳細な力学的機能評価（破壊強度や疲労強度）が必要と考えている。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：耳介軟骨・再生医学・メカニカルテスト・生分解性ポリマー・折り曲げ応力

## 1. 研究開始当初の背景

Tissue engineering は、培養細胞と生分解性ポリマーの複合体から、臨床的に活用可能な移植組織を再生誘導する技術であり、次世代の再建外科における新しい戦略技術として近年注目されている。

一般に Tissue engineering を用いた再生誘導では、成長因子や血管系の刺激が必要とされているが、組織内に栄養血管を持たない軟骨は、特に再生誘導しやすい組織として早くから着目されてきた。軟骨組織の Tissue engineering においては、すでに、損傷した

膝関節に対して自家軟骨細胞移植による細胞移植療法が試行され、現在、一定の臨床成績が報告されるようになった。しかし、三次元形状を有する再生軟骨移植の技術は未だ確立されていない。

三次元形状を有する再生組織の Tissue engineering とその臨床応用に関する基盤技術の開発は、近年、重要な臨床的課題となりつつあり、特に、播種細胞の選択に関する研究が注目されている。临床上、採取可能な軟骨として、(1) 硝子軟骨 (2) 弾性軟骨 (3) 線維軟骨の3部位が選択可能であるが、おの

おのの部位により、軟骨細胞の機能や細胞外基質の構成 (Type II Collagen、ヒアルロン酸、プロテオグリカンなど) は異なっている。異なる採取部位から単離した軟骨細胞がポリマー上で分化し、その結果として組織誘導された三次元形状は、播種細胞の細胞源に影響されることが推測されるが、未だ、その詳細は解明されていない。

## 2. 研究の目的

そこで、本実験では、播種細胞の最適な採取部位を検討する目的で、あらかじめヒト耳介形状を有する生分解性ポリマーを作成した。次に、耳介軟骨、肩関節軟骨、鼻中隔軟骨、肋軟骨から採取した軟骨細胞をポリマーに播種した。長期移植成績の特徴を詳細に理解するため、無胸腺マウスの背部皮下においてヒト耳介形状軟骨を再生誘導し、再生軟骨の組織像、および RT-PCR と共に、耳介軟骨の性状として重要な“しなやかさ”の再現性について検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 生分解性ポリマーの作製

ヒト耳介形状を有する生分解性ポリマー (poly (L-lactide- $\epsilon$ -caprolactone 50:50) 共重合体) の作成<sup>3,4</sup>では、あらかじめ準備したヒト耳介の鋳型 (1歳女児より採型) に、ポリマー溶液 (5% (w/w) 1,4-Dioxane および poly L-lactic acid (PLLA)、poly  $\epsilon$ -caprolactone (PCL)) を泡立てないように駒込ピペットにて注入した。ポリマーを注入した鋳型を $-40^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫へ移し、1時間静置した。次に、ポリマーを鋳型より取り出し、40 Pa、 $-40^{\circ}\text{C}$ 、12時間の条件下に凍結乾燥 (TF10-80ATA; 宝製作所、Tokyo, Japan) 処理した。最後に、真空乾燥 ( $60^{\circ}\text{C}$ 、12時間) にてモノマー及び溶媒の除去を行い、ヒト耳介形状を有する生分解性ポリマー (poly (L-lactide- $\epsilon$ -caprolactone 50:50) 共重合体) を作成した。

### (2) 軟骨細胞の単離

Klagsbrun の方法<sup>2</sup>に準じて、仔ウシ (生後1ヶ月以内) の耳介軟骨、肩関節軟骨、鼻中隔軟骨、肋軟骨の4カ所より、軟骨組織を #15 メスにて採取した。採取組織は、軟骨膜を注意深く取り除き、 $5\times 5\text{ mm}$  の大きさに細切したのち、0.3% collagenase type II (Worthington Biochemical, Freehold, NJ, USA) にて  $37^{\circ}\text{C}$ 、14時間の条件下に酵素処理した。浮遊する軟骨細胞をナイロンメッシュ (孔サイズ:  $300\ \mu\text{m}$ ) にて濾過した。得られた細胞浮遊液は、 $\text{Ca}^{++}$ 、 $\text{Mg}^{++}$  不含リン酸緩衝液 (PBS; GIBCO, Grand Island, NY, USA) にて、3回洗浄を繰り返した後、遠心分離 ( $4^{\circ}\text{C}$ 、400 G、10分間) した。細胞浮

