

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19791037

研究課題名（和文） 細胞ベース人工関節の開発

研究課題名（英文） Development of cell based artificial joint

研究代表者

中山 功一 (KOICHI NAKAYAMA)

佐賀大学・理工学部・教授

研究者番号：50420609

研究成果の概要（和文）：

我々は細胞だけで立体構造体を作成し、損傷した組織に直接移植を可能とするセルデリバリーシステムを開発した。あわせて、任意の形状・曲面をもった生体材料の表面に厚みをもった細胞層をコーティングする技術も開発しており、今回、骨に穏やかに吸収・置換されるトリリン酸系の素材と組み合わせることにより、すべて自分自身の組織に置き換わる細胞ベースの人工関節の開発を行うことを目的として、本研究をおこなった。3次元スキャナを用いて、家兔大腿骨遠位関節面の形状をスキャンし、3Dデータを得た。このデータをPC上のCADソフトウェア上で解析を行い、いくつかのデザインパターンを作成し、これをネガティブ化した形状のモールドを作成した。家兔から採取した未分化間葉系幹細胞を増殖させ、作成した3Dテンプレートである $\alpha$ -TCPにコーティングを行い、そのままCO<sub>2</sub>インキュベーターで、培養を行った。おおよそ1カ月程度で想定した形状の厚みをもった細胞層がコーティングされた細胞+ $\alpha$ -TCPの細胞構造体を得られた。しかし、未分化な幹細胞のみから形成されているため、この細胞+ $\alpha$ -TCPの細胞構造体は、扱いが難しく、脆弱であるため、細胞層の脱落や、TCPのひび割れなど、動物実験に持ち込むにはいくつかの改善が必要であると思われた。おそらく、幹細胞が未分化なため、細胞外マトリクスがほとんどないため、細胞層の強度が全くないことと、細胞と培養液の交通性を高めるために設けたTCP内の微細孔の形状に問題があると予想した。そのため、最終年度はバイオリクターを自作し、細胞単独層に培養液が循環できるシステムで培養したところ、従来に比べて大幅に強度が増した。今後早期の臨床応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：

Articular cartilage has poor capability of healing when damaged. Yet, there have been various attempts for cartilage regeneration, there still no ideal treatments were established.

Current major treatment for damage joints are replacing the damaged joints to metal based artificial joint replacement.

The purpose of the study is to develop a cell based artificial joint for entire cartilage surface regeneration by using our scaffold-free-cell-construct-building technology.

With use of rabbit mesenchymal stem cell, we build thick curved cell only layer by 3mm thickness on the pre-3D-designed Alfa-TCP construct.

The pilot transplantation showed good and supportive result.

Though it requires some optimizations, this approach is promising for joint regeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	630,000	3,830,000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：外科学・整形外科学

キーワード：①再生医学 ②細胞・組織 ③外科 ④移植・再生医療 ⑤バイオテクノロジー

### 1. 研究開始当初の背景

近年、失われた・損傷した臓器の機能再生を目的として、体外で増殖させた細胞を患部に移植する方法が盛んに研究され、一部では臨床応用されている。特に関節軟骨は一度損傷すると自己修復する能力が乏しいため、軟骨細胞や間葉系幹細胞を用いた細胞移植の試みが数多くなされている。

すでに、細胞ベースの人工関節を研究しているグループは複数存在する。しかし、我々の渉猟し得た範囲の中では、1. 薄い細胞層の人工関節か、2. 細胞にポリマーやカラーゲンなどの生体吸収性材料を混合したものによって厚みを持たせた人工関節しか存在しない。

関節軟骨は血管をもたない特殊な組織であるため、1. の薄い細胞層では体内に移植しても正常の軟骨の厚みが得られるとは考えがたく、2の生体吸収性材料もほとんど吸収されることなく、素材の安全性などの問題がつかまとう。

### 2. 研究の目的

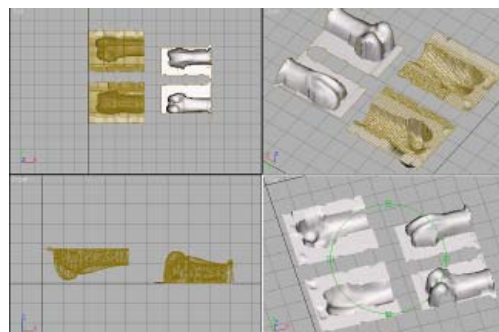
我々は細胞だけで十分な厚みをもった細胞構造体を作成することに成功しており、この技術を応用し、広範囲の関節軟骨の再生を行う十分な厚みを持った細胞ベースの人工関節の開発を試みる。

### 3. 研究の方法

#### 細胞ベースの人工関節の開発及び、形状のデザインの検討

我々はすでに、任意の形状の素材の表面に、厚みを持った細胞層をコーティングする技術を確立している。今回はその実証実験とし

て、間葉系幹細胞だけを用いて、ヒト正常軟骨と同等の厚み（5mm以上）を持った細胞層と、骨に穏やかに吸収・置換されるアパタイト系の素材（ $\alpha$ -トリリン酸カルシウム）と組み合わせることにより、すべて自分自身の組織に置き換わる細胞ベースの人工関節の開発を行う。あわせて、既存の人工関節と同等の形状が望ましいのか、独自のデザインが望ましいのか検討した。具体的には3次元スキャナを用いて、家兔大腿骨遠位関節面の形状をスキャンし、3Dデータ化しこのデータをPC上のCADソフトウェア上で解析を行い、最適な形状のモールドを作成した。



