

令和元年9月3日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10951

研究課題名(和文) FGF2徐放ヒアルロン酸スポンジを用いた軟骨組織再生誘導デバイスの開発

研究課題名(英文) Development of cartilage tissue regeneration induction device using FGF2 slow release hyaluronic acid sponge

研究代表者

山岡 尚世 (Yamaoka, Hisayo)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：10444085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではより簡便な方法で内部の基質が均一な軟骨組織を作製することを目指した。足場にはすでに臨床現場で使用されているアルギン酸、ヒアルロン酸、FGF2製剤を用いた。ヒアルロン酸ゲルとFGF2とを混和し凍結乾燥させることによりFGF2徐放性スポンジを作製した。細胞はヒト軟骨より単離した軟骨細胞を使用した。細胞をアルギン酸ゲルと混和し、FGF2徐放性スポンジを包埋した。溶出試験によりFGF2の徐放を確認した後、ヌードマウスの背部皮下に移植した。60日後に摘出し軟骨再生の指標となるII型コラーゲン、グリコサミノグリカンのタンパク定量および組織学的検討をしたところ、十分な軟骨基質の産生が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟骨はその血行の乏しさから一度損傷すると自然修復が困難な組織であり、再生医療が期待されている。近年では、すでに自家培養軟骨を用いた治療も開始された。軟骨再生分野においては様々な足場素材が比較検討されている。足場素材は、組織再生における主要な要素の一つであり、生体吸収性の物質が用いられている。また、近年では成長因子やサイトカインなどの生理活性物質を導入した機能性足場素材についての報告も多い。本研究では軟骨再生の足場として、すでに臨床で用いられているヒアルロン酸製剤、アルギン酸製剤を用いた。さらにこれをマイクロカプセル化することによりFGF2を徐放させ持続的に作用する機能性足場を作製した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to create a cartilage tissue regeneration with uniform internal matrix by a simpler method. As scaffolds, alginate, hyaluronic acid, and FGF2 preparations already used in clinical practice were used. A hyaluronic acid gel and FGF2 were mixed and lyophilized to prepare an FGF2 sustained release sponge. The cells used were chondrocytes isolated from human cartilage. The cells were mixed with alginate gel and embedded with an FGF2 slow release sponge. After confirming the sustained release of FGF2 by the dissolution test, it was transplanted subcutaneously into the back of nude mice. The sample was removed after 60 days. We quantified the determination of type II collagen and glycosaminoglycan as an index of cartilage regeneration and we examined histologically. We have observed sufficient cartilage matrix production.

