

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19592283  
 研究課題名（和文） 遺伝子操作マウスを用いた再生軟骨移植における組織反応の解析と足場素材の最適化  
 研究課題名（英文） Analysis on tissue reactions to tissue engineered cartilage in transgenic mice and optimization of scaffolds  
 研究代表者  
 藤原 久子（FUJIHARA HISAKO）  
 東京大学・医学部附属病院・医員  
 研究者番号：80396746

研究成果の概要：顎顔面領域において、より機能的で形態的にも優れた再生軟骨移植法を確立するため、再生組織の変形や形成不全の原因となる移植後組織反応を解析した。耳介軟骨細胞とポリ乳酸足場素材で構築される再生軟骨を、免疫不全マウスや遺伝子改変マウスの皮下へ移植し、組織学的、生化学的に検討を行った。足場素材のみを移植した場合と比較し、再生軟骨では惹起される組織反応が低く、移植された軟骨細胞が積極的に免疫反応に関与することにより再生軟骨の成熟に貢献している可能性が示唆された。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
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：歯学・外科系歯学

キーワード：移植・再生医療、再生医学、軟骨、足場素材

## 1. 研究開始当初の背景

口腔外科臨床において、口唇口蓋裂を始めとする先天異常、外傷や腫瘍切除後に生じる組織欠損を補う再建術として、従来から自家組織移植や人工材料の充填が行われてきた。これらの手術法は、安定した治療実績を持つ優れた方法ではあるが、自家組織移植では、組織採取部位に新たな組織欠損や瘢痕を生じ、また人工材料の移植においても、感染や異物反応による人工物の吸収、露出など、長期的予後への不安を有する。このような問題点を克服する新しい技術開発への期待が高まるなか、近年、低侵襲でより安定した組織再建を実現する方法として、組織再生医療が

脚光を浴びている。

軟骨再生医療は、再生医療の中でも比較的臨床応用が進んでいる領域で、主に軟骨細胞を主体とした移植法が臨床応用されている。この移植法は、自己細胞を利用するため免疫反応や感染症が問題となりにくい一方、形態付与や強度の確保が困難であり、適応が部分的軟骨欠損に限られる。力学的形態的に優れた再生軟骨移植を実現するためには、軟骨細胞に多孔性足場素材の併用が望まれるが、足場素材に対する過剰な組織反応は再生組織の成熟を阻害する可能性もあるため、組織反応に関する詳細な検討が必要である。

## 2. 研究の目的

生分解性足場素材を含有する再生軟骨組織における組織反応を解明する一助として、PLLA 足場素材と軟骨細胞で構築される再生軟骨組織をマウス皮下へ移植し、組織反応の生物学的機序を解明すると共に、得られた情報を足場素材の素材や構造の設計に反映させ、生体親和性に優れた再生軟骨移植の実現を目指す。

## 3. 研究の方法

ヒト耳介軟骨細胞とポリ乳酸 (PLLA) 多孔性足場素材で構築されるインプラント再生軟骨をヌードマウスの皮下へ移植し、一定期間後に移植片を摘出し、移植片中の炎症反応を組織学的、生化学的に評価した。移植する再生軟骨の種類として、1%アテロコラーゲンゲル 200  $\mu$ l に懸濁したヒト耳介軟骨細胞  $2 \times 10^7$  cell を PLLA 足場素材 (4 x 4 x 3 mm) に浸透させた群 (PLLA/cell/gel, n=9) の他に、コントロール群として、DMEM に懸濁したヒト耳介軟骨細胞  $2 \times 10^7$  cell を PLLA に浸透させた群 (PLLA/cell, n=9) DMEM を PLLA に浸透させた群 (PLLA, n=9) の 3 群で実験を行った。移植対象としてヌードマウスを利用した場合、T細胞系を介した免疫反応に乏しく、再生軟骨移植に伴う移植組織ならびに周囲の組織反応に関して得られる情報に制限がある。そこで次に、純系マウス (C57BL/J) の耳介軟骨から軟骨細胞を効率よく採取する実験系を確立し、その細胞を用いてマウス再生軟骨を作製後、同じ遺伝子型 (C57BL/J) を持つ別個体のマウスへ移植した。移植後経時的に移植片ならびに周囲組織を摘出し、組織反応の評価を行った。さらに、EGFP 遺伝子導入マウス (C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)C14-Y01-FM1310sb, グリーンマウス) を上記マウス自家移植実験の donor あるいは recipient として利用し、donor-recipient の相互作用を経時的に追跡した。

