

令和元年6月26日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17910

研究課題名(和文) バイオエンジニアリングによる2層構造を持つ軟骨組織の構築と顎関節修復治療への応用

研究課題名(英文) The construction of two layers cartilage composites by bioengineering and application to temporomandibular joint restoration

研究代表者

杉野 浩孝 (Sugino, Hirotaka)

広島大学・医歯薬保健学研究科(歯)・専門研究員

研究者番号：70784255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト骨髄由来間葉系幹細胞に、成長因子のTGF- β 3とIGF-1に型コラーゲンを添加して細胞培養を行うと、幹細胞は硝子軟骨に分化する。またこれらの細胞に、TGF- β 3に他の成長因子であるBMP-2を組み合わせると線維軟骨に分化する。そして、作製された硝子軟骨と線維軟骨を密着させて培養すると、硝子軟骨-線維軟骨複合体が作製できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究が成されたことにより、難治性の変形性顎関節症を根本から治療する新たな手段のヒントが得られた。また、秩序をもって構成されている2種類の複合組織の構築が成されたことにより、組織工学分野における次の大きな課題である、2種類以上の複合組織の構築方法の足掛かりとなった。これらの結果は、学術的にも高い意義を有するものと考えられ、歯科医学にとどまらず、広く再生医療分野の進歩への貢献を果たすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：TGF- β 3, IGF-1, and type II collagen are effective for hyaline cartilage differentiation when added to the chondrogenic medium, whereas TGF- β 3 and BMP-2 for fibrous cartilage. The method by which hyaline and fibrous cartilage-like tissues are combined is feasible for constructing hyaline-fibrous cartilage composites.

研究分野：矯正歯科学、生体材料学

キーワード：ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 硝子軟骨 線維軟骨 成長因子 コラーゲン 3Dプリンター

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

1. 研究開始当初の背景

変形性顎関節症は、慢性の関節炎と下顎骨や顎関節軟骨の変形、破壊を伴う難治性疾患である。一旦、変形性顎関節症を発症してしまうと、病悩期間が、数カ月から数年単位と長期に及び、再発の可能性も高い。この疾患に対する現在の治療は、非ステロイド性消炎鎮痛薬、スプリント療法などが挙げられる。しかしながら、これらの治療は、疼痛緩和などの対症療法が主流であり、破壊された下顎頭や、顎関節軟骨に対する根本的な修復方法は、未だ示されていない。

そこで今回我々は、変形性顎関節症の新たな治療法を想定するにあたり、破壊された顎関節軟骨の修復に着目した。軟骨は一度破壊されると、自己修復能力に乏しく、他の組織と比較して再生されにくい。また顎関節軟骨の構造は硝子軟骨の表層に線維軟骨が被覆する複合組織であり、それぞれ性質、機能に違いがあり複雑である。

現在の医学研究では、軟骨の再生が一つの大きな課題であるが、これまでは主に硝子軟骨の均質な再生のみに注目されていた。しかし顎関節軟骨の修復に関しては、その構造から硝子軟骨だけでなく、線維軟骨も再生させる必要があり、これらの2つの組織からなる複合組織として機能させなければならない。しかし、硝子軟骨と線維軟骨とを明確に分けて再生させる条件は未だ不明である。

よって本研究では、採取方法の確立されているヒト骨髄由来間葉系幹細胞(hMSC)から、効率良く硝子軟骨と線維軟骨を分化させる条件を探索するとともに、硝子軟骨及び、線維軟骨からなる下顎頭軟骨様構造を、生体外で作製することで、変形性顎関節症の新たな治療法への一助とすることにした。

2. 研究の目的

hMSC から成長因子とコラーゲンをを用いて、硝子軟骨と線維軟骨に分化する条件を決定するとともに、3D プリンターで作製した鋳型を用いることによって、これらの結合を図り、異なる組織の複合物を作製することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は2部構成とする。即ち、実験1：ヒト骨髄由来間葉系幹細胞から線維軟骨及び硝子軟骨の分化誘導に効果的な成長因子およびコラーゲンの探索、実験2：3D プリンターを用いた線維軟骨及び硝子軟骨2層構造をもつ複合組織の構築である。

(1) 実験1の研究手法について示す。

細胞培養に関して、細胞は、不死化 hMSC を使用した。不死化 hMSC を 100 mm 径のポリスチレン培養皿に 5,000 cells/cm² の密度で播種し、細胞増殖培地を用いて、37 °C、5% CO₂ 気相条件下で培養した。培地交換は2、3日毎に行った。実験には2~3回継代した細胞を用いた。

