

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462806

研究課題名(和文) 吸収性ナノファイバーを応用した自家移植モデルにおける耳介形状軟骨の再生誘導

研究課題名(英文) Effect of nanofiber PGA in composite scaffolds with polypropylene for fabricating tissue engineered auricle

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの耳介形状軟骨の再生誘導の研究では、良好な軟骨再生と耳介特有の複雑な3次元形状を長期維持する2点が大きな課題として残されている。本研究では、良好な軟骨再生を誘導する目的でナノテクノロジー技術を導入し、ポリグリコール酸(PGA)不織布の繊維径が播種細胞効率および軟骨再生に及ぼす影響について検討を行った。その結果、平均繊維径が0.8～3μmの細径PGA不織布を用いることにより、軟骨再生は促進され、長期の3次元形状維持も良好となることが判明した。ナノテクノロジー技術を導入して作製した細径PGA不織布は、耳介形成手術における新しいオプションとして、将来重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In conventional studies on the regeneration of auricle-shaped cartilage in autogenous models using large animals, there were problems with the cartilage regeneration induction capacity and long-term retention of geometric shape. In this study, we sought to improve upon outcome in these regards: a non-woven fabric of polyglycolic acid (PGA) was developed through nanotechnology, evaluating the effect of nanofiber diameter on in vitro cell-seeding efficiency, and in vivo response after implantation in an autogenous large-animal model. Optimal cell maintenance and neocartilage response were seen with PGA fiber diameters of 0.8-3.0 μm for nano-fiber constructs. Biomechanical strength was optimal for PGA fiber diameters in the same mid-range. These findings demonstrate the potential for nano-scale modulation of auricle-shaped cartilage regeneration in a large-animal model.

研究分野：医歯薬学

キーワード：PGA ナノファイバー 耳介軟骨 再生誘導 自家移植

1. 研究開始当初の背景

Tissue engineering は、生分解性ポリマーに細胞および成長因子を組み合わせ、臨床的に使用可能な移植組織を再生誘導する技術であり、1988年 Vacanti らによって基本概念が提唱された。今日まで、さまざまな組織の再生誘導が試みられてきた。その中でも3次元硬組織の再生誘導、特にヒト外耳形状を有する軟骨の再生誘導は、極めて困難で挑戦的な分野の一つであり、未だに臨床応用可能な再生誘導技術は確立されていない。これまでの耳介形状軟骨の tissue engineering の基礎研究においては、PLGA、PGA、PCL、コラーゲン、ハイドロゲル(alginate、pluronic、fibrin gel)などの生体内分解吸収性の合成もしくは天然高分子を形状加工し、これらを播種細胞である軟骨細胞の足場材料として試用した数多くの研究がなされてきた。これら生体内分解吸収性の合成高分子において、PGA (ポリグリコール酸) は生体適合性に優れ、軟骨細胞との親和性(接着性)が高く、軟骨再生誘導における足場材料として長年の試用実績が知られている。しかし一般に使用されているPGA不織布(ネオベール®、平均繊維径 20 μm) は、播種細胞サイズに比較してPGA繊維径が大きく繊維間隔が広いこと、播種細胞がPGA繊維に接着することなく漏出し、細胞播種効率が極めて低いことが大きな問題点として指摘されてきた。

2. 研究の目的

この問題を解決するため、本研究では、PGAを本来の細胞外基質に近い微細構造をもつナノファイバーに加工・形成する技術を開発し、導入した。組織再生用の足場材料では、適応組織により最適な材料形状や繊維径が存在することが予測されるが、この点に関する報告は認められない。そこで種々の繊維径を持つ細径PGA不織布を作製し、*in vitro*において繊維径が細胞播種効率に及ぼす影響について比較検討した。一方、PGAは生体内

における加水分解が早い特性があり、そのため足場材料として力学的強度の不足が課題であった。そこで、体内への埋入が可能で、すでに外科領域のヘルニア根治術や頭頸部領域の気管再建に臨床応用され、その有効性と安全性が担保されているポリプロピレンを細径PGA不織布に組み合わせ力学的強度を補強した。このポリプロピレン補強による複合型スカフォールドを大動物(イヌ)自家移植モデルに導入して臨床試用が可能な大きさと3次元形状を有する耳介形状軟骨の再生誘導を試み、*in vivo*において細径PGA不織布が軟骨再生能および長期形状維持に及ぼす影響について検討した。

