

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09064

研究課題名(和文) 臨床応用に向けた3次元培養細胞移植による成長軟骨帯再生

研究課題名(英文) Costal cartilage regeneration study using 3D cultured cell transplantation for clinical application

研究代表者

大槻 大(Ostuki, Dai)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：40770681

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)：小児期の成長軟骨帯損傷は四肢長管骨の変形や短縮の原因となるため、損傷軟骨の再生治療の開発が期待されている。本研究ではウサギ同種滑膜由来間葉系幹細胞を用いた損傷成長軟骨帯の再生実験を行った。部分成長軟骨損傷モデルを作成し3次元培養を行った細胞の移植実験を行い、画像評価及び組織学的評価を行った。画像評価ではAgrimatrixを用いた3次元培養細胞移植群において対照群と比較して優位に下肢変形の改善を認めた。組織学的評価において、細胞移植群では骨性架橋部位の減少を認めた。動物由来成分を含まない試薬、培地の使用でも細胞の分離、培養は可能であったが従来の動物血清使用に比べ細胞増殖に長期の時間を要した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児期の成長軟骨帯損傷は四肢長管骨の変形や短縮をもたらす、大きな障害を呈することがある。従来は人工物などを充填することで変形増悪を予防する治療が行われている。損傷した成長軟骨帯の再生を目的とした治療の開発が期待されているが、損傷軟骨自体の再生を主目的とする治療は臨床応用されておらず、社会的意義の高い研究である。細胞移植では、事前の細胞採取や培養に動物由来成分含有試薬の使用が小児への臨床応用の妨げとなる。本実験での3次元培養細胞移植による成長軟骨損傷の再生を目指した研究や動物由来成分を含まない試薬での細胞増殖研究は小児における細胞移植の臨床応用への礎になると考えている。

研究成果の概要(英文)：Growth plate injury in children bring about the deformity and shortening of limb and development of regeneration therapy for growth plate injury has been expected. In this study, the transplantation of 3D cultured rabbit allogeneic synovium-derived mesenchymal stem cells (sMSCs) for growth plate injury was performed. A partial growth plate injury model in rabbits was prepared and transplantation was performed. After surgery, image evaluation and histological evaluation was conducted. In the image evaluation, deformities of lower limb were significantly improved in the 3D-cultured cell transplantation group using Agrimatrix compared to the control group. In the histological evaluation, layered cartilage-like tissue deeply stained with Safranin O staining at the injured site in Agrimatrix group. These results indicate the usefulness of sMSCs transplantation using agrimatrix for growth plate injury. However, it took a long time for cell proliferation with animal-origen free reagents.

研究分野：医歯薬学

キーワード：成長軟骨帯損傷 骨性架橋 間葉系幹細胞 3次元培養 変形矯正

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児期の成長軟骨帯は外傷などで一旦損傷を受けると軟骨組織が消失し骨組織に置換される。そのため成長軟骨帯損傷部での骨成長が障害され四肢長管骨の変形や短縮をもたらす。現在の治療方法は損傷部位に自家脂肪やボーンワックスなどの人工物を移植しているが、損傷軟骨の再生は困難であり、変形や短縮を生じることが多い。現在までに成長軟骨帯再生のためにウサギ成長軟骨帯損傷モデルを用いて滑膜由来間葉系幹細胞や自家軟骨細胞移植が行われており、一部で成長軟骨帯の再生を認めたと報告されているものの安定した成績とは言い難い。本研究ではウサギ滑膜由来間葉系幹細胞をハイドロゲル内で三次元培養後に軟骨分化誘導し、ウサギ成長軟骨帯損傷モデルの損傷部に移植することでこれまでより安定した成長軟骨帯再生を目指した研究を行う。また、動物由来成分を含まない培養液・軟骨分化培地を使用することで、小児における細胞移植の臨床応用への礎になると考えている。

2. 研究の目的

損傷した成長軟骨帯を再生することを目的として以下のことを検討した。

[1] 3次元培養を行った滑膜由来間葉系幹細胞を用いた細胞移植により損傷した成長軟骨が再生可能かを検討した。

[2] 動物由来成分を含まない培養液・軟骨分化培地の使用による滑膜由来間葉系幹細胞が採取、培養について検討した。

3. 研究の方法

[1] 成長軟骨損傷モデルにおける3次元培養細胞移植実験

① 滑膜細胞採取、3次元培養

New Zealand White Rabbitの膝関節より滑膜組織を採取後コラゲナーゼ処理し間葉系幹細胞を採取し、ハイドロゲル(VitroGel® 3D-RGD; TheWell Bioscience Inc., NJ, US)やAlgiMatrix(AlgiMatrix™ 3D cell Culture System; Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan)を用いて10%FBS含有D-MEM培地で3次元培養を行った。