軟骨分化誘導では、高密度培養の可能なペレット培養法を採用した。不死化 hMSC を 90% コンフルエントにまで細胞増殖培地に増殖させた後、15 ml 遠沈管1本あたり 2.5 × 10⁵ 個ずつ細胞を分け、軟骨分化培地を添加し、細胞を分散させることなく培養した。培地には、10 ng/ml TGF-β₃、100 ng/ml IGF-1、50 ng/ml BMP-2 を単独、あるいは2因子の組合せとして添加した。コラーゲンは、Ⅰ型及びⅡ型コラーゲン溶液を最終濃度 100 µg/ml となるように培地に添加して用いた。2、3日毎に培地交換を行い、培養期間は28日とした。

軟骨分化の判定では、主に軟骨分化マーカー(Ⅰ型及びⅡ型コラーゲン、アグリカン)の発現を、リアルタイム PCR 法にて分析することにより行った。リアルタイム PCR において、軟骨特有の細胞外基質であるⅡ型コラーゲン及びアグリカンの発現が、control 群と比較して、有意に高値であった場合に、軟骨に分化したものと判定した。軟骨と判定された群の内、それらが硝子軟骨、線維軟骨どちらに分化するかの判定については、溝口の報告を参考にした。溝口は、下顎頭軟骨各層はⅠ型及びⅡ型コラーゲンの分布に違いがみられ、表層の線維軟骨はⅡ型コラーゲンが多く分布し、深層の硝子軟骨にはⅠ型コラーゲンが多く分布すると述べている。よって、Ⅱ型コラーゲン/Ⅰ型コラーゲン比(col2/col1 比)が高値であれば硝子軟骨に分化したものと判定し、低値であれば線維軟骨に分化したものと判定した。統計処理について、リアルタイム PCR のデータに関して、多重比較検定(Bonferroni 法)を行い、有意水準5%以下を有意な差があるものと判定した。

(2) 実験2の研究手法について示す。

細胞培養、軟骨分化に関しては実験1と同様である。実験1で得られた、最も線維軟骨及び硝子軟骨に分化する条件で本実験を行った。線維軟骨-硝子軟骨複合体の構築には、3次元プリンターで作製された箱状の鋳型を用いて、それぞれの軟骨同士を密着させて結合させる手法を採用した。使用したプリンターは、熱融解型3次元プリンターで、材料は加工が容易であり、形状再現性が高く、また培養皿と同じ成分であるポリスチレンを使用した。鋳型の形状デザインを図1に示す。鋳型は、12穴プレート(Corning)の各well内に収まるよう縦横15mmの正方形、高さ5mmのブロック状とした。その中心に縦1.0mm、横2.5mm、高さ1.0mmのくぼみを形成し、そのくぼみに2つの細胞ペレットを並べられるようにした。また、鋳型の内部を培地が循環できるように、空隙率設定を50%として、多孔質性の鋳型をプリンティングした。硝

子軟骨及び線維軟骨を、それぞれの遠沈管で培養開始し、14 日後に線維軟骨様ペレット及び硝子軟骨様ペレットの 1 個ずつを 3D プリンターで作製した鋳型内に密着させて配置し、軟骨分化培地（10 ng/ml TGF- β 3 を含むが、IGF-1、BMP-2、型コラーゲンは含まない）中、12 穴プレート内でさらに 14 日間（全培養期間 28 日）培養した。培養終了後、パラフィン包埋を行い、厚さ 5 μ m の切片を作製して、H-E 染色、トリイズンブルー染色、免疫染色を行った。免疫染色では、型及び型コラーゲン抗体を使用した後、白黒二階調化した画像を取得した。得られた画像について画像解析ソフトウェア（Image J）を用いて、ペレット全体の色調の濃淡を数値化し、平均値を求めた。統計処理には、Student-t 検定を行い、有意水準 5%以下を有意な差があるものと判定した。