## 4. 研究成果

### (1) ヒト再生耳介軟骨の生体親和性に関する検討

摘出した再生組織のトルイジンブルー染色において、PLLA/cell/gel 群では、経時的にメタクロマジーの増強を認め、移植後 8 週では強いメタクロマジーを示す良好な再生軟骨が広範に観察された。PLLA/cell 群では、移植された軟骨細胞の保持力が減少するため、移植組織における再生軟骨の割合が減少し、メタクロマジーを示す再生軟骨が島状に散見された。PLLA 群では、再生軟骨は見られなかった。(Fig. 1)

また、ヒト再生軟骨組織を移植した群では、PLLA のみを移植した群と比較し、移植後 2 週で、組織ヘモグロビン量や炎症性サイトカイ

ン IL-1 $\beta$ 量が低下していた。(Fig. 2)

Fig. 1 再生軟骨組織のトルイジンブルー染色

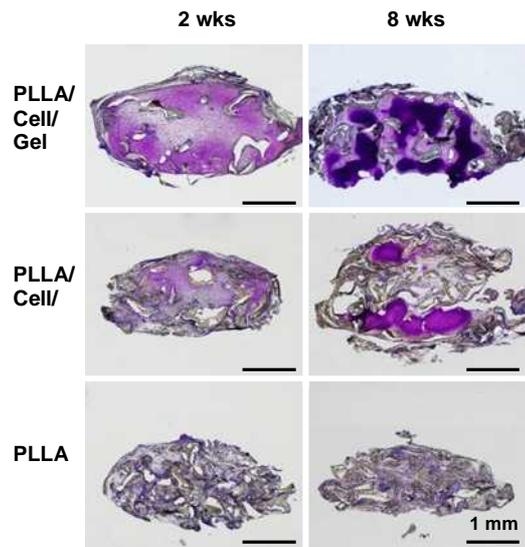
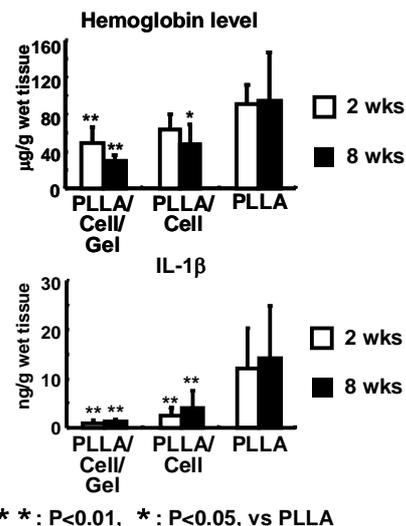


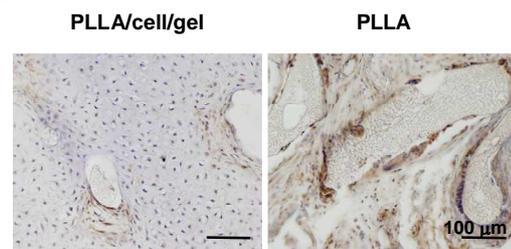
Fig. 2 再生組織における炎症関連物質の定量



\*\* : P<0.01, \* : P<0.05, vs PLLA

抗 F4/80 抗体を用いた免疫組織化学染色において、移植後 8 週の PLLA 群の PLLA 周囲には多核巨細胞やマクロファージの集積が観察された一方、再生軟骨群では再生軟骨が PLLA に接して形成されていた。(Fig. 3)

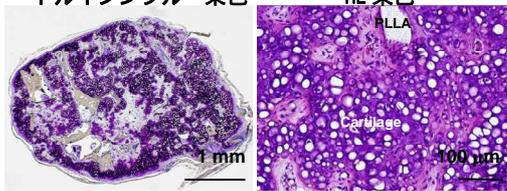
Fig. 3 マクロファージの免疫組織化学的局在



(2) マウス再生耳介軟骨の自家移植における検討法の確立

ヌードマウスはT細胞系を介した免疫反応に乏しく、再生軟骨移植に伴う組織反応に関して得られる情報に制限がある。そこで次に、純系マウス(C57BL/J)の耳介軟骨から軟骨細胞を効率よく採取する方法を検討した。その結果、マウス耳介組織を0.15%コラゲナーゼ溶液で処理(37℃、8時間)することにより、効率よく耳介軟骨細胞を得ることが可能となった。さらに得られた細胞を用いてマウス再生軟骨を作製した後、同じ遺伝子型を持つ別個体のマウスへ自家移植する実験系を確立した。(Fig. 4)