3. 研究の方法

ナノファイバーの代表的な3つの製造方法として、静電紡糸法(エレクトロスピニング法)、複合溶融紡糸法、メルトブロー法などが知られている。これらのナノファイバー製造法の中で、本研究ではメルトブロー法を用いて細径PGA不織布を作製した。溶融したPGAを、幅方向1m当り1,000個前後のノズルから高温・高速の空気流を作る押出機を用いて糸状に吹き出した。繊維状に延伸されたPGAをコンベアー上で集積し、その間に繊維同士の絡み合い及び融着を生じさせて、平均繊維径が0.5 μm 、0.8 μm 、3 μm 、および7 μm のポリグリコロイドからなる細径PGA不織布を作成した。一方、平均繊維径が20 μm の従来径PGA不織布は、紡糸された筒編み布をニードルパンチ法により不織布化する方法を用いて作成した。それぞれの群(0.5 μm 、0.8 μm 、3 μm 、7 μm 、および20 μm の5群)において、使用したPGA量は0.1g/25cm²、厚さは約300 μm であった。細径PGA不織布における体積密度(0.10~0.14g/cm³)および空隙率(90.5~93.4%)は、ほぼ一定の値を示した。一方、従来径PGA不織布の体積密度(0.23g/cm³)および空隙率(84.4%)は、細径PGA不織布に比較して高値であった。

(1) 実験A (in vitro): イヌ耳介軟骨細胞浮遊液をピペットにて細径 (0.5 μm 、0.8 μm 、3 μm 、7 μm) もしくは従来径 (20 μm) PGA 不織布の上面から滴下し、細胞播種した。軟骨細胞の最終播種濃度は 100×10^6 個/ml に調節した。次に、不織布内部への播種細胞の接着効率を高めるため、フィブリン (ボルヒール®、化学及血清療法研究所、熊本) を散布した。フィブリンの散布には、スプレーキット (ボルヒールスプレーキット、化学及血清療法研究所、熊本) を用い、送気圧を 0.75kgf/cm^2 に調整し、細胞播種の直後に不織布から 30cm 離して散布した。フィブリン散布をしない群をコントロールとした。細径および従来径 PGA 不織布における不織布内部の細胞播種効率を調べるため、フィブリン散布後、さらに 5 分間静置し、その後に不織布を 2.5% グルタルアルデヒドで固定した。標本を 2 分割して走査電顕および光顕 (トルイジンブルー染色) 標本を作製して播種細胞の密度および分布を検討した。播種細胞密度の検討では、細径および従来径 PGA 不織布に設定した任意の 30 領域における単位面積当たり ($10^4 \mu\text{m}^2$) の平均細胞数を計測した。

(2) 実験B (in vivo): 平坦型 (実験 B-1) および耳介型スカフォールド (実験 B-2) を用いて、細径 (0.5 μm 、0.8 μm 、3 μm 、7 μm) および従来径 (20 μm) PGA 不織布が軟骨再生誘導および長期形状維持に及ぼす影響について比較検討した。いずれの群も、実験 A と同様に、イヌ耳介軟骨細胞の最終播種濃度は 100×10^6 個/ml に調節した。次に、塩基性線維芽細胞増殖因子 (b-FGF) 徐を含浸させたゼラチン微粒子を投与して、細胞・スカフォールド複合体に徐放化システムを組み合わせた。その後、細胞播種効率を高めるためにフィブリン散布を行った。全身麻酔を行ない、耳介軟骨細胞を採取した個体と同一の個体に上記の処理を行った細胞・スカフォールド複合体を自家移植した。ポビドンヨード (イ

ソジン®、明治製薬株式会社、東京) で消毒を行った。10 万倍希釈エピネフリン添加塩酸リドカイン (エピレナミン含有キシロカイン 1% E®、アストラゼネカ株式会社、大阪) にて局所麻酔の後に頭頂から側頭部に切開を加え、筋膜間 (浅および深側頭筋膜間) に細胞・スカフォールドを自家移植した。閉創は、5-0 合成糸 (シグマ、東京) にて行った。移植後 5 および 20 週目に標本を採取し、肉眼的、組織学的および力学的検討を行った。

組織学的検討: 採取した標本は 10% ホルマリン固定した。エタノール系列により脱水してパラフィンブロックを作製し、ミトクローム (LEICA SM2000R) にて厚さ 3 μm で薄切した。染色は、HE 染色 (一般性状) および Safranin O 染色 (プロテオグリカン産生能) を行った。

