

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04600

研究課題名(和文)体性幹細胞の同種他家移植による新たな骨軟骨再生治療法の開発

研究課題名(英文)Osteochondral regeneration using allogenic implantation of somatic stem cell

研究代表者

三角 一浩 (MISUMI, Kazuhiro)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教授

研究者番号：10291551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：ミニブタの脂肪組織由来間葉系幹細胞(AT-MSC)の凝集塊をバイオプリンターを用いて積層し、人工足場のない三次元構造体を作成した。これを大腿骨内側顆の骨軟骨欠損孔に自家移植または他家移植し、術後の画像診断と病理学的検査を行った。構造体を移植しない欠損孔を対照とした。術後のCT画像から求めた欠損孔のX線透過容積は、他家移植に比べて自家移植において有意に縮小しており、他家移植の欠損孔では軟骨下骨の再生遅延が示唆された。MR画像及び病理組織標本のトータルスコアにおいても、他家移植よりも自家移植の方が有意に高値を示した。AT-MSCの三次元構造体の他家移植は、骨軟骨再生を遅延させる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Regeneration of articular cartilage and subchondral bone using scaffold-free constructs composed of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (AT-MSCs) using bio three-dimensional (3D) printer was evaluated in minipigs. Osteochondral defects created in medial chondyles of femurs were implanted by autologous construct (autologous implantation), allogenic construct (allogenic implantation), and no construct (controls). Post-surgical computed tomography demonstrated the delayed regeneration of subchondral bone in allogenic implantation, since the radiolucent volume of defects significantly decreased in the autologous implantation comparing to allogenic implantation. Also, total scores of either the magnetic resonance image or histopathology were significantly higher in the autologous implantation than the allogenic implantation. Allogenic implantation of scaffold-free 3D-constructs of AT-MSCs could delay the regeneration in osteochondral defect comparing to autologous implantation.

研究分野：獣医外科学

キーワード：幹細胞 軟骨 骨 移植 再生

1. 研究開始当初の背景

これまでに我々は、ブタの脂肪組織由来幹細胞 (adipose tissue derived mesenchymal stem cell; AT-MSC) を用いて、U底ウェル内でスフェロイド集塊とし、それらを円柱状の鋳型内で積層して癒合させた移植構造体を作製し、骨軟骨欠損孔へ同種移植して組織再生を評価する研究を行った。ブタの膝関節非荷重面 (大腿骨滑車溝) への自家移植試験では、細胞移植後の X 線 CT 検査によって、軟骨下骨の再生を示唆する結果を得た。また膝関節荷重面 (大腿骨内側顆) への移植試験では、細胞移植後の X 線 CT 及び MRI 検査によって、軟骨下骨のみならず関節軟骨の再生 (MRI で軟骨ラインの再生) を認めた。同部位の病理組織検査では、軟骨内骨化による軟骨下骨の形成と関節軟骨による再被覆が速やかに進行するという結果を得た。

このように、骨軟骨欠損に体性幹細胞を立体構造体として移植することで元来の組織が再生できることが少しずつ明らかになってきたが、この治療方法を実際の動物や人の医療へと実用化するために、以下『**3つの課題**』を解決しなければならないと考えた。

① **移植構造体の品質安定化**: 幹細胞凝集塊を積層して一定時間を置くと、個々の凝集塊は相互に癒合していく。従来法である鋳型やストロー内での積層では、重力に依存して凝集塊同士の癒合パターンが不規則・無作為となり、癒合が強固な部分と薄弱な部分が混在する可能性がある。凝集塊を規則的に配置して、凝集塊相互の癒合パターンを均一化する必要がある。

② **移植構造体の取扱い易さ、形状の多様化への対応**: 凝集塊同士の癒合が薄弱で全体的に脆い移植構造体は、取扱いの際に壊れやすく、移植手術中に極めて慎重な操作を求められる。拇指鑷子で保持できる程度の強度を有する構造体をめざして、凝集塊間の癒合を強化する必要がある。また組織欠損部の形状に合わせたオーダーメイドの移植構造体の作製も求められているが、従来法では、構造体を積層する前に、様々な形状の鋳型を準備しなければならない。鋳型作製に要する時間は更なる治療の遅れにつながることから、病変部の形状に合わせて凝集塊を速やかに立体配置し、構造体を作るシステムが必要である。

