

機関番号：32644

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791420

研究課題名(和文) Scaffold free 軟骨プレート移植による軟骨修復効果

研究課題名(英文) Repair of articular cartilage with scaffold-free chondrocyte plates

研究代表者

長井 敏洋 (NAGAI TOSHIHIRO)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：20514376

研究成果の概要(和文)：

本研究で我々は scaffold を用いることなく 3 次元組織工学的軟骨を構築することに成功し、骨軟骨欠損モデルを用いた研究で欠損内部に骨髄から動員される自己修復細胞を満たし、軟骨分化への initiator として表層部のみに scaffold free 組織工学的軟骨を移植し良好な長期間の修復効果を報告した。その詳細な修復機序の検討したところ、骨髄由来の修復細胞が関節軟骨の特性である anti-angiogenesis property を獲得したことで良好な修復再生効果を発揮することを確認した。

研究成果の概要(英文)：

In osteochondral defects of the articular cartilage, favorable repair can be achieved by restoration of the superficial layer region alone using scaffold free chondrocyte plates. And this study confirmed that in the early stage of transplantation, a good restoration effect of articular cartilage is seen with reparative cells derived from marrow that acquire antiangiogenic properties.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学系臨床医学・整形外科学

キーワード：軟骨修復、組織工学軟骨、同種移植

1. 研究開始当初の背景

(1) 関節軟骨は、血管、神経、リンパ管を欠く組織であり、関節軟骨に損傷や変性が生じると通常の損傷治癒機転が働きにくい。そのため、自己修復能が著しく乏しい。近年では、細胞増殖の足場 (scaffold) を利用することにより生体外で再生軟骨組織を構築し、移植する方法が用いられている。Scaffold は、三

次元構造を保ち再生軟骨の形状を制御するのに役立つ。しかし、生体適合性並びに長期の安全性に疑問が残り、臨床応用への検討の余地が未だ残る。そこで、我々は人工材料を用いず培養細胞のみから組織を再構築することを目標としてきた。2005 年度には、温度応答性培養皿を用いて、軟骨細胞とその産

生する基質を一介のシートとして回収することに成功し、関節軟骨部分欠損モデルへ移植し、良好な結果を報告した。また、2008年度では、細胞シートとは別に、旋回培養法を利用し関節軟骨全層欠損部でコアとなりえる一定の形状を有する scaffold free 組織工学的軟骨(軟骨プレート)の構築に成功し報告してきた。

(2) 組織修復に関しては、損傷部位の表現型に分化し得る修復細胞を動員することが重要であると報告されているが、我々は骨軟骨欠損部に骨髄から動員される骨髄由来細胞を満たし、欠損表層部のみに scaffold-free 軟骨プレートを移植することで良好な組織修復が得られるのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨軟骨欠損モデルを作製し、欠損部へ宿主骨髄側から骨髄間葉系幹細胞(以下 MSC) を動員し、表層のみだけの scaffold-free 軟骨プレート移植により欠損部での長期間の修復効果を調べることである。

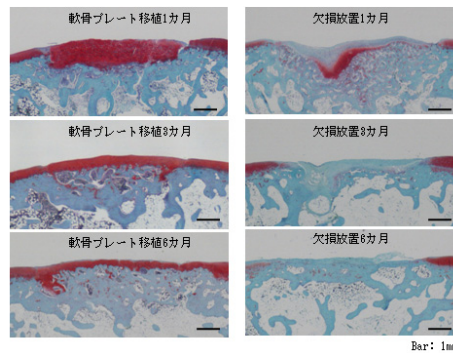
3. 研究の方法

(1) 日本白色家兎の関節軟骨を採取し酵素処理して細胞単離する。単層培養にて細胞増殖し2継代後細胞を回収する。鋳型を利用し細胞を高密度播種し1週間の初期静置培養したのち2週間の旋回培養し移植組織を構築する。

(2) 成熟日本白色家兎の大腿膝蓋関節に直径5mm、深さ3mmの骨軟骨欠損を作製する。2週間の旋回培養した軟骨プレートを使用し、表層のみに移植した移植群と欠損放置群の2群を作製する。