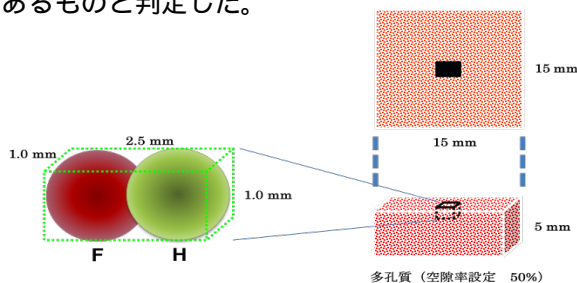


図 1

4. 研究成果

(1) 実験 1

リアルタイム PCR 分析の結果を図 2 に示す。図 2A から分かるように、TGF 群、BMP 群、IGF 群、TI (TGF+IGF) 群、TB (TGF+BMP) 群における型コラーゲン mRNA の発現量は、control 群のそれと比較して、有意に高かった。特に TI 群、TB 群に関しては高度に有意であった。型コラーゲン mRNA の発現量は（図 2B）、全ての群で control 群より有意に高値を示した。アグリカン mRNA の発現量について（図 2C）、TGF 群、TI 群、TB 群では、control 群と比較して有意に多かった。

以上の実験結果から、TGF 群、TI 群、TB 群では、control 群と比較して、軟骨の分化が最も進行したものと判断した。

これらの 3 群について col2/col1 比をとると（図 2D）、TGF 群と比較して TI 群で値が大きく、TB 群では値が低かった。すなわち、TI 群が硝子軟骨への分化に適しており、一方、TB 群は線維軟骨の分化に適した条件であると考えられる。

TI 群及び TB 群に型及び型コラーゲンを追加して、ペレット培養した後のリアルタイム PCR 分析の結果を図 3 に示す。型コラーゲン mRNA 発現量（図 3A）に関して、TB に型コラーゲンを添加した TBcol2 群では、TB 群と比較して有意に低値であったが、その他の型及び型コラーゲンを添加した群は、control 群と比較して有意差は認められなかった。型コラーゲン mRNA の発現量（図 3B）に関して、型、型を問わずコラーゲンを添加した群では、control 群に比べ有意に値が低下していた。特に control 群と型コラーゲンを添加した群の間で高度な有意差が見られた。アグリカン mRNA の発現（図 3C）について、型、型コラーゲンを添加したものは control 群に比べて上昇傾向にあったが、それらの間には有意差はみられなかった。型コラーゲン / 型コラーゲン発現比（col2/col1 比）に関しては（図 3D）、コラーゲンを添加して軟骨分化培養を行った群で上昇する傾向にあり、特に型コラーゲンを添加したものは、control 群と比較し有意に値が上昇していた。

実験 1 で調べた全ての群の中で、最も col2/col1 比の値が高値を示したのは、TGF- β 3 と IGF-1 に型コラーゲンを添加した TIcol2 群、逆に低値を示したのは、TGF- β 3 + BMP-2 のみでコラーゲン無添加の TB 群であった。

(2) 実験 2

実験 2 では、最初の 14 日間の培養で不死化 hMSC を硝子軟骨様ペレットと線維軟骨様ペレットに分化させ、さらに 14 日間、これらを密着した状態で培養して結合させる方法を選択した。また、密着培養時の軟骨分化培地に添加する成長因子は TGF- β 3 のみとした。

H-E 染色の結果を図 4A に示す。図からわかるように、ペレット同士が結合して一体化している像が認められた。またトリイズンブルー染色（図 4B）により両方のペレットで陽性反応すなわち軟骨分化が認められた。型及び型コラーゲンの免疫染色の結果をそれぞれ図 4C 及び図 4D に示す。コラーゲンの分布を半定量的に評価するため、二階調化した画像において、各々のペレット全体の色調の濃淡を数値化し、平均値を求めた。

図 5A から分かるように、型コラーゲン抗体の反応性は、線維軟骨様ペレットと硝子軟骨様ペレットとの間に有意差がみられ、線維軟骨様ペレットの方が有意に高かった。一方、図 5B に示されるように、型コラーゲン抗体の反応性は、硝子軟骨様ペレットにおいて高い値を示した。ただし、それらの間には有意差は認められなかった。硝子軟骨分化条件の中に型コラーゲンが含まれるが、添加した型コラーゲンは微量のため免疫染色の結果に影響を及ぼさないものと考えられる。

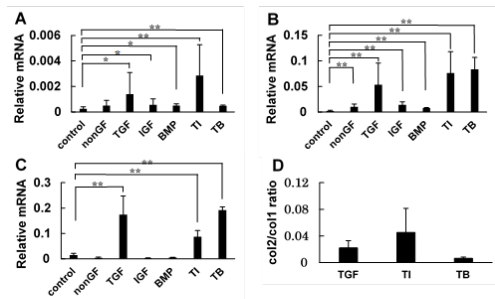


図2. 軟骨関連遺伝子の mRNA 発現量に及ぼす増殖因子添加の影響 (IhMSC)。(A) II型コラーゲン、(B) I型コラーゲン、(C) アグリカン、(D) II型コラーゲン/I型コラーゲン比 (col2/coll1 比)。IhMSC ペレットを増殖因子 (TGF- β 3、IGF-1、BMP-2) を添加した軟骨分化培地中で 28 日間培養した。値は平均値 \pm 標準偏差 (n = 3)。*P < 0.05、**P < 0.01