遊液に含まれる生細胞数は、死細胞を 0.4% トリパンプルー液 (GIBCO, Grand Island, NY, USA) にて染色したのち、倒立顕微鏡 (IX 70; Olympus, Tokyo, Japan) 下に血球算定盤を用いて算定した。

### (3) 細胞・ポリマー複合体の作成

単離した4種類の軟骨細胞を、ヒト耳介形状を有する生分解性ポリマーにそれぞれ播種して、軟骨細胞・ポリマー複合体を作成した。軟骨細胞の播種濃度は、10%ウシ胎児血清 (FBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 入りの F-12 培養液 (GIBCO, Grand Island, NY, USA) を加えて、 $100\times 10^6$  個/ml に調節し、ピペットにてポリマーに播種 (播種細胞数:  $100\times 10^6$  個/ポリマー) した。細胞・ポリマー複合体は、播種細胞がポリマー表面に細胞接着するために要する6時間の間、インキュベーター内 ( $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ ) に静置した。その後、細胞培養液 (組成: F-12 培養液、FBS、アスコルビン酸  $50\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 、ペニシリン  $100\ \text{unit}/\text{ml}$ 、ストレプトマイシン  $100\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 、アンホテリシン B  $0.25\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) を培養皿に静かに注ぎ、インキュベーター内 ( $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ ) で7日間培養した。培養液の交換は、週2回行った。

### (4) 細胞・ポリマー複合体の移植

作成した細胞・ポリマー複合体は、Tissue engineering の通法<sup>5</sup>に従い、無胸腺マウスの背部皮下に移植し、ヒト耳介形状を有する軟骨再生を試みた。移植操作では、まず前麻酔としてトルブタミド ( $3\ \text{mg}/\text{kg}$ )、硫酸アトロピン ( $0.04\ \text{mg}/\text{kg}$ ) を皮下注射し、15分後にイソフルラン (Pittmann and Moores, Mundelein, IL, USA) にて導入および維持麻酔を行った。次に、無胸腺マウスの背部をポピドンヨード (The Purdue Frederick Company, Stamford, CT, USA) にて消毒し、約2cmの皮下切開を加えた。皮下を剥離して形成した皮下ポケット内に細胞・ポリマー複合体を挿入し、5-0 ナイロン縫合糸 (シグマ、Tokyo, Japan) を用いて閉創した。

実験群は計5群を作製した。4種類の軟骨細胞 (耳介軟骨細胞、肩関節軟骨細胞、鼻中隔軟骨細胞、肋軟骨細胞) のいずれか1つを播種した細胞・ポリマー複合体、およびコントロール (ポリマーのみ) である。標本採取は、細胞・ポリマー複合体の移植後10週目 ( $n=6$ ) および40週目 ( $n=6$ ) に行い、採取組織の肉眼所見および形状計測、組織学的検索、RT-PCR を行った。また、力学試験における標本採取は、細胞・ポリマー複合体の移植後10週目 ( $n=3$ )、20週目 ( $n=3$ )、40週目 ( $n=3$ )、および60週目 ( $n=3$ ) に行った。

#### (5) 形状計測

採取した再生耳介形状軟骨の長さ（長軸方向）、幅（横軸方向）、厚さを計測した。長さは、耳上点と耳下点を結んだ長さとした。幅は、耳輪脚の基部を通り、かつ長さに対して垂直となる長さを計測した。厚さは、標本断面における隆起部（対耳輪）および耳甲介腔（陥凹部）のそれぞれの厚さを計測した。

#### (6) 力学試験

Instron series 5565 (Instron corporation, Canton, MA, USA) を用いて、採取した再生耳介形状軟骨の折り曲げ応力を計測した。まず、ドーム状の再生軟骨標本を台座に固定した。幅 1 mm 長さ 4cm の垂直板上から圧迫し、その応力を Instron で検出した。この際、垂直板は、再生耳介の耳輪脚を通る横軸に合わせて設置した。垂直板が標本に接し、さらに 0.03 ~ 0.06 mm 下がる時、0.2 N の反発応力を記録したので、この点を基準点とした。続いて、垂直板を基準点から 3 mm 下降 (60 mm / min) させ、このときの反発応力をコンピューター (FMV C24C ; Fujitsu Ltd, Tokyo, Japan) に入力した。この操作によって、再生耳介軟骨が 3mm 折り曲がったときの応力を“しなやかさ”として計測した。標本の取り付けから試験が終了するまでの期間は、標本に生理食塩水を噴霧し、乾燥を防止した。

