

令和元年5月22日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15747

研究課題名(和文) 幹細胞低酸素ニッチに着目した軟骨膜片からの長期形態維持性軟骨移植材料の開発

研究課題名(英文) Development of the method which focus its attention on a stem-cell niche, for regenerating long-term form-retaining auricular cartilage by the piece transplantation of a perichondrium

研究代表者

小室 明人 (Komuro, Akito)

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号：80387365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：耳介軟骨再生医療における重要課題である長期形態維持性の確保を目標に、軟骨膜血管新生と低酸素ニッチに着目した耳介軟骨膜幹細胞からの軟骨再生過程の解明のため家兎耳介軟骨を用い研究を行った。1) *in vivo*で軟骨膜の血管新生と軟骨膜からの軟骨再生過程の観察では、温存した軟骨膜から径2cmまでの軟骨欠損の再生を確認した。2) 軟骨膜幹細胞を含む軟骨膜の*ex vivo*での培養系を用い、軟骨膜幹細胞の低酸素ニッチと低酸素誘導性因子(HIF)の関連を同定に向けて、まず困難であった薄い家兎耳介から耳介軟骨を含まずに軟骨膜を採取する手技を剥離子などの道具を工夫することにより確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

耳介軟骨再生医療にとって長期形態維持性は最重要課題である。軟骨膜幹細胞が長期形態維持性の中心的役割を担っている。低酸素環境下で保持されている軟骨膜幹細胞にとって、軟骨膜への血管新生が、幹細胞をonの状態にするスイッチである可能性に着目し、軟骨再生過程を解明して、これをコントロールできるようにすることが、本研究の意義である。家兎耳介を用いて、生体で軟骨膜の血管新生と軟骨膜からの軟骨再生過程の観察して、直径2cmまでの軟骨欠損が再生されることを確認した。次のステップである軟骨膜幹細胞を含む軟骨膜の*ex vivo*での培養系に向けて、耳介より耳介軟骨を含まずに軟骨膜を採取する手技を確立した。

研究成果の概要(英文)：With the goal of the securing of long-term form maintenance characteristics that was an important issue in the auricular cartilage regenerative medicine, we studied it using rabbit auricular cartilage for an elucidation of the cartilage process of regeneration from the perichondrium stem cells which paid their attention to perichondrium neovascularisation and an anoxia niche.

1) By the observation of the neovascularisation of the perichondrium and the cartilage process of regeneration from a perichondrium, we confirmed reproduction of cartilage deficiency from the perichondrium *in vivo*, if the defective size was up to 2cm in diameter. 2) For using culture system *in ex vivo* of the perichondrium including perichondrium stem cells, identified the association between anoxia niche and anoxia inductivity factor of perichondrium stem cells. We established a procedure to harvest a perichondrium without auricular cartilage from thin rabbit ear by devising the tools such as elevators.

研究分野：形成外科

キーワード：再生医療 軟骨膜 幹細胞ニッチ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

頭頸部の支持組織再建では、弾性を有する耳介軟骨が理想的な再建材料である場合が多いが、採取量に限度があり、移植材料としての新たな弾性軟骨作製法の確立は形成外科領域の重要課題の一つである。

Skoog ら (1972) が軟骨膜組織からの軟骨再生法を報告したが効率が悪く、軟骨再生医療は多分化能と増殖能を持つ間葉系幹細胞と生体分解性の scaffold を用いた移植法の開発へと移行した。

しかし近年、耳介軟骨軟骨膜中にも幹細胞機能を有する細胞が存在し、これを生体へ移植すると軟骨再生のみならず、周囲に形成された軟骨膜に組織幹細胞が保持され、恒常性が維持されていることが明らかになった(Kobayashi ら, 2011)。一方、最近の造血幹細胞の研究で、幹細胞の特徴である未分化性の維持には幹細胞ニッチと呼ばれる特別な構造が必須なことが明らかにされつつあるが、軟骨膜組織幹細胞のニッチに関してはほとんど知られていない。

Kobayashi らの研究からは軟骨膜の中に幹細胞ニッチが存在し、それを幹細胞自らが形成していることが示唆され、改めて組織幹細胞、幹細胞ニッチ、scaffold 機能を合わせもつ軟骨膜からの軟骨作製法に着目した。

1. 我々は、ウサギ耳介軟骨膜への塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) 投与が、軟骨膜細胞増殖と軟骨分化を誘導し、軟骨膜では急激な血管新生を生じることを *in vivo* での観察で明らかにした (柳下, 2013)。