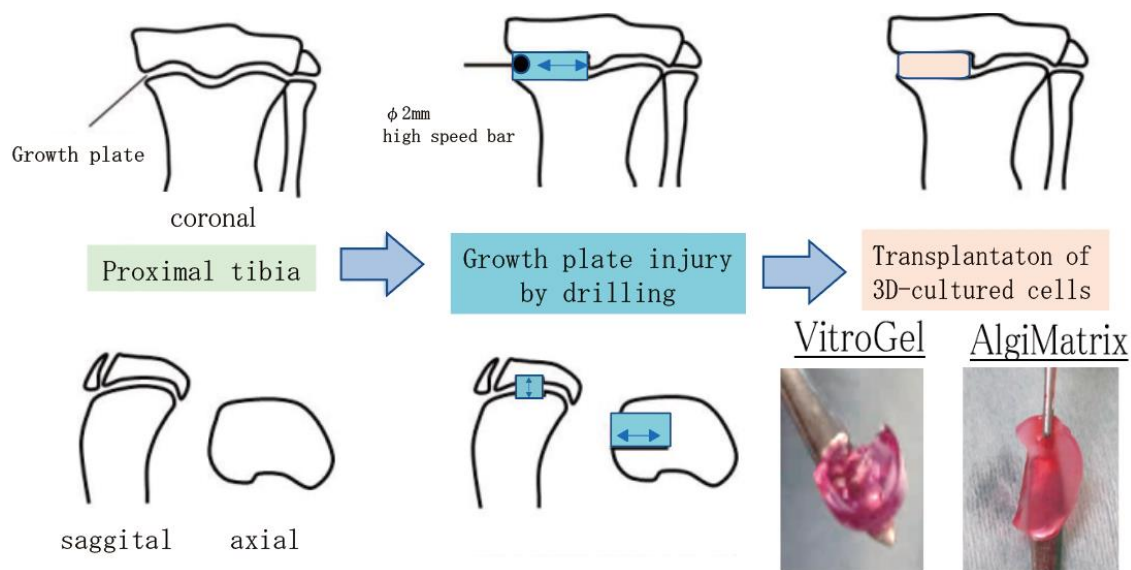
滑膜処理：採取した滑膜を細断しPBSで洗浄、トリプシン、コラゲナーゼ処理し細胞を採取AlgiMatrix、ハイドロゲルにて 1×10^6 /wellの細胞数で播種、24-48時間培養を行った。

② 成長軟骨帯部分損傷モデルの作成

幼若なウサギを用いて部分成長軟骨帯損傷モデルを作成した(Yoshida, et al. J Pediatr Orthop. 2021)。New Zealand White Rabbit 6週齢の脛骨近位内側成長軟骨帯を外科的に径5mm、深さ5mmの欠損を作成した。

③ 欠損部位に培養した細胞移植を行った(下図)。以下の4群に分け検証した。

1. 対照群：移植なし
2. ボーンワックス群：欠損部に現在行われている治療であるボーンワックスを移植
3. ハイドロゲル群：ハイドロゲルを用いて3次元培養を行った間葉系幹細胞を移植
4. AlgiMatrix群：AlgiMatrixを用いて3次元培養を行った間葉系幹細胞を移植



④ 移植後4週および8週時に画像評価及び組織学評価を行う。画像評価は単純X線、 μ CT画像、組織学評価は組織評価(HE染色、サフラニンO染色)を行った。

[2]動物由来成分を含まない試薬・培地による細胞増殖能の確認

①従来の動物由来成分を含む試薬の用いた群 (group1) と、動物由来成分非含有試薬を用いる群 (group2) の 2 群を設定し、各群において New Zealand White Rabbit の膝関節より採取した滑膜組織についてトリプシン、コラゲナーゼ処理を行った。

Group1: 0.25% Trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan), Collagenase NB4 Standard Grade (Nordmark Arzneimittel GmbH&Co., Germany) にて滑膜処理