4. 研究成果

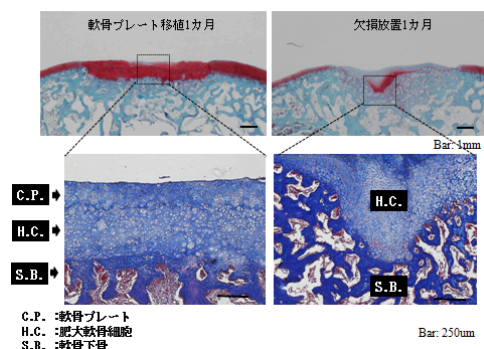
(1) 移植群ならびに欠損放置群のサフラニン0染色



軟骨プレート移植群の術後1カ月の欠損内部はサフラニン0染色にて濃染されていた。術後3、6か月と軟骨下骨の形成を認め軟骨層はサフラニン0の染色性を維持し良好な軟骨修復を示した。欠損放置群の術後1カ月の欠損底部ではサフラニン0の染色を認めるも、欠損表層部は線維性組織での修復を認め、術後3、6か月では線維性組織や軟骨下骨の露出を認めた。

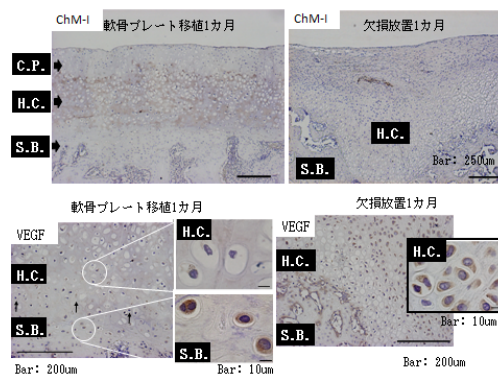
(2) 術後1カ月の詳細な検討

① マッソントリコモナル染色



術後1ヶ月の軟骨プレート移植群では、マッソントリコモナル染色に示すとおり、軟骨プレートと骨髄由来の肥大軟骨細胞層に区別された。又、軟骨下骨の remodeling の層では、移植群では肥大軟骨細胞層へ流入せず軟骨下骨層で留まる拡張した血管を認めるが、欠損放置群では肥大軟骨細胞層へ流入する細かい血管を多数認めた

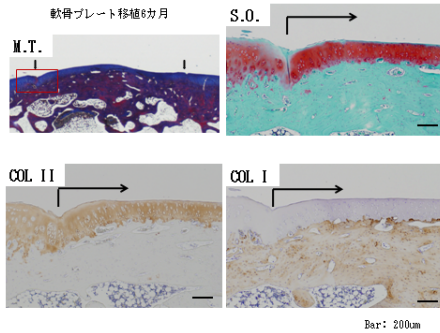
② ChM-1 と VEGF の免疫染色



anti-angiogenesis で報告されている ChM-1

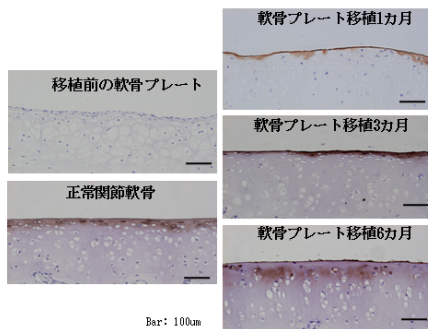
の発現を軟骨プレート移植群では肥大軟骨細胞層に一致して認めるも、欠損放置群では認めなかった。一方 angiogenesis を示す VEGF の発現を移植群では軟骨下骨層で認めるも、肥大軟骨細胞層では殆ど認めなかった。欠損放置群では肥大軟骨細胞層で強発現を認めた。

(3) 術後 6 カ月の I 型 II 型コラーゲンの免疫染色による検討



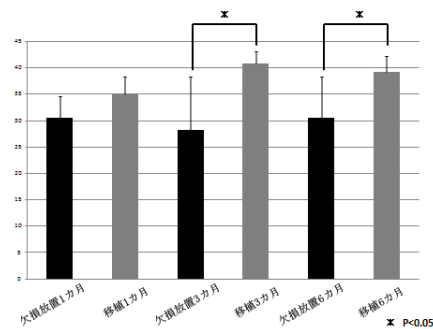
修復組織は宿主軟骨組織と同程度のサフラニン O の染色性を維持し、II 型コラーゲンの発現を認め、I 型コラーゲンの発現は認めなかった。表層は平滑で宿主軟骨との良好な integration を認め、内部では柱状の配列構造をとり tidemark の形成が認められた。

