

平成21年5月15日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2007～2008
 課題番号： 19591738
 研究課題名 (和文) 骨・軟骨再生医療に向けた高分子の自己組織化による再生医療用ナノ構造材料の創製
 研究課題名 (英文) A novel biomaterial for cartilage repair generated by self-organization.
 研究代表者
 遊道 和雄 (YUDOH KAZUO)
 聖マリアンナ医科大学・難病治療研究センター・准教授
 研究者番号： 60272928

研究成果の概要： 高機能細胞とバイオマテリアルを Scaffold に用いた関節組織再生の基礎的検討や細胞老化変性の発生機序とその克服、細胞寿命の延長に関する研究は、最近クローニングされた遺伝子等の知見をもとに展開されているもので、これらの誘導因子を骨関節細胞に発現させる担体として人工マトリックスを開発し、これにより関節再生を進展させた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・整形外科学

キーワード： ハイブリッドバイオマテリアル、細胞寿命、変形性関節症、関節リウマチ、軟骨細胞、幹細胞

1. 研究開始当初の背景

本邦において患者数1000～2000万人強といわれる変形性関節症や70万人強の関節リウマチは、発症後経年的に組織が障害されること、関節軟骨組織が極めて修復能に乏しいことから、高齢化社会において高い日常生活活動性を維持するためには、加齢に伴い進行する骨関節疾患に対して、薬物療法に加えて人工関節置換術が選択されることも多い。高齢化社会の到来とともに、骨粗鬆症や変形性関

節症など骨関節・運動器疾患の対策と予防法の開発が社会的急務として注目されている。

運動器疾患は発症後経年的に組織が障害されること、特に関節軟骨組織は極めて修復能に乏しいことを考慮すると、予防法ならびに病早期からの疾患対策が求められているが、より有効な治療法や医療技術は未だ開発の途上にあると言わざるをえない。このため、高齢化社会において高い日常生活の活動性を維持するた

めには、加齢にともなう運動器疾患に対して現状の治療法よりもさらに臨床的有効性を示す新規の治療法や治療戦略の確立が急がれる。

高度の骨関節破壊・変性に対して、再生医療（ティッシュ エンジニアリング）をはじめとする新技術による関節再建に注目が集まっている。骨欠損・破壊に対しては、ハイドロキシアパタイトを主成分とする骨組織マトリックスの模倣体（人工骨）がすでに発明されており、高い骨親和性と骨に類似した剛性が再現されている。

これに対して軟骨再生については、軟骨の持つ組織特性（弾性変形効果、弾性流体潤滑機構）を完全に再現した人工軟骨は未だ創製されていない。現在は、自家軟骨細胞を生体外でコラーゲンゲルやアガロースゲルを用いて培養させた3次元培養マトリアルを、軟骨欠損部に移植する手法が一部の限定された症例にのみ（若年者、外傷例、小欠損 $< 3 \text{ cm}^3$ ）に施行されている現状である。また、*in vitro*の実験系において、骨髄由来の間葉系幹細胞から軟骨細胞を分化誘導して軟骨再生の細胞資源としようとする試みがあり、分化誘導の詳細なメカニズムの解明が急がれている。このように、患者の関節軟骨組織から分離した軟骨細胞を培養して増やす場合も、骨髄由来の間葉系幹細胞から軟骨細胞を誘導するにしても、軟骨様組織を形成するためには細胞自体に軟骨マトリックスを産生させるプロセスが必須である。しかし、 1 cm^3 の軟骨欠損を充填するには、 $2 \sim 5 \times 10^6$ 個の軟骨細胞が必要とされており、必要十分な細胞資源（軟骨細胞数）を獲得するためには細胞培養を数代（*passage*）にわたり続ける必要がある。このため、継代培養中に軟骨細胞としての特性を失い脱分化する可能性があり、細胞資源の観点から解決すべき問題点も多い。また、コラーゲンゲルなどを用いて3次元培養を行うこと

で軟骨様組織を作製して移植しても、関節内の軟骨組織は修復能を持たないことから、仮に移植した人工軟骨様組織が欠損部に生着してとしても自己組織化を経て軟骨に求められる機能（低摩擦性、耐荷重性）を発揮できる組織として維持されうるか否かは未だ検討途上である。

我々はこれまでに、人工関節置換術以外に未だ有効な治療法のない中期～晩期の関節機能障害に対して人工関節置換術に代わる次世代の中心的治療法と位置づけられる再生医療をターゲットとして、既存の軟骨再生技術に比べて構造・機能ともに実際の関節組織により近似した「自己組織化軟骨用バイオマテリアル」を数時間で創製することが可能な技術を開発してきた。