3Dデータをもとにモールドを作成

このモールドデータに基づきラピッド・プロトタイピングシステムを利用して実際の鋳型を作成した。これに $\alpha$ -トリリン酸カルシウムを流し込むことにより、任意の形状の土台が作成できた。この土台に各種軟骨系の細胞をコーティングし、実際の移植に耐えられるかの評価を行った。

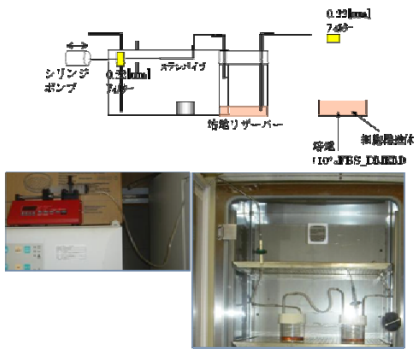


①未分化間葉系幹細胞を用いた細胞ベースの人工関節の開発 骨髄から採取した未分化な間葉系幹細胞を用いて、細胞だけからなる細胞層を作成する。これを土台となる $\alpha$ -トリリン酸カルシウムの上に、5 mm程度の厚みをもたせてコーティングする。

② 間葉系幹細胞を軟骨に分化誘導した、細胞ベースの人工関節の開発 前述の①の細胞層は、コラーゲンなどのタンパク質が乏しく、移植後の体内で、細胞のタンパク質産生と共に強度が増していくため、手術後から正常な軟骨になるまでの時間がかかる。このため、移植前から正常に近い強度を有するよう、培養細胞に成長因子や機械的刺激をあたえ幹細胞を軟骨に分化誘導を試みた。

特に土台の部分である $\alpha$ -TCPと細胞層とのインターフェースには培養液などの栄養が届きにくいと考えられるため、passiveな培養液の拡散のみならず、シリンジポンプをもちいた active な培養液の供給を検討した。

#### Tidal Culture systemを用いた肝細胞構造体の機能評価



#### ③正常軟骨に近い細胞ベースの人工関節の開発

各種培養条件を調整することにより正常軟骨に近い力学特性をもった人工関節の開発をめざす。具体的には②で得られた成果を元にして、培養中に力学的負荷を細胞層にあたえ、細胞外マトリックスの増加を試みる。想定している力学的負荷には静水圧負荷装置や超音波刺激装置を検討している。とくに、超音波刺激装置は骨折の治癒を促進することが広く知られており、実際の臨床の現場に導入されていることから、培養中の軟骨組織にも細胞外マトリックスの産生促進効果が期待できる。さらに超音波は非接触で刺激できる点からもクリーン性が求められる細胞培養や再生医療にてきした手法であると期待している。

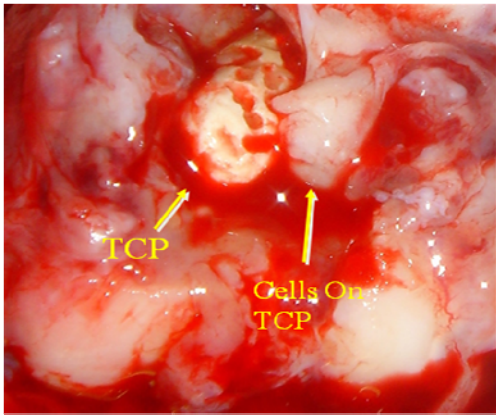
#### ④家兎を用いた動物実験

上記のデータを踏まえ、実際の動物実験を行う。動物から採取した骨髄由来間葉系幹細胞を大量培養し、細胞ベースの膝置換型人工関節を作成した。一定の期間培養後、動物へ人工関節置換術を行う。移植直後の細胞層は非常に脆弱であったため、細胞が生着すると予想されるまでの期間＝手術後3週間程度は、簡易型創外固定を自作しさらに膝関節へギプス固定を行った。約半年後に移植サンプルを回収し肉眼的評価および、組織学的評価を行った。

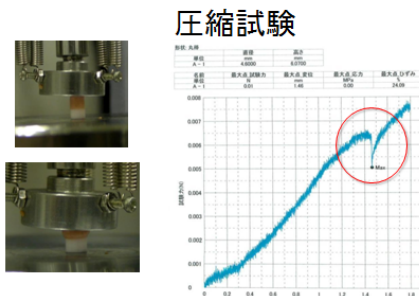


#### 4. 研究成果

①の未分化間葉系幹細胞+ $\alpha$ -TCP 複合体を家兎の大腿骨膝関節面に自家細胞移植を行ったところ、細胞層が非常に脆弱であったため移植の途中で一部分の細胞層の脱落がみられた。しかし、移植後約半年にサンプルを回収したところ、残存した細胞層はほぼ移植直後の形態をとどめており、我々の仮説がほぼ実証された。