(4) superficial zone protein の免疫染色



関節軟骨の潤滑性に関与すると示唆される SZP の発現を評価した。移植前の軟骨プレートでは発現を認めなかったが、移植後 1 か月から発現を認め、術後 6 カ月においても軟骨表層に発現を認めた。

(5) International Cartilage Repair Society grading scale



(11-45point の評価で点数が高い程修復が良

いことになる)

術後 1 ヶ月で軟骨プレート移植群と欠損放置群で有意差を認めなかったが、術後 3 ヶ月では欠損放置群と比較し軟骨プレート移植群で有意に高値を示し、術後 6 ヶ月の移植群では若干の減少を認めるも、欠損放置群と比較し有意に高値を示した。

本研究にて我々は scaffold free 組織工学的軟骨を構築し、骨軟骨欠損部に移植し長期間における良好な修復再生効果を報告した。移植早期における骨髄由来修復細胞が抗血管新生特性 (anti-angiogenesis property) を獲得したことで良好な関節軟骨の修復再生効果を導くことを確認した。

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)

- ① Noninvasive evaluation of tissue engineered cartilage with time resolved laser induced fluorescence spectroscopy

Tissue Engineering Part C Methods 2010 Jun; 16(3):365-373 査読有

T. Kustuna, M. Sato, M. Ishihara, K. Furukawa, T. Nagai, T. Ushida, S. Kikuchi, J. Mochida

[学会発表] (計 8 件)

- ① 長井敏洋、佐藤正人、沓名寿治、太田直司、海老原吾郎、持田讓治

血管新生阻害剤 (Bevacizumab) 静脈内投与による関節軟骨修復の検討

第 10 回日本再生医療学会
2011 年 3 月 1 日 東京

- ② T. Nagai, M. Sato, T. Kutsuna, S. Ito, M. Kokubo, J. Mochida

Repair of articular cartilage with anti-VEGF antibody bevacizumab

2011 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society

January 13-16, 2011 Long Beach, California

- ③ 長井敏洋、佐藤正人、沓名寿治、太田直司、海老原吾郎、小久保舞美、持田讓治

抗 VEGF ヒト化モノクローナル抗体 (Bevacizumab) による軟骨修復効果

第 25 回日本整形外科基礎学術集会
2010 年 10 月 14 日 京都

- ④ 長井敏洋、佐藤正人、古川克子、沓名寿治、海老原吾郎、太田直司、伊藤聡、小久保舞美、鶴養拓、牛田多加志、持田讓

治
血管新生阻害効果による関節軟骨修復の
検討
第29回日本運動器移植・再生医学研究会
2010年9月25日 京都

- ⑤ 長井敏洋、佐藤正人、杳名寿治、海老原
吾郎、太田直司、持田讓治
抗 VEGF ヒト化モノクローナル抗体
(Bevacizumab) による関節軟骨修復効果
第9回日本再生医療学会
2010年3月18日 広島
- ⑥ T.Nagai, M. Sato, T. Kutsuna, G. Ebihara,
J. Mochida
Intravenous administration of
Bevacizumab may contribute to better
repair of articular cartilage.
56th Orthopaedic Research Society
March 6-9, 2010 New Orleans, Louisiana
- ⑦ 長井敏洋、杳名寿治、太田直司、海老原
吾郎、持田讓治
抗 VEGF ヒト化モノクローナル抗体
(Bevacizumab) による軟骨修復効果
第24回日本整形外科学会基礎学術集会
2009年11月6日 神奈川
- ⑧ T.Nagai, M. Sato, Furukawa. S. K,
Ushida. T, J. Mochida
Repair of articular cartilage with
scaffold-free chondrocyte plates.
8th world congress of the international
cartilage repair society
May 23-26, 2009 Miami, Florida

[図書] (計1件)

- ① K. Furukawa, M. Sato, T.Nagai, S. Ting,
J. Mochida, T. Ushida
Scaffold-free Cartilage Tissue by
Mechanical Stress Loading for Tissue
Engineering.
In Tech Tissue Engineering 409-428

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長井 敏洋 (NAGAI TOSHIHIRO)
東海大学・医学部医学科外科学系整形外科学
・助教
研究者番号：20514376