③ **受傷または OA 診断から細胞治療までの時間 (期間) の短縮**: 自己由来幹細胞移植による骨軟骨の再生治療では、幹細胞の分離・培養、及び移植構造体作製の工程に 1~2 ヶ月間を要する。また患者の年齢や栄養条件から十分な幹細胞源を確保できない場合もある。細胞採取・移植のための二度にわたる手術侵襲を減じ、幹細胞移植構造体を速やかに供給するシステムを構築するために、同種他家移植による骨軟骨再生の研究を進めなければならない。

2. 研究の目的

本研究では、体性幹細胞移植による骨軟骨再生治療法の動物医療における実用化を目標として、以下の試験を実施した。

① 移植構造体の品質安定化、取扱い易さ、形状の多様化への対応を目的に、従来法とは全く異なり、バイオ 3D プリンターを用いて体性幹細胞凝集塊を立体配置して構造体を作製し、それを実験動物モデルに移植して、骨軟骨の再生を観察する。

② 関節破壊が診断された後、できるだけ速やかに移植構造体を供給できるシステムの構築を目標に、主要組織適合性遺伝子複合体のクラス分類が明らかにされている実験用ミニブタ品種を用いて、白血球抗原 (Swine Leukocyte Antigen, SLA) が適合した個体間での同種他家細胞移植による骨軟骨再生を検討する。

3. 研究の方法

【実験 1】バイオ 3D プリンターによる高弾性の移植構造体の作成、及びブタの膝関節非荷重面 (大腿骨滑車溝) への自家移植後の骨軟骨再生の検証。

ミニブタ (5 頭) の頸部皮下から採取した脂肪組織を酵素処理した後に、AT-MSC を分離・培養し、スフェロイドを形成させた。スフェロイドは、バイオ 3D プリンターを用いて積層し、移植構造体とした。AT-MSC (6.5×10^7 個以上) を用い、96 穴プレートの 1 ウェルあたり 1.0×10^4 個の AT-MSCs を完全培養培地①に懸濁して播種した。このプレートをインキュベーター内にて 24 時間静置した後、各ウェルにそれぞれ完全培養培地②を $100 \mu\text{l}$ ずつ静かに加え、さらに 24 時間静置し、各ウェルの底部に直径約 $500 \mu\text{m}$ の球状スフェロイドを形成させた。バイオ 3D プリンターを用いて、縦横 13×13 本、及び 9×9 本のいずれも正方形に配置した剣山に、円筒形となるようにスフェロイドを 1 つずつ刺し、積層させた (図 1)。

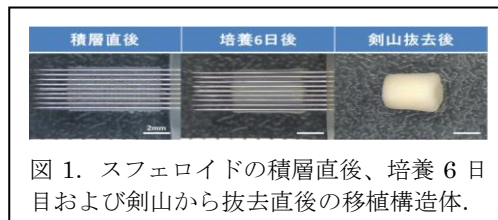


図 1. スフェロイドの積層直後、培養 6 日目および剣山から抜去直後の移植構造体。

スフェロイドはやがて融合し、剣山に固定された大小 2 つの円筒形の構造体 (大きい円筒: 高さ 4.5mm × 直径 5.5mm 、小さい円筒: 高さ 4.5mm × 直径 3.5mm) が形成された。移植直前に 2 つの円筒をそれぞれ剣山から抜去した。手術用の拇指鑷子で掴む等の取扱い操作によって破損しない、高弾性の構造体が完成した (図 2)。またこれらの構造体を、ヘマトキシリン・エオジン染色、サフラニン O・ファストグリーン染色、エラスチカマッソン染色、Tunnel 染色、I 型コラーゲン、及び