2. 近年、低酸素下で生存する軟骨組織の恒常性維持に対する低酸素誘導性因子 (hypoxia-inducible factor : HIF) の関与が明らかになり、軟骨膜組織幹細胞における低酸素ニッチの存在が推定される。

この2点の知見を踏まえて、bFGF 組織幹細胞トリガー作用、軟骨膜血管新生と HIF の動態の関連性を解明することが、低酸素ニッチの解明につながると考えられ、これらの知見を応用した耳介軟骨膜を用いた弾性軟骨再生医療に向けた新たな手法の開発が重要な研究課題となった。

2. 研究の目的

耳介軟骨膜の組織幹細胞・幹細胞低酸素ニッチ機能の解明とともに、bFGF による組織幹細胞トリガー刺激、低酸素ニッチに影響を及ぼす HIF への介入、*ex vivo* での酸素濃度の調整を組み合わせることで、自己耳介軟骨膜組織片を用いた、効率性と長期形態維持性を有する耳介軟骨の培養法と生体への移植方法の確立が可能という仮説に至った。

今回、効率性と長期形態維持性を有する軟骨膜からの新規弾性軟骨再生法の開発と軟骨膜組織幹細胞に対する低酸素ニッチの同定を目標に、ウサギ耳介を用い、概要に以下に述べる3項目を目的として研究を行う。

1) **bFG 刺激による軟骨膜血管新生と低酸素ニッチに着目した耳介軟骨膜からの軟骨再生過程の解明**

2) **耳介軟骨膜における組織幹細胞低酸素ニッチ構造の同定**

3) ***ex vivo* での bFGF 刺激と低酸素ニッチへの介入による耳介軟骨膜の培養法と *in vivo* 移植法の確立**

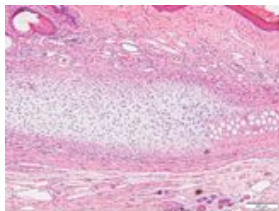
3. 研究の方法

1. 1)の目的のために *in vivo* で軟骨膜の血管新生と軟骨膜からの軟骨再生過程の観察、軟骨欠損の大きさによる再生過程の違いの検討：当初左右耳介に各2カ所(1羽で計4カ所)軟骨膜を温存して皮膚・軟骨膜を弁状に挙上し、10×10mm、15×15mmの2種類の軟骨欠損を作成。しかしこのモデルでは、処置後1ヵ月での軟骨再生観察前に処置部位の全層壊死が生じることが多く、観察不能であった。各耳介での2カ所の欠損作成による血流障害が原因と考え、左右耳介に各1カ所(1羽で計2カ所)に欠損部を作成するモデルに変更した。

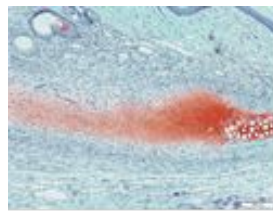
2. 3)の目的である軟骨膜幹細胞を含む軟骨膜の *ex vivo* での培養系を用い、軟骨膜幹細胞の低酸素ニッチと低酸素誘導性因子(HIF)の関連を同定するため、まず困難であった薄い家兎耳介から耳介軟骨を含まずに軟骨膜を採取する手技を剥離子などの道具を工夫することにより確立した。

4. 研究成果

1. 処置後1ヵ月で軟骨再生を観察できる *in vivo* での耳介軟骨膜温存・軟骨再生モデルを確立した。今後は軟骨再生の際に軟骨膜内に生じる血管新生が軟骨膜幹細胞の静止・活性化の動態制御機構のニッチ因子として作用するか、血管新生阻害剤(抗VEGFヒト化モノクローナル抗体)と血管新生刺激剤(bFGF)の投与を行い、HIFに着目して関与する因子の同定を行っていく予定である。

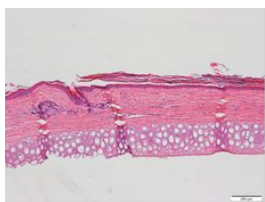


(HE)



(サフラニンO)

2. 4羽連続して、1の *in vivo* の実験系で採取した耳介軟骨側に軟骨膜が含まれていないことを組織学的に確認し、軟骨膜幹細胞を温存した軟骨膜の *ex vivo* での培養実験を開始した。同組織培養系で軟骨再生を認めれば、培養酸素濃度の変化によるHIFの発現について検討していく予定である。



軟骨



軟骨膜



(HE)



(サフラニンO)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小室明人

ローマ字氏名：Akito Komuro

所属研究機関名：金沢大学

部局名：附属病院

職名：講師

研究者番号（8桁）：80387365

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。