研究分野：再生医療、形成外科学

キーワード：軟骨再生 マイクロカプセル 足場 徐放

1. 研究開始当初の背景

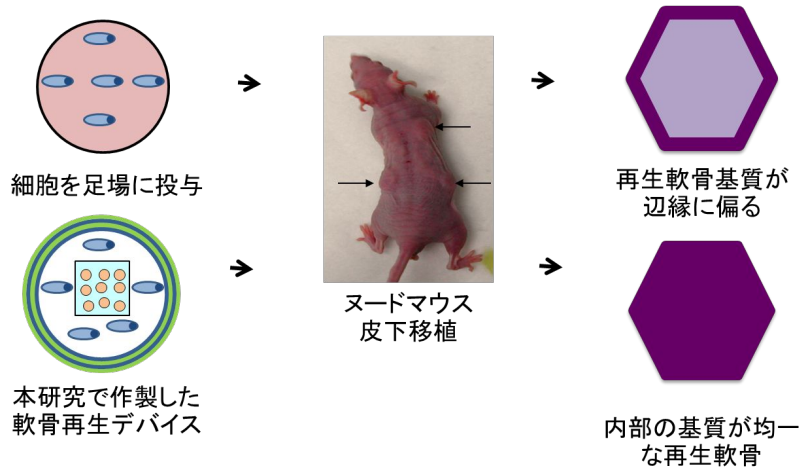
軟骨再生はすでに様々な方法が臨床応用されている。軟骨組織の局所的な欠損に対しては、少量の組織を採取し、そこから単離した細胞を増殖培養した後、回収した細胞を懸濁液としてハイドロゲルなどの足場素材と混和したり、周辺組織に包埋したりして欠損部分に注入する自家軟骨細胞移植 (autologous chondrocyte implantation, ACI) が行われている。しかし、この方法では足場素材を用いないため、軟骨細胞の移植部からの漏出や欠損部分における移植細胞の分布が不均一であるなどの問題点が指摘されている。一方、足場素材を用いた軟骨再生については現在まで数多くの報告がされている。我々は臨床応用が可能な数種類のハイドロゲルを選択し、これらを用いて包埋したヒト軟骨細胞の基質合成について検討した [Yamaoka et al. J Biomed Mater Res 2006]。本研究では植物由来材料であるアルギン酸と合成材料であるヒアルロン酸とに着眼し、より安全で確実な臨床応用が期待できる軟骨組織再生を目指した。Fibroblast growth factor (FGF) family は軟骨細胞の増殖および軟骨基質形成を促進するといわれている。我々は FGF family と軟骨分化について検討し報告した [Yamaoka et al. Cell Profile 2010]、FGF family のうちすでに製剤として臨床現場で使用されているのは FGF2 のみである。この FGF2 を軟骨再生に対して効果的に作用させるためには、必要とされる場所で必要な期間その濃度を維持する、つまりドラッグデリバリーシステムを応用することが重要であると考えられる。そこで本研究では軟骨細胞に持続的に作用するような徐放システムについて検討し軟骨再生を試みる。

2. 研究の目的

ACI 法では関節内に移植された軟骨細胞は周囲組織から刺激を受けて時間経過とともに自然に成熟し、最終的には関節軟骨の再生が達成される。同様な生体内での成熟現象は軟骨細胞の皮下移植でも再現できる。そのため本研究ではヌードマウスの皮下にこの FGF2 含有ヒアルロン酸スポンジを軟骨細胞と混和したアルギン酸ゲルで包埋したビーズを移植し軟骨再生を試みる。しかし、アルギン酸ゲルは脆弱であるうえ細胞の生存に必要なリン酸イオンなどが存在すると崩壊してしまうため、ヌードマウスの皮下において一定期間形態を保持するのは困難であると推測される。そこで本研究では作製されたビーズをポリリジンと反応させることによりアルギン酸ポリリジン膜を形成させ強固なビーズにして移植する。さらにこのビーズを多数作製し相互に接着させることにより一定以上の大きさを持った三次元形態を付与した再生軟骨作製を試みる。しかし in vivo においてある一定以上の大きさを持ち三次元形態を付与した再生軟骨を作製する場合、周囲組織から分泌される因子が足場の中心部の軟骨細胞まで届かず再生軟骨の基質の分布が不均一になることがある。本研究では軟骨細胞が持続的に FGF2 の作用を受けるシステムを小型のビーズ内で作製し、個々の小さなビーズ内で軟骨細胞が持続的に必要な濃度の FGF2 の作用を受け、より簡単に均一的な再生軟骨組織が作製できることを期待する。さらにそれを集積させることによって大きさや形態がある程度自由に作製することが可能となる。これが実現すれば、自己組織性、安全性