II型コラーゲンの免疫染色を行った。

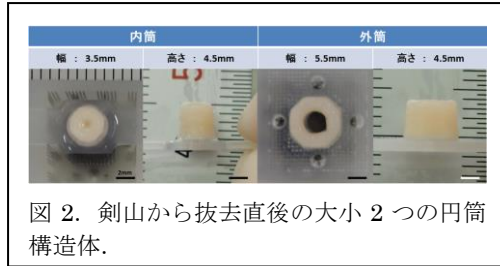


図 2. 剣山から抜去直後の大小 2 つの円筒構造体。

動物は全身麻酔下で、両膝関節の大腿骨滑車溝に直径 5.5 mm×深さ 5 mmの骨軟骨欠損孔を作出し、右側の欠損孔には大小 2 つの円筒形構造体をそれぞれ外内筒となるようにして移植（移植肢）とした（図 3）。一方、左側は無処置（対照肢）とした（図 3）。術後 0、3 及び 6 カ月目に CT 検査にて骨再生の定量的評価を行った。術後 6 カ月目には、MR 検査（Modified-2D MOCART スコアシステム）による軟骨再生の評価の後、剖検を実施した。関節表面の病理学的肉眼及び病理組織学的評価（ICRS スコアシステム）にて骨軟骨の再生を評価した。

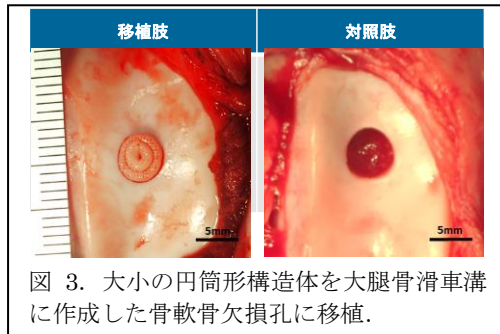


図 3. 大小の円筒形構造体を大腿骨滑車溝に作成した骨軟骨欠損孔に移植。

【実験 2】 バイオ 3D プリンターによる高弾性の移植構造体の他家移植によるブタの膝関節荷重面（大腿骨遠位内側顆）骨軟骨欠損孔における組織再生の検証。

ミニブタ（10 頭）の頸部皮下から採取した脂肪組織を酵素処理した後に、AT-MSC を分離・培養し、実験 1 の手法にしたがって、大小 2 つの円筒形の高弾性構造体を作成した。

実験 1 と同じく、動物は全身麻酔下で、両膝関節の大腿骨遠位内側顆に直径 6.0 mm×深さ 5.0 mmの骨軟骨欠損孔を作出した。欠損孔には、自家由来または他家由来の大小 2 つの円筒形構造体をそれぞれ外内筒となるようにして移植（自家または他家移植肢）した。これまでと同様に、構造体を移植しない欠損孔を対照肢とした（図 4）。術後 0、3 及び 6 カ月目に CT 検査にて骨再生の定量的評価を行った。術後 6 カ月目には、MR 検査による軟骨再生の評価の後、剖検を実施した。関節表面の病理学的肉眼評価、及び病理組織学的評価にて骨軟骨の再生を評価した。

なお、他家移植では、ドナー及びレシピエントのブタの SLA を事前に評価し、適合及び不適合の個体間での同種他家細胞移植について検討した。

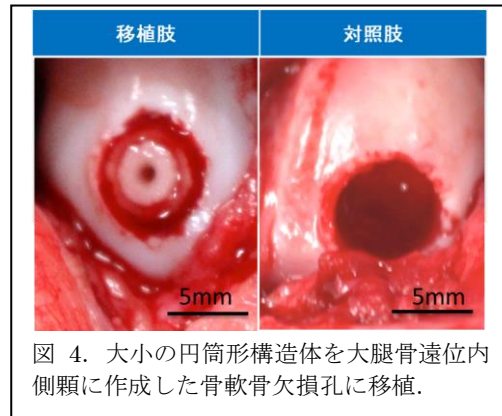


図 4. 大小の円筒形構造体を大腿骨遠位内側顆に作成した骨軟骨欠損孔に移植。

4. 研究成果

【実験 1】高弾性構造体の作成と移植の結果

バイオ 3D プリンターを用いて、剣山上にスフェロイドを積層した直後の構造体の高さは 7.0mm であったが、培養 6 日目には 5.5mm、剣山から抜去直後は 4.5mm と縮小した。構造体の表面は、次第に滑らかとなり、スフェロイド間の境界は見られなくなった。構造体は高弾性であり、手術用鑷子で抓むことによっても壊れない強度を有していた。弾性構造体の組織染色の結果を図 5 に示した。