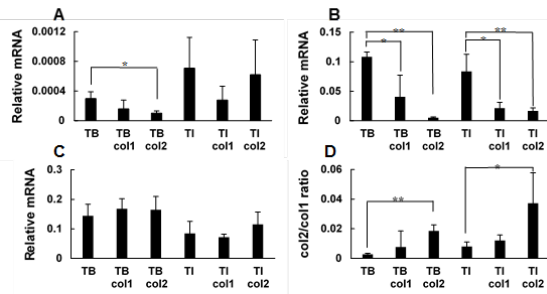


図3. 軟骨関連遺伝子の mRNA 発現量に及ぼす増殖因子添加及びコラーゲンの影響 (IhMSC)。(A) II型コラーゲン、(B) I型コラーゲン、(C) アグリカン、(D) II型コラーゲン/I型コラーゲン比 (col2/coll1 比)。IhMSC ペレットを増殖因子 (TGF- β 3 + IGF-1、TGF- β 3 + BMP-2) 及びコラーゲン (I型、II型) を添加した軟骨分化培地中で 28 日間培養した。値は平均値 \pm 標準偏差 (n = 3)。*P < 0.05、**P < 0.01

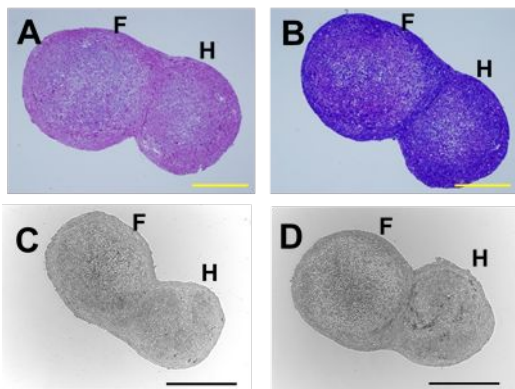


図4. IhMSC を用いて軟骨分化培養 (14 日間) 及び密着培養 (14 日間) 後の組織体の染色像。(A) H-E 染色、(B) トルイジンブルー染色、(C) I型コラーゲン抗体による免疫染色、(D) II型コラーゲン抗体による免疫染色。F: 線維軟骨ペレット、H: 硝子軟骨ペレット。スケールバー: 500 μ m

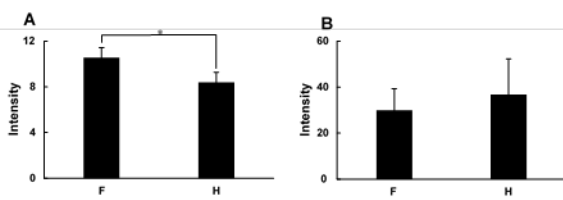


図5. 組織体内のコラーゲンの分布。IhMSC を用いて軟骨分化培養 (14 日間) 及び密着培養 (14 日間) して得た組織体を免疫染色した後、ImageJ を用いて色調の濃淡を評価。(A) I型コラーゲン抗体による免疫染色、(B) II型コラーゲン抗体による免疫染色。F: 線維軟骨ペレット、H: 硝子軟骨ペレット。値は平均値 \pm 標準偏差 (n = 3)。*P < 0.05、**P < 0.01

結論として hMSC から、線維軟骨及び硝子軟骨の分化誘導に、効果的な細胞成長因子とコラーゲンの組み合わせについて検討した結果、TGF- 3 と BMP-2 の添加が線維軟骨の分化に有効であり、TGF- 3 と IGF-1 に 型コラーゲンを添加することが硝子軟骨の分化に有効であることがわかった。また、これらの条件で培養したペレットを密着培養することにより、硝子軟骨と線維軟骨から成る顎関節軟骨に類似した構造を構築できる可能性が示唆された。今後はこれらの複合物を生体内に移植して失われた組織を修復できるかを試していく予定である。

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)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：谷本 幸太郎
ローマ字氏名：Tanimoto Kotaro
研究協力者氏名：廣瀬 尚人
ローマ字氏名：Hirose Naoto
③研究協力者氏名：加藤 功一
ローマ字氏名：Kato Koichi
研究協力者氏名：平田 伊佐雄
ローマ字氏名：Hirata Isao

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。