力学的検討: 再生軟骨の特徴である弾力性を客観評価するため平坦型スカフォールドを用いた再生軟骨の曲げ強度を測定した。Roy らの方法に従い、オートグラフ (AG-IS、島津製作所、京都) のグリッパ距離を 1cm に調整した。その後、標本 (20mm x 5mm) を台座に固定し、垂直板を 0.02mm/sec の速度で下降させて最大試験力を計測した。あらかじめ計測した標本の厚さから、曲げ強度を算出した (曲げ強度 = 最大試験力 / 標本の厚さ)。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。

4. 研究成果

(1) 実験 A: 繊維径が細胞播種効率に及ぼす影響した。細径 PGA 不織布の中で、0.5 μm 群では播種細胞が不織布表面に積み重なり、不織布内部には浸透していなかった。一方、従来径 PGA 不織布である 20 μm 群では、播種細胞が繊維束周辺に散在性に分布し、いったん不織布内部に浸透した播種細胞の多くは不織布に接着することなく不織布より漏れ出した。これらの結果より、0.5 μm 群および

20 μm 群では、播種細胞は不織布の外部に分布し、不織布内部における細胞密度は有意に低いことが判明した。一方、0.8 μm 群、3 μm 群、および7 μm 群では、播種細胞が不織布内部において比較的均一に分布し、有意に高い細胞密度が観察された。不織布内部の細胞密度が最も低い群は0.5 μm 群であった。播種細胞密度および分布より細胞播種効率を検討した結果、細径PGA不織布の細胞播種効率は平均繊維径が0.8~7 μm の場合に高いことが判明した。フィブリン散布が細径および従来径PGA不織布の細胞播種効率に与える影響について検討した。その結果、20 μm 群においては、フィブリン散布によりPGA不織布内部の細胞密度が高まるが、細径PGA群におけるフィブリン散布の有効性は確認されなかった。

(2)実験 B-1: 平坦型スカフォールドにおいて細径PGA不織布が軟骨再生能および形状維持に及ぼす影響を検討した。移植後20週目における肉眼および組織所見では、移植後5週目の肉眼所見と同様にすべての群において移植前のスカフォールド形状とサイズは維持されていた。組織学的検討より、細径PGA群の標本断面において均一で良好なプロテオグリカン産生が認められた。一方、従来型PGA不織布のプロテオグリカン産生は不均一で不良であった。力学的検討の結果、移植後5週目に摘出した再生軟骨の標本では、0.8 μm 群の曲げ強度は高値を示し、一方、0.5 μm 群では著しい低値を示した。さらに移植後20週目に摘出した再生軟骨の標本では、0.8 μm 群および3 μm 群の曲げ強度は8N以上の高値を示し、他の細径および従来径PGA不織布と比較して有意に高い力学的特性が認められた。これらの結果から、平坦型スカフォールドにおいて良好な力学特性を有する軟骨を再生誘導するための至適なPGA不織布の平均繊維径は、0.8~3 μm であることが示唆された。また、0.8 μm 群が最も高い力学強度を示し、組織学的評価の結果と一致した。

(3)実験 B-2: 耳介型スカフォールドにおいて細径PGA不織布が軟骨再生能および長期形状維持に及ぼす影響について検討した。移植後5週目においては、細径および従来径PGA不織布の群において、肉眼的な差異は観察されなかった。一方、移植後20週目では、PGA不織布の平均繊維径が0.8~3 μm の範囲にある場合、耳介形状を有する軟骨の再生誘導が促進された。特に0.8~3 μm 群では、3次元ヒト耳介型スカフォールドの表面に白色色調や光沢が観察され、ヒト耳介特有の輪郭形状がより明瞭に表現された。組織学検討の結果、移植後5週目の耳介型スカフォールドでは、すべての細径および従来径PGA不織布の群において、耳介の陥凹部(ベースフレーム)部にSafranin O染色陽性領域を認めたが、凸部(耳輪および対耳輪)における陽性反応は不十分であった。移植後20週目において、0.8~3 μm 群では、耳介型スカフォールドの凸部と陥凹部を含めたすべての領域に軟骨形成が観察された。一方、0.5 μm 群および20 μm 群では、耳介型スカフォールドの表面に軟骨形成が観察されたが、スカフォールド内部は結合組織の増生が観察された。この結果、PGA不織布に軟骨細胞を播種した場合、不織布の平均繊維径が0.8~3 μm において耳介軟骨の軟骨再生が促進され、3次元形状維持も良好となることが判明した。