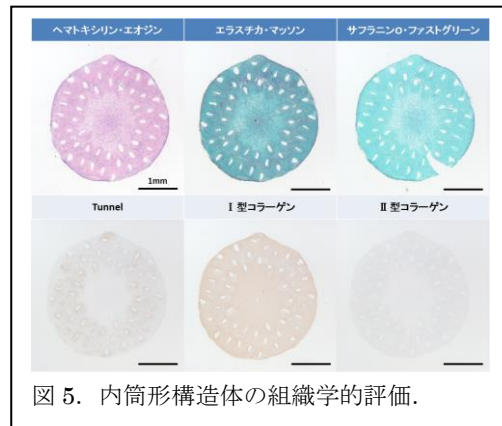


図 5. 内筒形構造体の組織学的評価。

ヘマトキシリン・エオジン染色により、構造体内部における AT-MSC の位置が明らかであった。スフェロイドを積層直後に構造体は円筒状であったが、6 日間の培養後はプラグの中心部にも細胞が位置しており、中空部分は縮小していた。積層直後はスフェロイド間の境界線も病理組織学的に消失していた。エラスチカマッソン染色では、構造体全体にわたり膠原線維が淡緑～淡青色、そして、部分的に弾性線維が黒紫色に染色されていた。サフラン O・ファストグリーン染色では、構造体全体が淡青色に染色されていた。アポトーシス及びネクローシスに陥った細胞を標的とする Tunnel 染色では、構造体全域にわたってほとんど染色されなかったが、積層の支柱となる剣山の針に接触する部分においてのみ、わずかに陽染された。I 型コラーゲンに対する免疫染色では、剣山の針周囲に位置していた領域を除いて陽染を認めた。一方、II 型コラーゲンに関しては、構造体全域にわたって殆ど陽染されなかった。

手術後の CT 検査では、移植肢において、欠損孔における軟骨下骨の増生を示唆する X 線不透過領域の増加を認めた。一方、対照肢においても軟骨下骨の増生を認めたものの、手術後 6 カ月目において、移植肢よりも X 線透過領域が広く残存していた (図 6)。より客観的な指標に基づいて骨再生を評価するために、CT 画像を用いて、軟骨下骨の欠損部に相当する X 線透過領域の容積を定量した。各個体の骨組織としての CT 値の最小値を定め、それよりも低い領域 (X 線透過領域) を軟骨下骨欠損部と判断して、矢状断面画像において、骨欠損部を含むすべてのスライス平面画像 (スライス幅約 0.5mm) について、骨欠損部の面積を求め、それらを積分することによって骨欠損部容積を求めた。術後 0 カ月における骨欠損部容積を 100%としたときの容積比率の平均値は、術後 3 及び 6 カ月後のいずれにおいても、対照肢と比較して、移植肢で有意に減少していた (図 6)。

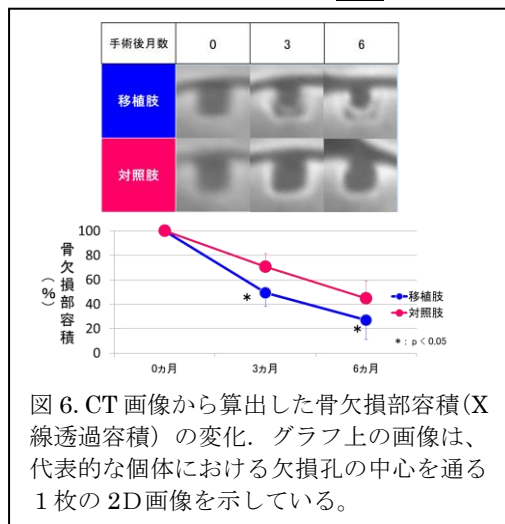


図 6. CT 画像から算出した骨欠損部容積 (X 線透過容積) の変化. グラフ上の画像は、代表的な個体における欠損孔の中心を通る 1 枚の 2D 画像を示している。