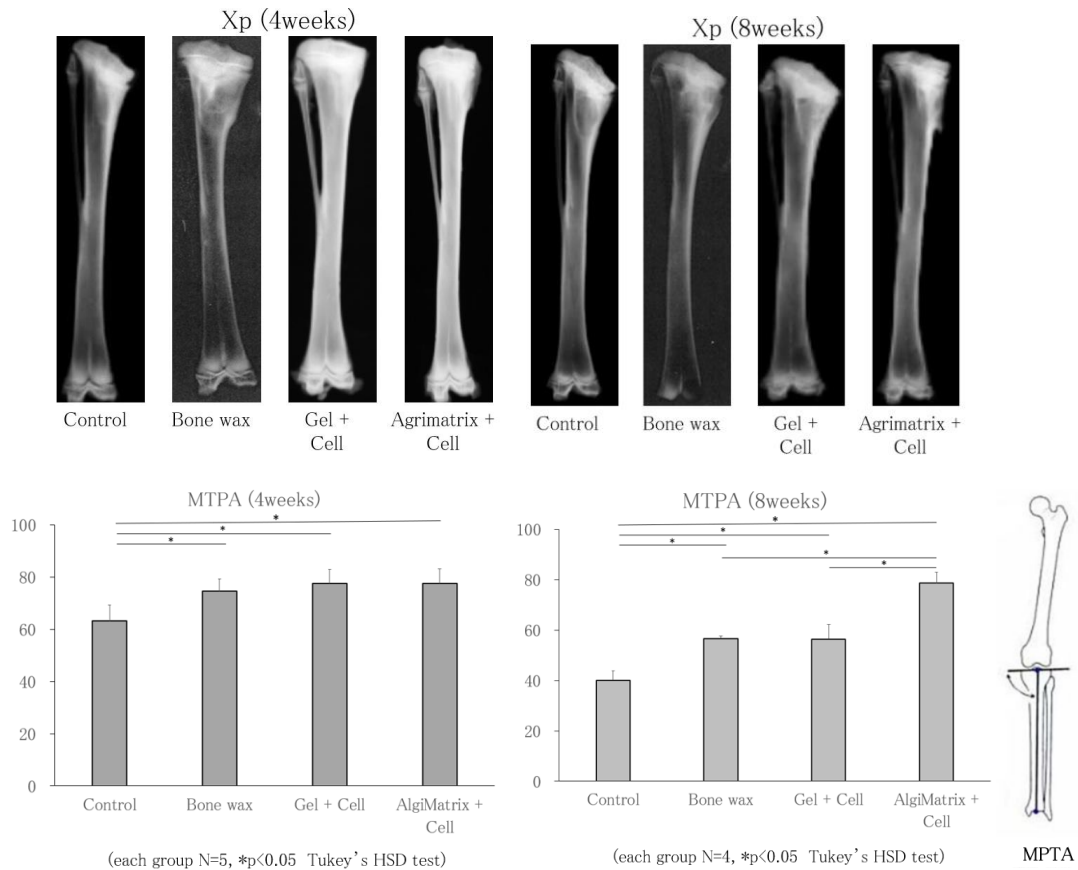
Group2: r-Trypsin/EDTA solution (CELL SCIENCE&TECHNOLOGY INSTITUTE INC., Osaka, Japan), Collagenase TypeB AOF (Worthington Biochemical Corp., NJ, US) にて滑膜処理

②group1 については 10%FBS 含有 D-MEM 培地にて、group2 については STK@2 培地 (KANTO CHEMICAL INC., Tokyo, Japan) を用いて滑膜処理した細胞を 5×10^3 /well で 96well plate に播種し、WST-1 assay による細胞増殖能を評価した (P0)。Group1,2 について継代を行い Passage1 (P1), Passage2 (P2) についても同様に WST-1 による増殖能の評価を行った。

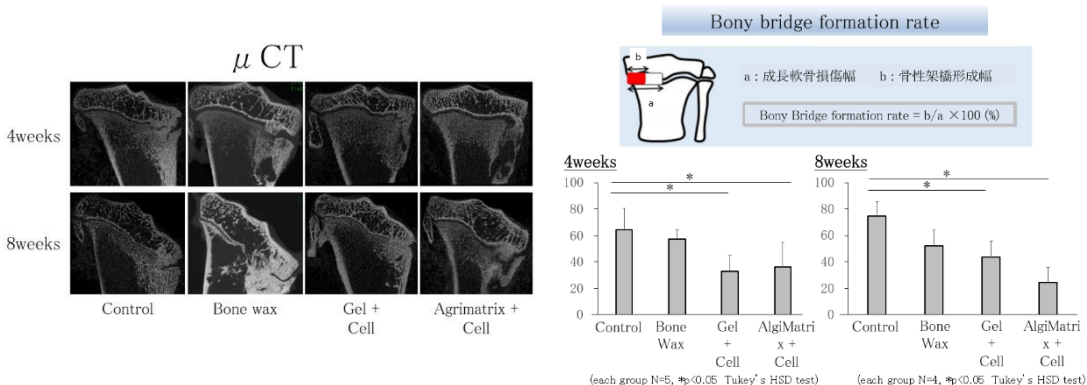
4. 研究成果

[1] 3次元培養細胞移植による変形矯正

4 群にわけて成長軟骨損傷部位に移植を行った。手術後 4 週、8 週で移植群 (ボーンワックス移植群、Gel+細胞移植群、AlgiMatrix+細胞移植群) はコントロール群に比べ有意な変形改善を認め、手術後 8 週では AlgiMatrix 群は他の移植群ボーンワックス移植群、Gel+細胞移植群) についても優位に変形の改善を認めた。