② ①の未分化間葉系幹細胞構造体は、細胞外マトリックスのほとんど乏しいため、力学的強度が全くない。そのため移植時のハンドリングが非常に困難であることが改めて認識された。これらを解決するため、細胞だけの構造体の力学的強度を培養中に増加させる手法を検討し、前述のシリジポンプを用いたTiad1 Cultureシステム化において軟骨細胞からなる細胞構造体+ $\alpha$ -TCP 複合体をアスコルビン酸添加下で培養した。その結果比較的強度をもった細胞構造体を得られたため、島津製作所製の圧縮試験器により強度測定を行った。その結果、正常の軟骨には及ばないが、ある程度の復元力を持った力学的強度を有することが判明した。(図中 赤丸)



移植直前の品質管理へ応用の可能性

さらなる培養条件や手術手法の改善などが必要であるが、我々の基本コンセプトが正しいことがわかり、将来の実用化が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

①Establishment of an animal model of a pasteurized bone graft, with a preliminary analysis of muscle coverage or FGF-2 administration to the graft. Yoshida T, Sakamoto A, Tsukamoto N, Nakayama K, Iwamoto Y. J Orthop Surg Res. 査読あり Aug 4 2009;4:31

② Mevastatin reduces cartilage degradation in rabbit experimental osteoarthritis through inhibition of synovial inflammation.

Akasaki Y, Matsuda S, Nakayama K, Fukagawa S, Miura H, Iwamoto Y. Osteoarthritis Cartilage. 査読あり ;17(2): 2009 Feb, 2 35-43.

〔学会発表〕(計13件)

①九州大学母子総合研究リサーチコアカンファレンス

「Bio Rapid prototyping project;細胞だけで作る立体構造体の再生医療への応用」福岡 2010/3/26 , 中山功一

②長崎大学医学部再生医療セミナー兼105回大学院セミナー(共催) 「Bio Rapid prototyping project;細胞だけで作る立体構造体の再生医療への応用」長崎 2010/3/23, 中山功一

③大阪商工会議所主催第12回次世代医療システム産業化フォーラム「Bio Rapid prototyping project;細胞だけで作る立体構造体の再生医療への応用」大阪 2010/3/16, 中山功一

④Japanese University Network in the Bay Area (JUNBA)

“Bio Rapid Prototyping Project; Scaffold Free Cell Assembling Technology for Autologous Organ Transplantation” San Francisco USA 2010/1/12, Nakayama K

⑤九州大学 第50回先端医工学セミナー Bio rapid prototyping project : scaffold free による細胞立体構造体の3Dマイクロパターンニング 福岡 2009/11/24/ , 中山功一

⑥九州バイオニックMEMS研究会・講演会 「Bio Rapid prototyping project;細胞だけで作る立体構造体の再生医療への応用」福岡 2009/4/28/, 中山功一

⑦The TERMIS-NA 2008 Annual Conference & Exposition(December 7 - 10, 2008 San Diego, USA)

Bio-rapid prototyping project: A simple method to build living 3D micro patterned cell construct ex vivo without scaffold Nakayama K, Shimoto T, Zhang X, Matsuda S, Miura H, Iwamoto Y

⑧LSJ (Life science in Japanese/ Japan Bio

community) セミナー

” Scaffold Bio rapid prototyping project” . Palo Alto, USA 約30人 (Dec. 5, 2008,) , Nakayama K

⑨ 2008 Annual Conference of Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society - Asian Pacific Region (November 6-8, 2008 Taipei, Taiwan)  
Bio-rapid prototyping project: A simple method to build living 3D micro patterned cell construct ex vivo without scaffold  
Nakayama K, Shimoto T, Zhang X, Matsuda S, Miura H, Iwamoto Y

⑩九州大学 CA オフィスセミナー  
自己の幹細胞だけで行う骨・軟骨の再生医療 San Jose, USA 約20人 (Feb. 29, 2008,) , 中山功一

⑪ The 6th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies (Oct 20-24, 2007 Honolulu, HI USA).  
ONE-YEAR FOLLOW UP OF OSTEO-CHONDRAL REGENERATION BY SCAFFOLD FREE MESENCHYMAL STEM CELL IMPLANTATION  
Nakayama K, Matsuda S, Akasaki Y, Fukagawa S, Miura H, Iwamoto Y

⑫7th World Congress of the International Cartilage Repair Society (Sep 29 - Oct 02, 2007, Warsaw -Poland)  
ONE-YEAR FOLLOW UP OF OSTEO-CHONDRAL REGENERATION BY SCAFFOLD FREE MESENCHYMAL STEM CELL IMPLANTATION  
Nakayama K, Matsuda S, Akasaki Y, Fukagawa S, Miura H, Iwamoto Y

⑬15th triennial congress of Asia Pacific orthopedic Association  
“ Overview of Cartilage tissue engineering” , Seoul, Korea (Sep 9-13, 2007), Nakayama K

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中山 功一 (KOICHI NAKAYAMA)

佐賀大学・理工学部・教授

研究者番号 : 50420609