#### (7) 組織学的検索

採取した再生耳介形状軟骨を 10 % 中性ホルマリンにて浸漬固定 (8 時間) し、エタノール系列により脱水した後、パラフィン切片 (厚さ 4  $\mu$ m) を作成した。染色は、軟骨基質の主成分であるプロテオグリカンの産生度合いを調べるために Safranin O 染色、細胞の一般的性状を調べるために Toluidine Blue 染色、石灰化を調べるために von Kossa 染色、弾性線維を調べるために Verhoeff 染色を施した。

#### (8) RT-PCR

再生組織における軟骨関連遺伝子 (Type II Collagen, Aggrecan) および骨関連遺伝子 (Bone Sialoprotein) の発現を、RT-PCR 法および Real time RT-PCR 法を用いて解析した。

まず、移植後 10 週目および 40 週目に摘出した再生軟骨から凍結切片 (厚さ 5 ~ 7  $\mu$ m) を作成した。そして、PixCell LCM system (Arcturus Engineering, Mountain View, CA, USA) により、標的とした軟骨細胞成分のみを単離し、RNA を抽出した。

RNA は Diethylpyrocarbonate 処理水 (以下 DEPC 処理水と略す) に溶解し、紫外可視

分光光度計 (eppendorf Bio Photometer ; Brinkmann Instruments Inc., Westbury, NY, USA) を用いて測定を行った。抽出した RNA 1  $\mu$ g に対して、5X Reaction buffer (4  $\mu$ l)、25 mM MgCl<sub>2</sub> (2.5  $\mu$ l)、Dithiothreitol (DTT; 2  $\mu$ l)、RNase inhibitor (20 unit /  $\mu$ l, 0.5  $\mu$ l)、Random hexamers (1  $\mu$ l)、oligo dT primer (1  $\mu$ l)、10 mM Deoxynucleotide triphosphate (dNTP; 2  $\mu$ l) を加えた。各サンプルを 2 チューブずつ用意し、一方に Multiscribe reverse transcriptase (50 unit /  $\mu$ l, 1  $\mu$ l) を加え、もう一方は DEPC 処理水を加え minus RT としコントロールとした。対照 RNA には、ハウスキーピング遺伝子の一つであるグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (以下 GAPDH と略す) を用いた。

RT-PCR 法では、サンプルに AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)、0.2 mM dNTP、0.67  $\mu$ M のプライマーを加えて総量 30  $\mu$ l に調整した。PCR 装置は、Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems) を使用し、PCR 産物を 3.5 % アガロースゲルに入れ、100 V、30 分の条件下に電気泳動 (Mupid-21, アドバンス, Tokyo, Japan) を行った。さらに SYBR Gold (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) 核酸染色にて各バンドを確認した。

また Real time RT-PCR 法では、サンプルに SYBR Green Master Mix (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) と 0.3  $\mu$ M のプライマーを加えて総量 30  $\mu$ l に調整した。PCR 装置は、AMI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems) を使用し、各サンプルの threshold cycle (C<sub>T</sub>) 値を求めた。 $\Delta C_T = (\text{Type II Collagen, Aggrecan, または Bone Sialoprotein/Osteopontin の } C_T \text{ 値}) - (\text{対照 RNA の } C_T \text{ 値})$  とし、 $\Delta C_T$  値を相対的に比較した。また v.10b1 (Applied Biosystems) を用いて dissociation curve を作製し、PCR 産物の融解温度と PCR 産物が純粋であることを確認した。

PCR の条件は、逆転写 37 °C で 1 時間、変性 95 °C で 15 秒、アニーリング 60 °C で 30 秒、伸長反応を 72 °C で 2 分を 1 サイクルとして、40 サイクル行った。また、使用したプライマーは、Type II Collagen では Sense primer : F315 5'-gctcatccagggtccaa-3'、Antisense primer : R404 5'-tggttcgtgcagccatcct-3'、Aggrecan では Sense primer : F285 5'-caggagccccgctgtct-3'、Antisense primer : R367 5'-tggtcatagttcacctcaagagttg-3'、Bone Sialoprotein では Sense primer : F371 5'-ctgagaacaccaccttcca-3'、Antisense primer : R357

5'-cgaagaatcagagctgagaaca-3'、とした。また、GAPDH では Sense primer : F203 5'-gagatcctgccaacatcaagtg -3'、Antisense primer : R290 5'-ccagccttctccatgtagtg -3' とした。

#### 4. 研究成果

本研究では、臨床応用に直結した基礎研究を行うという観点から、ヒト耳介の三次元形状と力学的特性を有する軟骨の再生を試み、その長期結果を検討した。検討項目は肉眼所見、形状計測、力学試験、組織像、RT-PCR とした。まず、ヒト耳介形状を有する scaffold を生分解性ポリマー (poly

