

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791739

研究課題名（和文） 静水圧を負荷した脂肪組織由来幹細胞による生体内軟骨再生

研究課題名（英文） Hydrostatic Pressure-Loaded Cartilage Regeneration using Adipose-Derived Stem Cells

研究代表者

小川 令（OGAWA REI）

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70398866

研究成果の概要（和文）：

in vitro の軟骨再生では、脂肪組織由来幹細胞、コラーゲンスポンジもしくはコラーゲンゲルの鑄型、TGF $\beta$ 、そして静水圧が重要であることが判明した。In vivo では持続的に静水圧などの力学的刺激が軟骨形態の維持に必要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

It was suggested that adipose-derived stem cells, collagen scaffolds, TGF $\beta$  and hydrostatic pressure are important for in vitro cartilage regeneration. However, it has also revealed that continuous mechanical forces are necessary to maintain the structure of implanted cartilage in vivo.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：再生医学、軟骨再生

## 1. 研究開始当初の背景

軟骨組織を生体外にて再生する場合、組織工学の三要素である細胞・鋳型・シグナルを最適化する必要があるが、まず細胞に関して基礎研究だけでなく臨床でも広く用いられているものが自家軟骨細胞である。自家軟骨細胞は培養開始後比較的早期から軟骨基質を産生し、軟骨組織の再生に最も適していると考えられるが、細胞増殖能は低く、大きな組織の再生には困難が伴い、また一般的に関節軟骨の非加重部がドナーとして用いられるため、その犠牲は少なくない。そこでわれわれは、自家の成体幹細胞である脂肪組織由来幹細胞に着目し、これを用いた軟骨再生を研究してきた。脂肪組織は全身の皮下至る所に存在するため、最も採取が容易で低侵襲であると考えられ、その増殖能および分化能は多くの報告にて証明されている。

一方、鋳型に関してはコラーゲンスポンジやゲルが汎用されており、われわれの *in vitro* の結果からも現時点では、軟骨再生に最も適していると考えている。シグナルに関しては幹細胞から軟骨細胞へと分化誘導するには TGF $\beta$  を含む軟骨分化誘導培地が必要である。

よって、脂肪組織由来幹細胞を用いた軟骨再生の既存の報告では、脂肪組織由来幹細胞とコラーゲンスポンジ・ゲルに、TGF $\beta$  を含む分化誘導培地を用いたものが多いが、間葉系幹細胞や軟骨細胞を用いたものに比べ、再生された軟骨基質の蓄積が不十分であったり、軟骨特異的遺伝子の発現が優れていないとされてきた。そのため、何らかの工夫が必要であると考えられてきた。

## 2. 研究の目的

軟骨組織が生体内で静水圧やせん断応力、浸透圧といった力学的刺激に常時影響を受けていることに着目し、軟骨細胞に分化誘導した脂肪組織由来幹細胞に、人為的に力学的刺激を負荷することを試み、その効果を確認する。現時点では *in vitro* における軟骨組織の再生を確認したのみで、生体内に移植した際に長期間形態や機能が維持されるか、また線維軟骨ではなく、硝子軟骨に近い組織学的構造が再生できるかは確認されていない。そこで、本研究ではあらかじめ体外で静水圧を加えた軟骨様生成物を動物に移植し、生体内における組織構築を解析する。

## 3. 研究の方法

静水圧を負荷するバイオプロセッサーを用い、コラーゲンスポンジに播種、もしくはコラーゲンゲルに懸濁した脂肪組織由来幹細胞の灌流培養を試みた。1 $\times$ 10<sup>6</sup>個のヒト脂肪組織由来幹細胞を、I型コラーゲン溶液に懸濁しパウチに入れ、細胞増殖培地 (DMEM + 10% FBS + 1% ABAM) にて24時間培養した後、バイオプロセッサーでの灌流培養を行った。バイオリアクター内では軟骨分化誘導培地を用いた (DMEM + 1% FBS + 1% ABAM + 10ng/ml TGF-beta1 + 1 $\times$ 10<sup>-7</sup>mol デキサメサゾン + 50ug/ml アスコルビン酸 + 1mM ピルビン酸ナトリウム + 40ug/ml l-プロリン)。静水圧は0-0.5 MPa, 0.5Hzの周期的負荷とし、灌流速度は0.1ml/min、37 $^{\circ}$ C、3%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>と設定した。実験対照群として、同じバイオリアクター内で静水圧負荷を行わない大気圧群を設定した。各群の軟骨形成状態を確認して計4週間培養した後、ウサギの背部皮下に移植後、1週ごとに組織学的解析・定量解析を行った。

#### 4. 研究成果

In vitro にて培養を開始してから 2 週間後より、両群ともに II 型コラーゲンをはじめとする軟骨組織特異的な細胞外マトリックスの蓄積を認めたが、静水圧負荷群は大気圧群に比べて優位にその蓄積量が多かった。また、静水圧負荷群では細胞数の減少が認められなかったが、大気圧群では、培養開始後 2 週間で細胞数がピークに達し、その後減少した。コラーゲンスポンジのみならずコラーゲンゲルでも同様の結果を得た。静水圧負荷が in vitro での軟骨再生に重要であることが示唆された。しかし、In vivo では、移植後早期に軟骨が吸収されてしまう例が散見され、in vitro でも静水圧をはじめとする力学的刺激が持続的に継続する必要性が判明した。

軟骨再生医療において、1. 細胞、2. 鋳型、3. シグナル、4. 環境因子が必要となるが、1.としてはヒトから大量に採取できるヒト脂肪組織由来幹細胞、2.としてはコラーゲンゲルもしくはスポンジ、3.としては TGF $\beta$ 、4.としては静水圧を含めた力学的刺激、が有用であることが示せた。今後は生体外で再生したこれらの組織を、いかに生体内で力学的刺激を負荷してその形態を維持するか、ということさらには大動物を使って研究していく必要があると考えられた。

#### 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 2 件)

- 1) 小川令, 黄晨昱, 佐野仁美, 赤石諭史, 宮崎邦夫, 百束比古, Orgill DP, 水野秀一.

形成外科学とメカノバイオロジー (機械生物学) -物理的刺激が創傷治癒や組織再生に与える役割-

日形会誌 32: 137-143, 2012.

#### 2) Ogawa R.

Recent Patents on Stem Cell-Mediated Cartilage Regeneration and Repair.

Recent Patents on Regenerative Medicine 1: 118-122, 2011.

doi: 10.2174/2210297311101010118

[学会発表] (計 3 件)

#### 1) Ogawa R.

Utilizing Adipose Stem Cells for Cartilage Regeneration in Plastic and Aesthetic Surgery. Aesthetic Asia 2011 (Singapore), 2011.9.

#### 2) Ogawa R.

Cartilage Regeneration Using Adipose-Derived Stem Cells.

The 1<sup>st</sup> International Conference on Adipose Tissue (Venice), 2011.12.

#### 3) 小川令.

創傷治癒・組織再生の方向性を転換する - 20 年後を考えた今、形成外科医にできる基礎研究とは -

第 20 回日本形成外科学会基礎学術集会 (東京), 2011.10.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小川 令 (OGAWA REI)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 70398866

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：