術後 6 カ月の MR 画像を基に、MOCART スコアによる軟骨再生の評価 (表 7) を行ったところ、6 つ評価項目 (欠損の充填率、辺縁との癒合、軟骨表面の滑らかさ、構造物の均一性、シグナル強度、及び軟骨下骨)、及び各項目の合計得点において、対照肢よりも移植肢の方が高値を示した。その中でも、関節表面の滑らかさとシグナル強度の 2 項目、及び合計得点において、両群間に有意差が認められた。

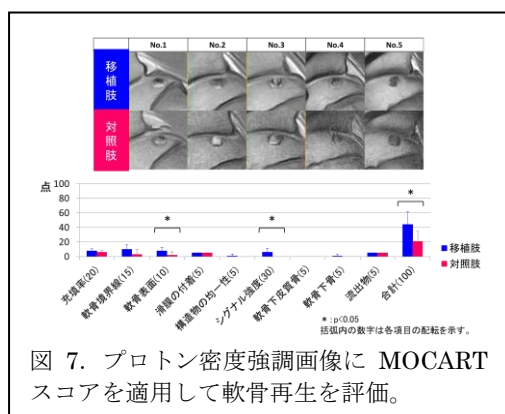


図 7. プロトン密度強調画像に MOCART スコアを適用して軟骨再生を評価。

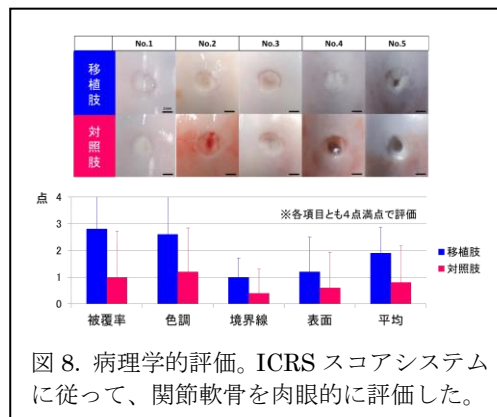


図 8. 病理学的評価。ICRS スコアシステムに従って、関節軟骨を肉眼的に評価した。

術後 6 カ月の MR 撮影終了後、病理解剖を実施した。図 8 に示すように、No. 1 を除いて、移植肢の方が、対照肢よりも新生軟骨によって窪みが再充填されていた。関節表面の肉眼的評価を ICRS スコアシステムに従って、新生軟骨の被覆率、色調、周囲の正常軟骨との境界、表面の滑らかさについて点数化した。各項目の平均値は、いずれも対照肢に比べて移植肢で高い値を示したものの、統計的な有意差は見出せなかった。

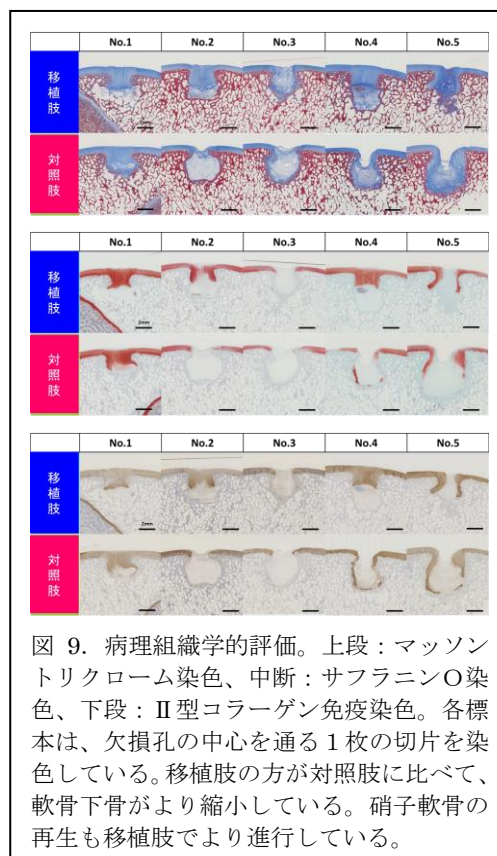


図 9. 病理組織学的評価。上段：マッソントリクローム染色、中斷：サフラニン O 染色、下段：II 型コラーゲン免疫染色。各標本は、欠損孔の中心を通る 1 枚の切片を染色している。移植肢の方が対照肢に比べて、軟骨下骨がより縮小している。硝子軟骨の再生も移植肢でより進行している。