(L-lactide-ε-caprolactone 50:50) 共重合体) を用いて作製した。続いて、仔ウシの4カ所の軟骨(耳介軟骨、肩関節軟骨、鼻中隔軟骨、肋軟骨)を採取して遊離軟骨細胞を調整し、scaffold に播種した。その結果、耳介軟骨細胞、肩関節軟骨細胞、鼻中隔軟骨細胞に由来する再生軟骨群において、ヒト耳介特有の複雑な三次元形状が良好に再現され、かつ移植後40週の長期にわたって維持された。一方、肋軟骨細胞に由来する再生軟骨群では、耳介特有の三次元形状は失われ、散在する骨様突起を認めた。組織学的に、突起基部は石灰化軟骨、突起部は骨細胞の存在する骨組織から構築され、成長帯の形成が観察された。力学的特性を調べる目的で、Instron を用いて再生軟骨の折り曲げ応力を測定した。その結果、耳介軟骨細胞、肩関節軟骨細胞、鼻中隔軟骨細胞に由来する再生軟骨群において、経時的に正常ウシ耳介軟骨の性状に近づく傾向を認めた。一方、肋軟骨細胞に由来する再生軟骨群では、軟骨の物理学的性状は失われ、著明な硬化傾向を認めた。これらの結果から、in vivo において、耳介軟骨細胞、肩関節軟骨細胞、鼻中隔軟骨細胞に由来する再生軟骨群は、三次元形状を維持しながら、軟骨の細胞外基質を産生し、正常耳介軟骨群の力学的特性に近づくことが示唆された。一方、肋軟骨細胞に由来する再生軟骨群は形状と力学特性の両面から耳介軟骨と異なっており、肋軟骨は軟骨採取部位として不適切であることが示唆された。

#### 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 1 件)

Isogai N (他 7 名、2 番目)、Enjo M. (他 7 名、3 番目), Tissue engineering a model for the human ear: Assessment of size, shape, morphology, and gene expression following seeding of different chondrocytes. *Would Repair and Regenerations* 査読有 17 巻, 2009, 136-146.

[学会発表] (計 12 件)

- ① Isogai N, Tissue engineering a human ear model following seeding of different chondrocytes, The TERMIS-NA 2008、2008年12月9日、米国
- ② 磯貝典孝、自家移植モデルにおける新生軟骨の再生誘導、再生医療材料研究会、2008年7月12日、京都
- ③ 森 廣政、ヒト耳介形状軟骨の再生誘導における PGA-P(LA-CL) ポリマーの有用性、第29回日本炎症・再生医学会、2008年7月9日、東京
- ④ Isogai N、Bone and cartilage tissue engineering form basic research to clinical application, The Korean Wound Care Society 2008、2008年3月28日、韓国
- ⑤ 磯貝典孝、骨・軟骨組織の再生誘導と再建外科への展開、第26回大阪マイクロサージャリー研究会、2008年2月2日、大阪
- ⑥ Isogai N、Advances in tissue engineering models of human phalanx and ears、International Conference on Advances in Bioresorbable Biomaterials for Tissue Engineering、2008年1月4日、シンガポール
- ⑦ 磯貝典孝、骨・軟骨組織の再生誘導と再建外科への展開、第34回日本マイクロサージャリー学会ランチョンセミナー、2007年10月18日、福島
- ⑧ 森 廣政、軟骨再生における PGA 含入 P(LA-CL) ポリマーの有用性、第16回日本形成外科学会基礎学術集会、2007年10月12日、神戸
- ⑨ 望月祐一、軟骨再生における PGA 含入 P(LA-CL) ポリマーの有用性、第16回日本形成外科学会基礎学術集会、2007年10月12日、神戸
- ⑩ 松永吉真、培養ヒト鼻中隔軟骨細胞を用いたヒト耳介形状軟骨の再生誘導、第16回日本形成外科学会基礎学術集会、2007年10月11日、神戸
- ⑪ 磯貝典孝、骨・軟骨組織における再生誘導と形成外科領域への応用、第41回京都形成外科医会、2007年6月2日、京都
- ⑫ 和田仁孝、新たな骨誘導型生分解ポリマーを用いた指骨の再生誘導、第50回日本手の外科学会、2007年4月19日、仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯貝 典孝 (ISOGAI NORITAKA)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：90203067

(2) 研究分担者

遠所 瑞弘 (ENJO MITSUHIRO)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：30441009

(3) 連携研究者

なし