に優れ、さらに大きさや形態を比較的自由に設定できる画期的な次世代組織デバイスの創製が期待される（図1.）

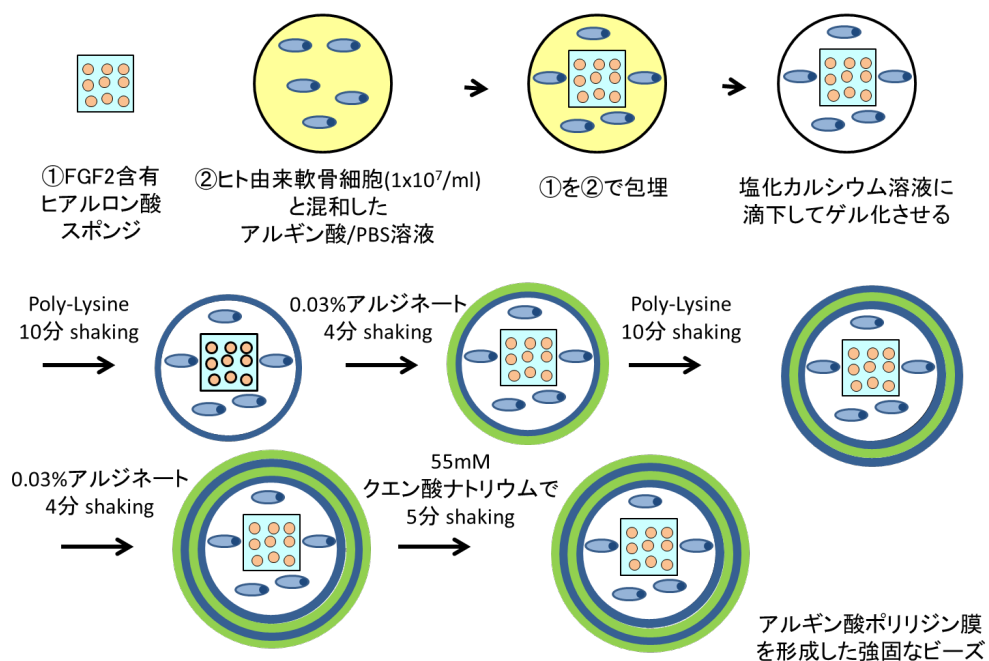
図1. 本研究で作製する軟骨再生デバイス



### 3. 研究の方法

軟骨細胞、ヒアルロン酸、アルギン酸、FGF2 を用いたビーズの作製  
 注入型ヒアルロン酸製剤に各種濃度の FGF2 製剤をそれぞれ混和し凍結乾燥することにより FGF2 含有ヒアルロン酸スポンジを作製する。次にアルギン酸製剤を PBS に溶解し 2%アルギン酸溶液としたものと軟骨細胞とを混和し細胞濃度が  $1 \times 10^6$  cells/ml になるように調整する。そしてこの混合物で FGF2 含有ヒアルロン酸スポンジを包埋し、直後にこれを 1M および 2M の塩化カルシウム溶液に滴下することによりゲル化させビーズを作製する。さらにこのビーズをポリリジンと反応させることによりアルギン酸ポリリジン膜を形成させ強固なビーズを作製する（図2）。

図2. FGF2徐放デバイスの作製方法



#### FGF2 の徐放システムの検討とビーズの評価

各種濃度の FGF2 含有ヒアルロン酸スポンジからの FGF2 の徐放の速度および濃度を評価する。作製した FGF2 含有ヒアルロン酸スポンジを PBS 中に浸漬する。この溶液を経時的に採取し ELISA 法にて浸出した FGF2 の濃度を評価する。

#### 組織再生への応用

作製したビーズをヌードマウスの皮下に移植する。

ヌードマウス背部皮下に移植から 60 日経過した後摘出する。得られた検体を組織学的、生化学的、力学的に評価する。また軟骨組織の主な構成成分であるグリコサミノグリカンの含有量を測定し、型コラーゲンは ELISA 法を用いて定量解析を行う。さらに力学測定装置を用いて弾性を測定する。以上のそれぞれの項目について生理的軟骨組織との比較検討を行う。

### 4. 研究成果

#### アルギン酸ビーズの力学的強度

1M 塩化カルシウムと 2M 塩化カルシウムを用いて作製したビーズでは 2M の方が有意に強度が高かった。(\* $p < 0.05$ )

#### FGF2 溶出試験

すべてのビーズにおいて測定開始から 30 日後まで一定量の FGF2 の溶出が確認されたがすべての経過日数において FGF2 含有量が 10 $\mu$ g と 20 $\mu$ g のビーズが最も FGF2 の溶出量が有意に保たれた(\*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ )。