組織学的評価の結果を図 9 に示す。全ての個体において、中心部を通る病理組織切片では、対照肢に比べて移植肢の方が軟骨下骨の縮小がより明らかであった。加えて、関節軟骨の再生を示唆するサフラニン O 及び II 型コラーゲン免疫染色に陽性反応を示す硝子軟骨の出現が、対照肢に比べて移植肢において多く認められた。これらの組織所見を ICRS 組織スコアシステムに従って点数化した (図

10)。軟骨表面の連続性、基質、細胞の分布、細胞の生存率、軟骨下骨の形成の5項目、及び各項目の平均スコアにおいて、移植肢は、対照肢に比べて高値を示した。軟骨基質のスコアにおいてのみ、統計的な有意差を認めた。

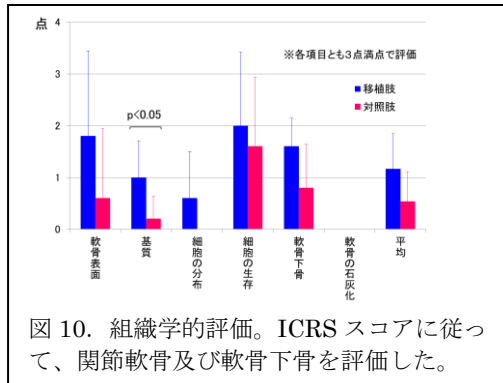


図 10. 組織学的評価。ICRS スコアに従って、関節軟骨及び軟骨下骨を評価した。

小括：実験 1 では、バイオ 3D プリンターを用いて作成した AT-MSC の高弾性構造体を自家移植することにより、関節非荷重面における軟骨下骨の再生が促進されることが画像データの定量的評価により明らかとなった。一方、関節軟骨に関しては、組織再生が最も遅れると考えられる欠損孔中心を通る 1 つの断面画像による評価ではあったものの、MOCART スコアと ICRS スコアのいずれにおいても、対照肢よりも移植肢の方が有意に高値を示す項目を認め、関節軟骨の再生についても高弾性構造体移植によって促進されることが示唆された。

【実験 2】高弾性構造体の他家移植の結果

実験 1 と同様、CT 画像から求めた骨欠損部容積は、術後 0 ヶ月における値を 100%としたときの容積比率として評価した。自家移植肢、対照肢、他家移植肢の順で骨欠損部容積の縮小が促進されており、移植後 6 ヶ月において自家移植と他家移植の間に統計的有意差が認められた (図 11)。

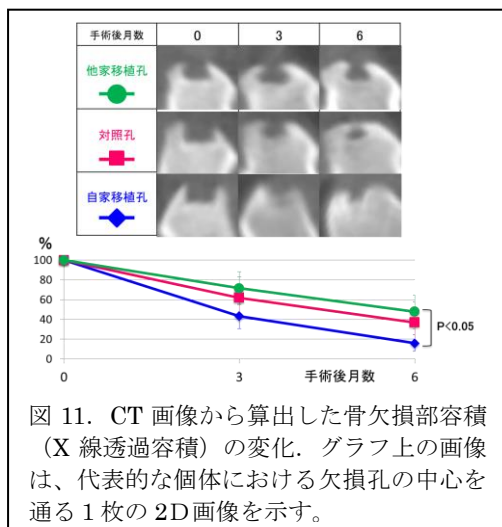


図 11. CT 画像から算出した骨欠損部容積 (X 線透過容積) の変化。グラフ上の画像は、代表的な個体における欠損孔の中心を通る 1 枚の 2D 画像を示す。

MR 画像の評価 (図 12) では、自家移植肢においてのみ、表層に滑らかな軟骨シグナル (図 12 では、表層の赤色をつけた部位) が再現されていた。同画像の定性的なスコア評