Fig. 4 マウス再生軟骨 (8 wks)  
トルイジンブルー染色 HE 染色



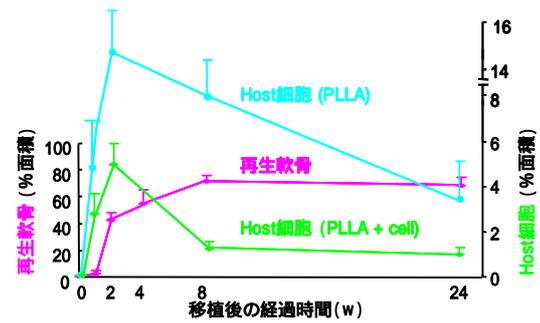
(3) EGFP 遺伝子導入マウスを用いた Donor-Recipient 相互反応の細胞学的追跡

再生軟骨移植に伴う組織反応をより詳細に解明するため、C57BL/6J マウス耳介軟骨細胞とポリ乳酸(PLLA)足場素材を用いて作製した再生軟骨組織をEGFP遺伝子導入マウス背部皮下へ同系移植した。摘出した移植片を蛍光顕微鏡下で観察し、donor と recipient 由来の細胞をEGFPの傾向を指標として経時的に追跡した。

移植後1週でdonor由来細胞と散在性に混在していたrecipient由来細胞は、移植後2週にはdonor由来細胞で形成される集落の周辺に偏在する傾向を示し、更に移植後8週の成熟した再生軟骨組織では、非軟骨領域にのみ局在が確認された。また、軟骨細胞を含有しないPLLA足場素材のみを移植した場合には、細胞を含有する再生軟骨組織と比較し、recipient由来細胞が移植片により多く侵入していることが明らかとなり、再生組織に含まれる軟骨細胞が組織反応の抑制に貢献している可能性が示唆された。

移植組織内において再生軟骨と recipient 由来細胞が占める面積の変化を評価したところ、再生軟骨が占める割合は経時的に増加し、8週以降プラトーに達した。Recipient 由来細胞は、移植後急激に増加する一方、2週以降徐々に減少する傾向を示した。移植直後から2週に、移植組織内で多くのhost由来細胞がdonor細胞と混在することが明らかとなった。(Fig.5)

Fig. 5 移植組織内において再生軟骨と host 由来細胞が占める面積の変化



(4) Donor-Recipient 相互反応を最適化する足場素材の設計と評価

Donor と recipient の相互反応を最適化する足場素材を検討した。乳酸とグリコール酸との共重合体(PLGA)の足場素材と比較し、PLLA足場素材を用いた再生軟骨では移植後2週における組織ヘモグロビン量や炎症性サイトカイン量が有意に低くなっており、組織反応が惹起されにくい特性を有することが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計10件)

Fujihara Y, Asawa Y, Takato T, Hoshi K. Tissue Reactions to Engineered Cartilage Based on Poly L-Lactic Acid Scaffolds. *Tissue Eng in press*. 査読有.

Ogasawara T, Ohba S, Fujihara Y, Takahashi T, Liu G, Chikazu D, Suenaga H, Chung UI, Yoda T, Mori Y, Susami T, Takato T, Hoshi K. Effects of transforming growth factor (TGF)  $\beta$ 1 in combination with fibroblast growth factor (FGF)-2 and insulin-like growth factor (IGF)-I on chondrocytes proliferation culture for the cartilage regenerative medicine. *Asian J Oral Maxillofac Surg in press*. 査読有.

Asawa Y, Ogasawara T, Takahashi T, Yamaoka H, Nishizawa S, Matsudaira K, Mori Y, Takato T, Hoshi K. Aptitude of auricular and nasoseptal chondrocytes cultured under a monolayer or three dimensional condition for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng in press*. 査読有.

Liu G, Iwata K, Ogasawara T, Watanabe J, Fukazawa K, Ishihara K, Asawa Y,

Fujihara Y, Chung UI, Moro T, Takatori Y, Takato T, Nakamura K, Kawaguchi H, Hoshi K. Selection of highly osteogenic and chondrogenic cells from bone marrow stromal cells in biocompatible polymer coated plates. J Biomed Mater Res *in press*. 査読有.