#### 組織再生への応用

ヌードマウス背部皮下にビーズを移植し 60 日経過後摘出した。摘出した組織について軟骨再生の指標となるグリコサミノグリカンとコラーゲンを測定した。コラーゲンの検出量は FGF<sub>2</sub>(+)が FGF<sub>2</sub>(-)と比べ優位に多く(\* $p < 0.05$ )、グリコサミノグリカンでも同様の結果が得られた(\* $p < 0.05$ )。組織学的所見では FGF(+)の方が広範囲に異染性がみられ、豊富な基質産生が示唆された。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Hisayo Yamaoka, Yoshito Ishiki, Moemi Saito, Keiji Maruyama, Tamaki Watanabe, Kazuo Maruyama, Ryo Suzuki, Shigekazu Watanabe, Makoto Yasuda, Tomoya Mukouyama, Tomoyo Yamanobe, Keiko Yamaoka, Nobuhiro Yasuno, Yuzo Komuro Comparison of the Longevity of the Anesthetic Effect between Lidocaine/Propitocaine Cream and In-hospital Formulations. Therapeutic Research 査読有、vol.39 no.10、2018、pp.879-890

山岡尚世、木村理夫、佐々木源、伊藤悠祐、亀倉暁 顕微鏡下切除を行った手指発生の腱滑膜巨細胞種の術後再発率の検討 Recurrence Rate of Microsurgical Excision of Tenosynovial Giant Cell Tumors in the Hand 日手会誌(J Jpn Soc

Surg Hand)、査読有、第 35 卷 第 4 号、2019、pp.653-656

コレステロール結晶塞栓症による難治性足趾潰瘍の 2 症例 岡田美穂、山岡尚世、  
福場美千子、小室裕造 日形会誌、査読有、39、2019、pp.112-117

〔学会発表〕(計 4 件)

山岡尚世、伊藤明日香、渋谷健、岡田美穂、山本崇弘、福場美千子、堂後京子、  
青井則之、小室裕造 軟骨再生を目指した FGF2 徐放性足場の検討 第 26 回日本  
形成外科学会基礎学術集会 2017 年 10 月 19 日～2017 年 10 月 20 日 グランフ  
ロント大阪 ナレッジキャピタル コングレコンベンションセンター (大阪府、大  
阪市)

山岡尚世、鈴木亮、丸山一雄、小室裕造、山岡桂子 軟骨再生足場に用いる FGF  
2 徐放性ビーズの至適条件について 第 17 回日本再生医療学会総会 2018 年 3 月  
21 日～2018 年 3 月 23 日 パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)

山岡尚世、堂後京子、福場美千子、山本崇弘、渋谷健、藤井麻紀、関口知秀、田  
巻恵、

大河内真之、小室裕造 FGF2 徐放ヒアルロン酸スポンジを用いた軟骨組織再生  
誘導足場の開発 第 27 回日本形成外科学会基礎学術集会 2018 年 10 月 19 日～  
2018 年 10 月 20 日 京王プラザホテル (東京都、新宿区)

山岡尚世、鈴木亮、丸山一雄、小室裕造、山岡桂子 FGF2 徐放性ヒアルロン酸  
スポンジを用いた軟骨組織再生誘導デバイスの開発 第 18 回日本再生医療学会  
総会 2019 年 3 月 21 日～2019 年 3 月 23 日 神戸国際会議場、神戸国際展示場  
(兵庫県、神戸市)

〔図書〕(計 1 件)

本田健、山岡尚世、山岡桂子、江口研二 乳がん薬物療法副作用マネジメント  
MEDICAL VIEW 2017、pp.271-273

〔産業財産権〕

取得状況 (計 1 件)

名称：コラーゲン組成物、及びその製造方法

発明者：山岡桂子、山岡尚世、松井正輝

権利者：同上

種類：特許

番号：特開 2008-161495

取得年：平成 20 年

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：平林 慎一

ローマ字氏名：(HIRABAYASHI , shinichi)

所属研究機関名：帝京大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 60173259

研究分担者氏名：権太 浩一

ローマ字氏名：(GONDA , koichi)

所属研究機関名：東北医科薬科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 20292914

研究分担者氏名：丸山 一雄

ローマ字氏名：(MARUYAMA, kazu)

所属研究機関名：帝京大学

部局名：薬学部

職名：特任教授

研究者番号(8桁): 30130040

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。