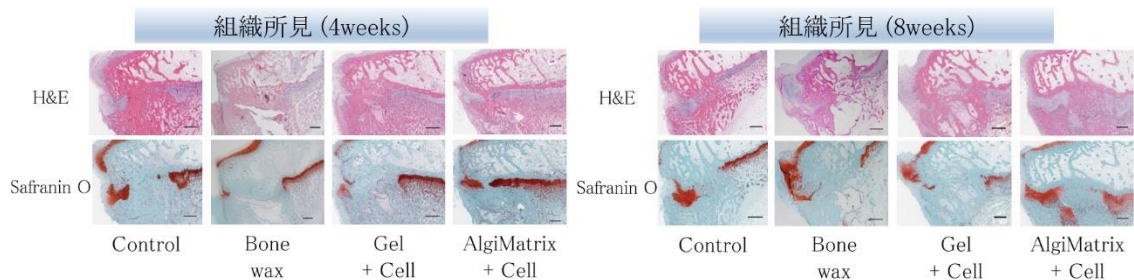


μ CT では 3 次培養細胞移植群についてコントロール群に比べ優位な骨性架橋の減少を認めた。術後 AlgiMatrix を用いた 3 次培養細胞移植群では他群と比較し術後 8 週において成長軟骨帯損傷部の骨性架橋の有意な減少を認めた。



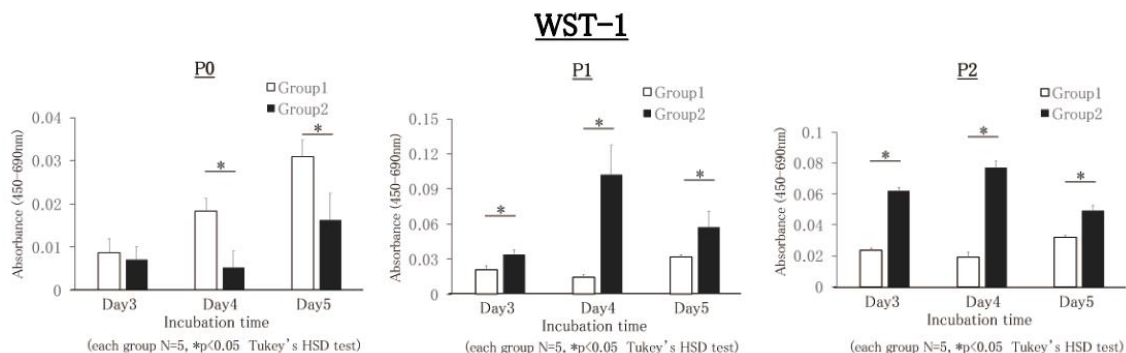
[2] 3次元培養細胞移植による成長軟骨帯損傷部の再生

組織学評価において対照群は損傷部位が骨組織に置換され骨性架橋を生じていた。移植群では術後 8 週においても移植物の残存を認め骨性架橋の減少を認めた。ゲルを用いた 3 次元培養細胞移植群には経過におけるゲルの吸収とその周囲の骨組織を認めたが、Agrimatrix を用いた細胞移植では損傷部に SafraninO で濃染される軟骨様細胞を認めた。



[3] WST-1 による細胞増殖能評価

滑膜処理を行い得た細胞について動物由来成分非含有試薬を用いた群 (group2) は動物由来成分を含む試薬を用いた群 (group1) と比較して primary culture においては増殖に時間を要した。継代後の P1, P2 細胞については group2 において有意に増殖することが示された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Orito R, Yoshida K, Kobayashi M, Ota H
2. 発表標題 Treatment of partial growth arrest using cylindrical costal osteochondral graft
3. 学会等名 ORS2020 (国際学会)
4. 発表年 2020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	樋口 周久 (Higuchi Chikahisa) (40432421)	地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪母子医療センター (研究所)・その他部局等・整形外科・主任部長 (84408)	
研究分担者	吉田 清志 (Yoshida Kiyoshi) (50645570)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	

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
---------	---------