

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11033

研究課題名(和文)線維芽細胞増殖因子融合フィブロインスポンジを用いた移植用ヒト滑膜細胞シートの作製

研究課題名(英文)Application of FGF2-fused silk fibroin sponge to the formation of human synovial fibroblast sheet for autologous implantation

研究代表者

中川 晃一 (Nakagawa, Koichi)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：30400823

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、線維芽細胞増殖因子2 (FGF2) 融合フィブロインを利用し、より層の厚い移植用ヒト滑膜細胞シートを作製することを目的とした。FGF2 融合フィブロイン上では滑膜細胞増殖の促進が認められ、対照群と比較して厚い細胞層が形成された。軟骨分化誘導後には、サフラニン-O 染色、II型コラーゲン免疫染色でほぼ同等の染色性を示した。組織あたりのDNA量は軽度増加、プロテオグリカン含有量、コラーゲン含有量は同等ないしは軽度低下していた。II 型コラーゲン、Sox9発現量は同等であったが、アグリカン発現量は軽度低下していた。ヒト滑膜細胞シートを作製におけるFGF2 融合フィブロインの効果が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

広範囲の軟骨欠損に対する再生治療は非常に困難である。今回研究に用いた絹フィブロインスポンジ上に自家滑膜細胞シートを作製し、欠損部を被覆する治療法が確立できれば、従来適応のなかった中高年者の広範囲欠損に対する軟骨再生医療も可能となる。本研究は、FGF2融合フィブロインをヒト滑膜細胞シート形成に応用した初めての研究である。FGF2の持つ細胞増殖効果により厚い滑膜細胞シートを作製することで、十分な移植細胞数が確保でき、フィブロイン被覆法を広範囲の軟骨欠損に応用できるようになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to apply FGF2-fused silk fibroin sponge to the formation of human synovial fibroblast sheet. Growth of human synovial fibroblasts was shown to be enhanced on FGF2-fused silk fibroin sponge. After chondrogenesis induction, the staining of the cell layer with Alcian blue or anti-type II collagen antibody was similar to the one in the control group. In the cell layer, DNA content of was slightly increased, while proteoglycan and collagen contents were slightly decreased. The results of this study suggest possible usefulness of FGF2-fused silk fibroin sponge to form thicker human synovial fibroblast sheet.

研究分野：整形外科学

キーワード：軟骨再生 滑膜細胞 フィブロイン 線維芽細胞増殖因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

関節軟骨は自己再生能力に乏しい組織であり、大きな軟骨損傷に対する治療は非常に困難である。自家培養軟骨細胞移植術が開発され、軟骨欠損部をより生理的に修復することが可能となったが、移植に用いる軟骨細胞は同じ関節内の正常軟骨(非荷重部)より採取するため、移植可能な細胞数には限界がある。この移植細胞数の問題を解消するために、滑膜由来間葉系細胞を軟骨再生に利用する試みがなされ(Ando W et al., Biomaterials 2007)、近年臨床応用が進んでいる。滑膜細胞を浮遊液として軟骨欠損部に投与方法(Sekiya I et al., Clin Orthop Relat Res 2015)や、滑膜細胞から細胞シートを作製して軟骨欠損部に移植する方法(Shimomura K et al., Tissue Eng Pt A 2014)が報告されている。これらの適応はまだ比較的小さい軟骨欠損に限られており、広範囲軟骨欠損への適応拡大が今後の課題と考えられている。

我々は、繭糸由来のフィブロインスポンジが軟骨細胞の細胞凝集体形成能と細胞移動能(cell delivery 機能)を有する(Kachi ND, et al., Biomed Mater Eng 2010)ことを利用して、広範囲欠損にも対応可能な軟骨修復法であるフィブロイン被覆法を開発した(Hirakata E et al., J Biomed Mater Res Pt B 2016)。これは、培養軟骨細胞を播種したフィブロインスポンジで軟骨欠損部を被覆し、フィブロインから遊走した細胞により軟骨再生を行う方法である。フィブロインは神経組織や骨組織などの再生に用いる生体材料としても注目されており(Melke J et al., Acta Biomater 2016)、骨髄や脂肪組織由来の幹細胞を播種して用いる報告が散見される(Wang Y et al., Biomaterials 2006)。様々な組織由来の間葉系幹細胞の中で、滑膜組織由来幹細胞は最も軟骨分化能に優れることや(Sakaguchi Y, et al., Arthritis Rheum, 2005)、滑膜細胞そのものが軟骨細胞に分化する能力を有している(Nishimura K, et al., Arthritis Rheum, 1999, Shintani N, et al., Arthritis Rheum, 2007)ことなどが報告されており、滑膜細胞は広範囲軟骨再生を目的とする移植細胞に適していると考えられる。