2. 研究の目的

我々は、上述した様々な骨・関節疾患領域における再生医療の問題点を克服して、臨床応用に資する高機能な再生医療用ハイブリットバイオマテリアルを短時間（数時間～数日）で創製するため、骨や軟骨細胞などの細胞資源を用いずにナノメートルオーダーで自己組織化機構を階層的に制御した高分子自己組織化複合体材料 [自家骨・軟骨と同等の微細構造（ナノコンポジット構造）] を作成する技術を開発する計画である。

3. 研究の方法

自己組織化軟骨様ナノコンポジット複合体の創製技術の確立

2007年度において、自己組織化技術を用いた軟骨様組織を創製する具体的な方法、条件を *in vitro* で検討して確立した。既に予備実験として、軟骨基質の主要成分であるヒアルロン酸、プロテオグリカン（アグリカン）及び II 型コラーゲン、ほか数種類の細胞外マトリックス高分子を特定条件下で反応させることで 0.1 ～

500 nm長(2 ~ 5 nm 径)の細線維からなる人工軟骨(Ⅱ型コラーゲン多糖類複合体)を自己組織化させることに成功し、特許に出願した(特許出願番号: 2005-271095)。これを基盤に、以下の検討を行った。

- (1) この自己組織化コラーゲン多糖類複合体の形成法・条件をさらに詳細に解析して最適条件と創製技術を確立した。
- (2) ナノメートルオーダーで自己組織化機構を制御した複合体材料と自家軟骨の微細構造(ナノコンポジット構造)の組織学的な比較検討を行う。形成させた自己組織化コラーゲン多糖類複合体を基礎にして、より緻密な軟骨様組織を作製する技術をさらに改良した。

4. 研究成果

我々はこれまでに、人工関節置換術以外に未だ有効な治療法のない中期～晩期の関節機能障害に対して、次世代の中心的治療法と位置づけられる再生医療をターゲットとした自己組織化軟骨用バイオマテリアルを、従来技術のように軟骨細胞に軟骨基質(マトリックス)を産生させて軟骨組織形成を誘導するのではなく、また架橋剤や縮合剤を必要とする化学的合成による人工軟骨ではなく、軟骨基質の構成成分そのもの持つ物理的・化学的特性を応用した自己組織化技術によって短時間で創製する研究を続けてきた。

自己組織化技術は、定常状態ではランダムな動きをしている分子が、環境条件によっては分子間にはたらく結合力、表面修飾、共有結合の方向性やイオン配列など物理的・化学的特性により一定の法則を持って組織化した構築を形成することがあることを利

用した技術である。

我々は、軟骨マトリックス成分(Ⅱ型コラーゲン、アグリカン、ヒアルロン酸など)を用い、各種反応条件の下で軟骨様組織が形成されるかどうか検討した。その結果、上記成分の濃度および pH が特定範囲に制御された場合に軟骨様組織が形成されることをつきとめた。さらに、得られた軟骨様組織を位相差顕微鏡および電子顕微鏡で観察し、生体内と同様にコラーゲン線維を含むナノコンポジット構造が形成されていることを確認した。さらに、上記組織の物性を検討し、軟骨様組織として好ましい物性を備えていることを確認した。

我々が計画している技術は、従来の軟骨再生技術(細胞に軟骨基質を産生させた軟骨様組織)・バイオマテリアル(化学的合成による人工軟骨)ではなく、生体軟骨基質の構成成分(コラーゲンなどのマトリックス高分子)そのもの持つ物理的・化学的特性を応用した自己組織化技術による軟骨再生用バイオマテリアルであり、生体関節軟骨と同等の機能と微小構造を数時間で作製する技術である。

5. 主な発表論文等

[産業財産権]

○出願状況(計 1 件)

名称: 自己組織化技術による次世代型人工関節および再生医療用バイオマテリアル: 自己組織化を用いた人口骨・軟骨一体型バイオマテリアルの新規開発

発明者: 遊道 和雄

権利者: 聖マリアンナ医科大学

種類: 特許権

番号: 特願 2008-118758

出願年月日: 2008年4月30日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遊道 和雄 (YUDOH KAZUO)
聖マリアンナ医科大学・難病治療研究センター・准教授
研究者番号： 60272928

(2) 研究分担者

増子 佳世 (MASUKO KAYO)
聖マリアンナ医科大学・医学部・講師
研究者番号： 80288208

加藤 智啓 (KATO TOMOHIRO)
聖マリアンナ医科大学・医学部・教授
研究者番号： 80233807

(3) 連携研究者

なし