価では、欠損部の充填率、周囲の正常軟骨との境界線、及び合計点数において、対照及び他家移植肢よりも自家移植肢は高値を示し、他家移植肢と自家移植肢の間において統計的に有意差が認められた。

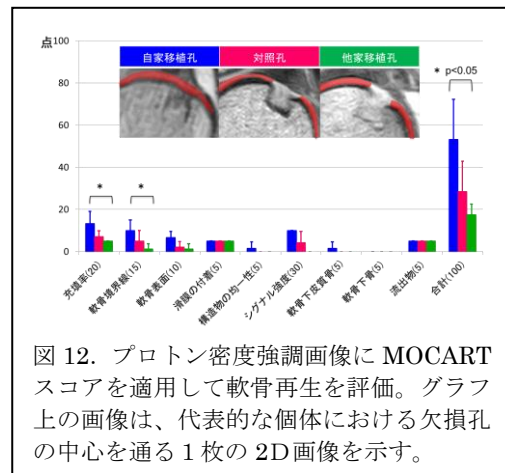


図 12. プロトン密度強調画像に MOCART スコアを適用して軟骨再生を評価。グラフ上の画像は、代表的な個体における欠損孔の中心を通る 1 枚の 2D 画像を示す。

手術後 6 ヶ月で実施した病理学的検査の肉眼所見では、自家移植肢において欠損孔表面が滑らかに再生されていた一方で、対照及び他家移植では明らかな陥凹が認められた。画像の定性的なスコア評価では、全項目において、自家移植 > 対照 > 他家移植の順で、高得点を示した。しかし、いずれの項目においても有意差は認められなかった (図 13)。

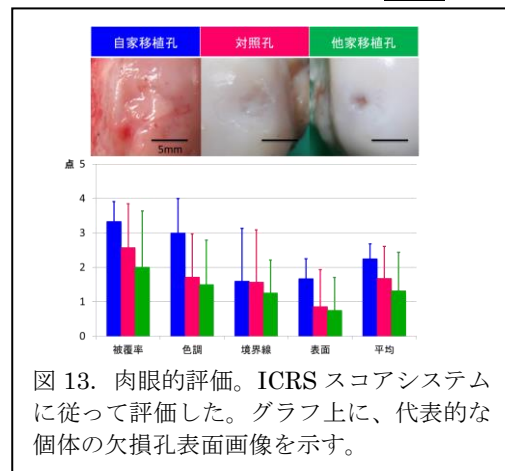


図 13. 肉眼的評価。ICRS スコアシステムに従って評価した。グラフ上に、代表的な個体の欠損孔表面画像を示す。

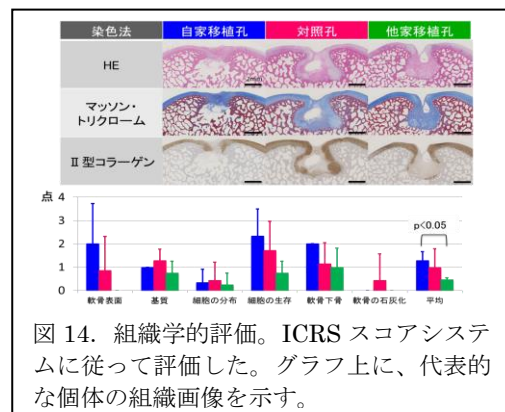


図 14. 組織学的評価。ICRS スコアシステムに従って評価した。グラフ上に、代表的な個体の組織画像を示す。

病理組織学的評価 (図 14) では、CT 画像と一致して、自家移植肢において、軟骨下骨の再生が最も進行していた。また対照及び他家移植肢では表面の陥凹が大きい一方で、自

家移植肢においては表面が新生軟骨によって滑らかに再被覆されていた。画像の定性的スコア評価では、軟骨表面、細胞の生存、軟骨下骨の形成、及び全項目の点数の平均値において、自家移植肢は、対照及び他家移植肢と比較して高値を示した。全項目の点数の平均値においてのみ、他家移植肢と自家移植肢との間に有意差が認められた。