さらに我々は、フィブロインスポンジ上にヒト滑膜細胞を播種して作製した細胞シートから軟骨分化を誘導できることを報告し(中川ほか, 移植 2015)、滑膜細胞を用いたフィブロイン被覆法開発の可能性を示した。ただし、この細胞シートは動物由来の細胞を用いた場合と比べて層が薄く、ヒト細胞ではフィブロインスポンジ上で細胞層を厚くする工夫が必要と考えられた。

2. 研究の目的

FGF2 はヒト滑膜由来間葉系幹細胞の増殖と軟骨分化を促進する(Kim JH et al., Tissue Eng Pt A 2011)ことや軟骨欠損部への局所投与により軟骨修復を促す(Li X, et al., Osteoarthritis Cartilage 2013)ことなどが報告されている。近年、カイコの遺伝子組み換えにより FGF2 融合フィブロインが開発され、マウス線維芽細胞や軟骨細胞に対する生理活性を有することが証明された(Kambe Y et al., J Biomed Mater Res Pt A 2016)。カイコを用いた組み換え蛋白の産生は、エンドトキシンや病原体等の混入がない、組換えウイルスの残存がない、組換えタンパク質の抽出・精製が容易、生産規模の拡大が容易など、安全面、医療経済面での利点が多く、近年注目されている。繭糸はほぼ純粋なタンパク質(セリシンとフィブロイン)で構成されるため、FGF2 融合フィブロインも精製は容易でそのまま生体材料として利用できる。また、FGF2 融合フィブロインから作製したスポンジは Wild-type のものと同様の構造および強度特性を持つことが証明されている。FGF2 融合フィブロインスポンジ上で動物由来の線維芽細胞増殖が促進されたことから、ヒトの滑膜細胞においても同様の効果が得られると期待される。そこで、この新しく開発された FGF2 融合フィブロインを用いて広範囲軟骨欠損部へ移植可能なヒト滑膜細胞シートを作製することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト滑膜および関節軟骨の採取:

変形性膝関節症の診断にて東邦大学医療センター佐倉病院で人工膝関節置換術を施行した患者(10名)より同意を得て、軟骨片と滑膜組織を採取して実験に使用した(院内倫理委員会承認済 No. 2012-097)。対象は、50歳~70歳の内側型変形性膝関節症症例であり、術前画像検査にて外側の骨軟骨変性が軽度の症例を選択した。手術時に両膝から関節軟骨組織および滑膜組織を採取し、関節軟骨は生理食塩水にて洗浄後、2mm角の大きさに細切した。滑膜組織は、洗浄し可及的に微細に切断した後に、1mg/ml の collagenase (Sigma, typeI)を用いて 37度で 1時間の酵素処理を行い、細胞を分離した。

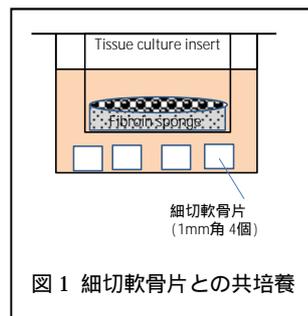
(2) フィブロインスポンジ上での滑膜細胞培養:

酵素処理により単離した滑膜細胞は、異なる細胞密度(0.5 million /disc, 1 million /disc)でフィブロインスポンジ(Wild-type または FGF2 融合)上に播種する。フィブロインスポンジ(disc 状)の大きさは径 8mm, 厚さ 3mm とし、孔径は平均 50 μ m と 100 μ m の 2種類を用いる。