(4)本研究では、ナノテクノロジーを応用した足場材料の開発に焦点を絞って研究を進め、大動物(イヌ)を用いた自家移植モデルにおいてナノファイバー技術を導入した新たな軟骨再生誘導法を開発し、その有用性について検討した。一般にナノファイバーは、繊維径が細いほど表面積は飛躍的に大きくなり、これにより細胞接着性が向上する特徴が知られている。さらにナノファイバーの繊維間隔が狭いため、細胞が繊維間でトラップされやすく、細胞は網渡りをするように伸展してナノファイバー上に接着するため細胞

接着性がさらに高まったとする報告もある。今回の実験 A (in vitro) では、従来径 PGA 不織布において最大の課題であった細胞漏出は、いずれの細径 PGA (0.8~7 μ m) 群においても肉眼的には観察されず、不織布内部の細胞密度と分布は良好に保持され、細胞播種効率は著しく向上した。一方、0.5 μ m 群は繊維間隔が狭く、播種細胞は不織布外に集積した。この結果より、PGA 繊維径と細胞接着性の間には相関があり、繊維径を調整することで細胞間隔が変化し、PGA 不織布内部の細胞濃度を制御できる可能性が示唆された。実験 B (in vivo) では、直径の異なる (0.5~7 μ m) ナノファイバーPGA からなる極細繊維集合体を新たな細胞供給源として用い、これらをポリプロピレンと併用して力学強度を高めた 2 種類の複合型スカフォールド (平坦型および耳介型) を足場材料として試用した。その結果、足場材料の中央部における播種細胞濃度は著明に高まり、新生軟骨を経時的に足場材料の中央部から周辺部に再生誘導することが可能となった。再生軟骨の力学強度は移植後 20 週目において約 8N となった。これまでの報告によると、皮下組織内圧は 6N であり、獲得された力学強度によって、耳介型スカフォールド本来の 3 次元形状は長期間にわたり良好に維持される可能性が推測された。

5 . 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 2 件)

Shasti M, Jacquet R, McClellan P, Yang J, Matsushima S, Isogai N, Murthy A, Landis WJ. Effects of FGF-2 and OP-1 in vitro on donor source cartilage for auricular reconstruction tissue engineering. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 査読有 78(3), 416-422, 2014.

Y.Itani ,S.Asamura, M.Matsui, Y.Tabata, N.Isogai. Evaluation of Nanofiber-Based Polyglycolic Acid Scaffolds for Improved Chondrocyte Retention and In Vivo Bioengineered Cartilage Regeneration. Plastic Reconstructive Surgery. 査読有 133(6), 805e-813e, 2014

〔学会発表〕(計 7 件)

磯貝典孝, 臨床応用に向けた軟骨再生誘導における現状と注意点 (ガイドライン), 京都リサーチパーク主催 H27 年度再生医療解説講座 2016.01.19 「京都リサーチパーク (京都府・京都市)」

磯貝典孝, 組織工学を用いた形成外科領域の再生誘導 第 36 回日本炎症・再生医学会 2015.07.21 「虎ノ門ヒルズフォーラム (東京都)」

中尾仁美, 福田智一, 平野成彦, 西脇 仁, 磯貝典孝, OP-1 徐放化システムを併用してヒト耳介軟骨細胞を誘導した再生軟骨の長期移植成績 第 4 回 DDS 再生医療研究会 2014.12.06 「日本歯科大学 (東京都)」

田畑泰彦, 磯貝典孝, ホンネで語る再生医療ビジネス-再生医療へのモノづくりの挑戦 - 第 13 回日本再生医療学会 2014.03.05 「国立国際会議場 (京都府・京都市)」

磯貝典孝, bFGF 徐放システムを利用した組織再生のフロントライン 第 13 回日本再生医療学会 2014.03.04 「国立国際会議場 (京都府・京都市)」

磯貝典孝, bFGF を利用した組織再生の front line 第 40 回日本マイクロサージャリー学会 2013.09.27 「いわて県民情報センター (岩手県・盛岡市)」

N.Isogai, Advancement of tissue engineering research and the perspective for clinical application in plastic and reconstructive surgery, International Conference in Medicine and Public Health(ICMPH2013)2013.06.27 「Bangkok(Thailand)」

〔図書〕(計 1 件)

伊谷善仁, 中尾仁美, 磯貝典孝 {分担執筆} 再生医療 b-FGF 徐放システムを導入した軟骨移植法 ここまで広がるドラッグ徐放技術の最前線 古くて新しいドラッグデリバリーシステム (DDS) 173-176, 2013.

〔産業財産権〕 出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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

楠原 廣久 (KUSUHARA Hirohisa)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：50388550

諸富 公昭 (MOROTOMI Tadaaki)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：10388580

(3) 連携研究者

()

研究者番号：