小括：実験 2 では、自家移植肢において、軟骨下骨及び関節軟骨の再生が促進された。他家移植肢では、むしろ骨軟骨の再生は対照肢よりも遅延する傾向にあった。この結果は、移植後の免疫拒絶反応により、構造体を一旦完全に排除した後に自然修復へと向かう工程を示唆していた。SLA の一致した個体間での結果も同様であったことから、他家移植では、今後、手術後のより強力な免疫抑制の使用が必要と考えられた。しかしそれらが実用的な手法として整形外科領域において臨床的に認知されるのは難しいかもしれない。

本研究結果から、3D バイオプリンターを用いて AT-MSC 凝集塊を積層させて創り上げた高弾性構造体は、骨軟骨欠損孔に自家移植することによって組織再生を促すことが再現性をもって明らかにされた。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 10 件)

1. 村田大紀、三角一浩、中山功一. 獣医学領域での運動器再生への試み. 第 160 回日本獣医学会, 2017.
2. 重信幸宇也、村田大紀、須永隆文、宋丹丹、國富芳博、原田香織、中山功一、三角一浩. バイオ 3D プリンターを用いて作製したブタ脂肪組織由来間葉系幹細胞の立体構造体による骨軟骨再生に関する研究. 第 160 回日本獣医学会, 2017.
3. 村田大紀、山崎淳史、松崎翔大、須永隆文、宋丹丹、國富芳博、原田香織、中山功一、三角一浩. ブタ脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いてバイオ 3D プリンターで作製した立体構造体による骨軟骨再生. 第 16 回日本再生医療学会総会, 2017.
4. Murata D, Tokunaga S, Akieda S, Nakayama K, Setoyama K, Fujiki M, Misumi K. Osteochondral regeneration of the loading-bearing site using a scaffold-free 3D construct of swine AT-MSCs. The 13th ICRS (International Cartilage Repair Society) World Congress, 2016.
5. Yamasaki A, Matsuzaki S, Murata D, Sunaga T, Tantan S, Kunitomi Y, Harada K, Nakayama K, Misumi K. Osteochondral regeneration by implanting a scaffold-free 3D construct of swine AT-MSCs using a bio 3D printer. The 13th ICRS (International Cartilage Repair Society) World Congress, 2016.
6. 村田大紀、徳永暁、秋枝静香、中山功一、瀬戸山健太郎、藤木誠、三角一浩. ブタ脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた 3 次元立体細胞構造体による膝関節荷重面の骨軟骨再生. 第 159 回日本獣医学会, 2016.
7. 山崎淳史、松崎翔大、村田大紀、須永隆文、宋丹丹、國富芳博、原田香織、中山功一、三角一浩. バイオ 3D プリンターを用いて作製したブタ脂肪組織由来間葉系幹細胞の三次元構造体による骨軟骨再生. 第 15 回日本再生医療学会総会, 2016.
8. 村田大紀、徳永暁、秋枝静香、藤木誠、中山功一、三角一浩. ブタ脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いて作製した 3 次元立体細胞構造体による膝関節荷重面の骨軟骨再生. 第 15 回日本再生医療学会総会, 2016.
9. Murata D, Tokunaga S, Akieda S, Fujiki M, Nakayama K, Misumi K. Osteochondral regeneration using a scaffold free three-dimensional construct of swine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. The 4th TERMIS (Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society) World Congress, 2015.
10. Murata D, Akieda S, Misumi K, Nakayama S. Osteochondral regeneration with scaffold free 3D-structure consisting of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in pigs. The 12th ICRS (International Cartilage Repair Society) World Congress, 2015.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三角 一浩 (MISUMI Kazuhiro)
鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教授
研究者番号：10291551

(2) 研究分担者

須永 隆文 (SUNAGA Takahumi)
鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・助教
研究者番号：90649112

(3) 研究分担者

中山 功一 (NAKAYAMA Kouichi)
佐賀大学・医学部・特任教授
研究者番号：50420609

(4) 研究分担者

瀬戸山 健太郎 (SETOYAMA Kentaro)
鹿児島大学・学内共同利用施設等・准教授
研究者番号：00372805

(5) 研究分担者

藤木 誠 (FUJIKI Makoto)
鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授
研究者番号：60305167