Nishizawa S, Yamaoka H, Matsui M, Hirabayashi S, Hoshi K, Koshima I, Yamaoka K. Selection and effect of ointment bases for preparing collagenase inhibitor ointment using HPLC and franzcell apparatus. Annal Plast Surg *in press*. 査読有.

Komura M, Komura H, Kanamori Y, Tanaka Y, Suzuki K, Sugiyama M, Nakahara S, Kawashima H, Hatanaka A, Hoshi K, Ikada Y, Tabata Y, Iwanaka T. An animal model study for tissue engineered trachea fabricated from a biodegradable scaffold using chondrocytes to augment repair of tracheal stenosis. J Pediatr Surg. 43: 2141-2146 (2008). 査読有.

Tanaka Y, Ogasawara T, Asawa Y, Yamaoka H, Nishizawa S, Mori Y, Takato T, Hoshi K. Growth factor contents of autologous human sera prepared by different production methods and their biological effects on chondrocytes. Cell Biol Int. 32: 505-514(2008). 査読有.

Komura M, Komura H, Tanaka Y, Kanamori Y, Sugiyama M, Nakahara S, Kawashima H, Suzuki K, Hoshi K, Iwanaka T. Human tracheal chondrocytes as a cell source for augmenting stenotic tracheal segments: the first feasibility study in an in vivo culture system. Pediatr Surg Int. 24: 1117-1121(2008). 査読有.

Takahashi T, Ogasawara T, Asawa Y, Mori Y, Uchinuma E, Takato T, Hoshi K. Three-dimensional microenvironments retain chondrocyte phenotypes during proliferation culture. Tissue Eng. 17: 1583-92 (2007). 査読有.

Liu G, Kawaguchi H, Ogasawara T, Asawa Y, Kishimoto J, Takahashi T, Chung UI, Yamaoka H, Asato H, Nakamura K, Takato T, Hoshi H. Optimal combination of soluble factors for tissue engineering of permanent cartilage from cultured human chondrocytes. J Biol Chem. 282: 20407-20415 (2007). 査読有.

〔学会発表〕(計 8件)

星 和人 ほか. 軟骨再生医療の適応拡大にむけて. 第8回日本再生医療学会総会.

2009/3/6 東京.

金澤 三四朗、星 和人 ほか. アガロースでカプセル化した軟骨細胞に対する組織反応の評価. 第8回日本再生医療学会総会. 2009/3/6 東京.

星 和人 ほか. 3次元組織構築のための戦略 「三次元形状と力学的強度を有するインプラント型再生軟骨作製の試み」. 第7回日本再生医療学会総会. 2008/3/13 名古屋.

Kazuto Hoshi et al. Implant-type Tissue-engineered Cartilage Made of Human Auricular Chondrocytes and Biodegradable Scaffolds. TERMIS-AP meeting. 2007/12/4 Tokyo.

Yoko Tanaka, Kazuto Hoshi et al. Examination of Scaffold System Suitable for Implant-type Tissue-engineered Cartilage. TERMIS-AP meeting. 2007/12/4 Tokyo.

Yuko Fujihara, Kazuto Hoshi et al. Assessment of the Early Phase Tissue Reactions in the Engineered Cartilage Based on Biomaterial. TERMIS-AP meeting. 2007/12/4 Tokyo.

Kazuto Hoshi et al. Luncheon Seminars: Challenges in Realizing Implant-type Tissue-engineered Cartilage. TERMIS-AP meeting. 2007/12/4 Tokyo.

Yuko Fujihara, Kazuto Hoshi et al. Tissue reactions around the tissue-engineered cartilage based on biopolymers. TERMIS-EU chapter meeting. 2007/9/6 UK (London).

〔その他〕  
特記事項なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤原 久子 (FUJIHARA HISAKO)  
東京大学・医学部附属病院・医員  
研究者番号: 80396746

### (2) 研究分担者

星 和人 (HOSHI KAZUTO)  
東京大学・医学部附属病院・特任准教授  
研究者番号: 30344451

近津 大地 (CHIKAZU DAICHI)  
東京大学・医学部附属病院・病院講師  
研究者番号: 30343122

松崎 雅子 (MATSUZAKI MASAKO)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 80313154

大橋 克巳 (OHASHI KATSUMI)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 6023323