12 時間静置後に、10 %FBS および 0.2 mM Asc2-P を添加した DMEM/F12 培地にて 2 週間培養する。その後 12 時間無血清培地とした後、軟骨分化誘導培地 (1%ITS mix, 160 μg/ml sodium pyruvate, 100 ng/ml dexamethasone, 0.2 mM Asc2-P, 10ng/ml TGF beta-3 添加した DMEM high glucose 培地) に変更し、さらに 2 週間の培養を行う。Positive control としては、Wild-type フィブロイン上で 5 ng/ml の rhFGF2 存在下に培養したものをを用いた。

(3) フィブロインスポンジ上に播種した滑膜細胞と細切軟骨片との共培養 :

滑膜細胞を播種し 12 時間静置後に播種面が上になるように Tissue culture insert 上にスポンジを置き、5% FBS および 0.2 mM Asc2-P を添加した DMEM/F12 培地にて 2 日間培養する。12 時間無血清培地とした後、細切軟骨片を加えて共培養を行う(図 1)。12 時間無血清培地とした後、1% FBS, 1% ITS mix, 160 μg/ml sodium pyruvate, 100 ng/ml dexamethasone, 0.2 mM Asc2-P を添加した DMEM/F12 培地に変更し、さらに 4 週間の培養を行った。



(4) 細胞増殖の評価

培養開始後 48 時間で、WST-1 assay を行った。さらに培養開始後 7 日目の時点で、滑膜細胞層を papain にて酵素処理後、DNA 量の測定 (ヘキストダイによる定量) を行った。

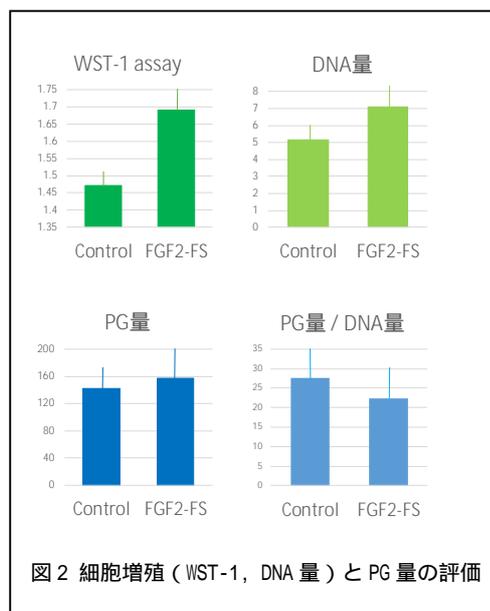
(5) 軟骨分化の評価 (1 週、2 週、4 週時):

組織学的検討: 得られた滑膜細胞層を中性ホルマリンにて固定後、HE、Alcian blue 染色と、抗 S100 蛋白抗体、抗 II 型コラーゲン抗体を用いた免疫染色により、軟骨分化を評価した。生化学的検討: 滑膜細胞層を papain にて酵素処理後、DNA 量、プロテオグリカン (PG) 含有量 (DMMB 法) を測定した。また RNA を抽出し、real-time RT-PCR 法による I, II 型コラーゲン、アグリカン、Sox9 の遺伝子発現定量を行った。

4 . 研究成果

(1) FGF2 融合フィブロイン上での滑膜細胞増殖 :

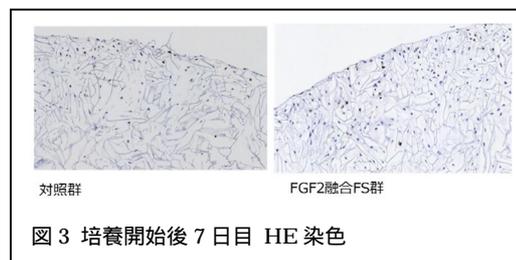
細胞数、WST-1 assay、DNA 量ともに FGF2 融合フィブロイン群で有意に高値を示し、FGF2 融合の効果を確認された(図 2)。培養開始後 7 日目の細胞層の HE 染色像でも、FGF2 融合フィブロイン群で細胞層の厚みが増す傾向を示した(図 3)。その効果の程度には個体差があったが、いずれの細胞でも有意差が認められた。フィブロインスポンジの孔径による比較もおこなったが、孔径 平均 100 μm のフィブロインにおいて高い細胞増殖を示したことから、来年度以降の実験にはこの孔径のフィブロインを使用した。



(2) FGF2 融合フィブロイン上での滑膜細胞の軟骨分化

フィブロイン dicc1 個あたりの DNA 量、プロテオグリカン (PG) 量は軽度増加、DNA 量あたりの PG 含有量同等ないしは軽度低下していた (図 3)。II 型コラーゲンの発現量は同等であったが、アグリカン、Sox9 の発現量は軽度低下していた (図 4)。これらの結果は、滑膜細胞を採取した個体により差が認められた。

Alcian blue 染色 (図 5) 抗 S100 蛋白抗体および抗 II 型コラーゲン抗体を用いた免疫染色ではほぼ同等の染色性を示した。



(3) 細切軟骨片との共培養の効果 :

BMP2 非存在下では細切軟骨片との共培養を行った場合には、明らかな軟骨分化促進効果は認められなかった。BMP2 存在下においては、細切軟骨片と共培養した場合に、滑膜細胞の Sox9、アグリカンの遺伝子発現が有意に増加し、また COL-2 / COL-1 発現比も高くなり、軟骨への分化促進効果が示された。組織学的には明らかな差は認めなかった。

(4) 結果のまとめと考察：

以上の結果から、FGF2 融合フィブロイン上で培養した場合はヒト滑膜細胞の増殖が促進され、より厚い細胞層が形成されることが明らかとなった。軟骨分化誘導を行った結果では、対照群とほぼ同等の軟骨分化が認められたが、DNA 量あたりのプロテオグリカン量ならびにアグリカン発現量がやや減少する結果であった。これは、FGF2 によって細胞密度が増加したことが要因と考えられたが、FGF2 により軽度の軟骨分化抑制が生じた可能性も否定できず、今後の課題と思われる。

現在行われている軟骨再生医療には課題点も多く、特に広範囲の軟骨欠損には対応できない。通常培養軟骨細胞（あるいは間葉系幹細胞）は動物由来コラーゲンや生体吸収性化合物などの足場材料に包埋された形で移植されるが、広範囲欠損ではこの足場材料を固定することが難しいためである。今回研究に用いた生体材料であるフィブロインは、足場材料として用いるのではなく、cell delivery 機能により被覆した部分の組織修復を促す目的で用いられ、従来の培養細胞移植では対応できない広範囲欠損への応用が期待されている。本研究の結果から、FGF2 融合フィブロインスポンジを利用することにより、移植細胞として自家滑膜細胞を使用できる可能性が高まると考えられた。この方法が確立できれば、広範囲軟骨欠損に対するより低侵襲な軟骨再生治療となりうる。

本研究の成果を発展させることで、従来適応のなかった中高年者の広範囲欠損に対する軟骨再生医療も行い易くなり、骨切り手術と併用することで、変形性関節症を伴う広範囲軟骨欠損にも応用できる可能性がある。さらなる検討が必要ではあるが、FGF2 融合フィブロインスポンジを利用した滑膜細胞移植術は、新しい関節軟骨修復法として有用と考えられる。

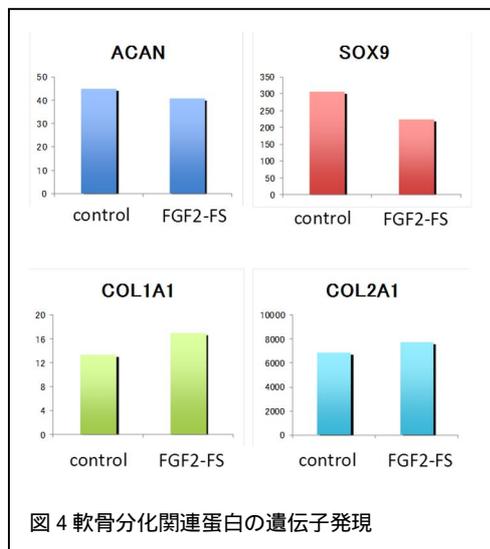


図4 軟骨分化関連蛋白の遺伝子発現

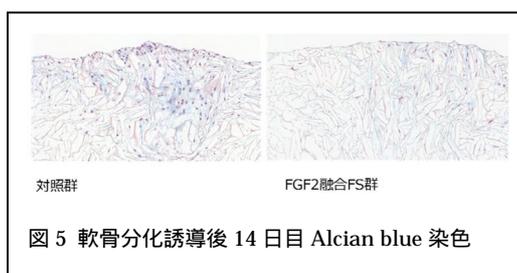


図5 軟骨分化誘導後 14 日目 Alcian blue 染色

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Saito M, Nakajima A, Sonobe M, Takahashi H, Akatsu Y, Inaoka T, Iwasaki J, Morikawa T, Watanabe A, Aoki Y, Sasho T, Nakagawa K.	4. 巻 27(8)
2. 論文標題 Superior graft maturation after anatomical double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction using the transtibial drilling technique compared to the transportal technique.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.	6. 最初と最後の頁 2468-2477
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00167-018-5240-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Toguchi K, Nakajima A, Akatsu Y, Sonobe M, Yamada M, Takahashi H, Saito J, Aoki Y, Suguro T, Nakagawa K	4. 巻 21(1)
2. 論文標題 Predicting clinical outcomes after total knee arthroplasty from preoperative radiographic factors of the knee osteoarthritis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Musculoskelet Disord.	6. 最初と最後の頁 9 (page1-8)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12891-019-3029-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakajima A, Sonobe M, Akatsu Y, Aoki Y, Takahashi H, Suguro T, Nakagawa K.	4. 巻 13
2. 論文標題 Association between limb alignment and patient-reported outcomes after total knee arthroplasty using an implant that reproduces anatomical geometry	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Orthop Surg Res	6. 最初と最後の頁 320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13018-018-1030-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 中川 晃一, 齊藤 雅彦, 園部 正人, 赤津 頼一, 中島 新	4. 巻 36
2. 論文標題 骨髄刺激法の限界と治療効果促進の試み	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 関節外科	6. 最初と最後の頁 1218-1224
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中川晃一、中島 新、園部正人、山田 学、齋木厚人、龍野一郎、秋葉 崇、寺山圭一郎、小川明宏
2. 発表標題 臓器横断的に考える肥満症の健康障害 領域横断的肥満症WG連携企画(2) ; 運動器疾患における肥満症の影響と問題点
3. 学会等名 第40日本肥満学会・第37回日本肥満症治療学会合同学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中川晃一
2. 発表標題 ひざ痛の原因と最近の治療法
3. 学会等名 読売日本テレビ文化センター健康公開講座
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中川晃一
2. 発表標題 治療ガイドラインに基づく変形性膝関節症の診方
3. 学会等名 第21回ちば医療連携の会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中川晃一、中島 新、園部正人、高橋 宏、赤津頼一、齊藤淳哉、山田 学、戸口 郁、秋山友紀、岩井達則、中野志保、斎藤雅彦
2. 発表標題 膝関節軟骨欠損に対する絹フィブロインスポンジを用いた骨髄間葉系幹細胞移植の効果～イヌ広範囲軟骨欠損モデルでの検討
3. 学会等名 第46回日本関節病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中川晃一
2. 発表標題 膝関節軟骨損傷に対する治療の最前線
3. 学会等名 いのはなOrthopaedic Surgery フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中川晃一, 中島新, 和田佑一, 玉田靖, 富田直秀
2. 発表標題 膝関節軟骨再生医療の現状と将来展望 広範囲軟骨欠損に対する新しい治療法開発を目指して.
3. 学会等名 第90回 日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中川晃一, 齊藤雅彦, 中島新, 園部正人
2. 発表標題 絹フィブロインスポンジに播種したヒト滑膜細胞の軟骨分化能の検討
3. 学会等名 第9回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	中島 新 (Nakajima Arata) (60583995)	東邦大学・医学部・准教授 (32661)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	玉田 靖 (Tamada Yasushi) (70370666)	信州大学・学術研究院繊維学系・教授 (13601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関