

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19791313

研究課題名 (和文) 生体内軟骨再生技術の開発

研究課題名 (英文) Development of technique for the cartilage tissue engineering in vivo

研究代表者

白石 将毅 (SHIRAIISHI MASAKI)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：60438059

研究成果の概要 (和文)：ラットを用いて生体内軟骨再生を試みた。ラット骨髄から間葉系幹細胞を分離培養し成長因子 TGF- β 1 を用いて軟骨細胞へ分化誘導した。分化誘導した細胞をコラーゲンゲルに包埋し三次元培養を行ったところ部分的に軟骨組織を認めた。生体内軟骨再生の母床作製のため、chamber method を模倣した肉芽組織作製を行った。作製された肉芽には皮膚移植することができ、十分に軟骨再生の苗床となりえると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：We investigate the cartilage tissue engineering in vivo by using rat model. Mesenchymal stem cells, isolated from rat bone marrow, were cultured and differentiated to chondrocyte by the growth factor, TGF- β 1. The differentiated cells were seeded into the collagen gel scaffold and 3-D cultured. It resulted in increased cartilaginous tissue in part. Additionally, due to develop the recipient bed for cartilage tissue engineering in vivo, we attempted to make granulation tissues in vivo by mimicking the chamber method. Subsequently grafted skin was well survived on this granulation tissue, and it seemed that this granulation tissue could be the recipient bed for cartilage tissue engineering in vivo.

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	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	570,000	3,570,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：再生医学、組織工学、軟骨再生、3次元培養、間葉系幹細胞、生体内組織再生

1. 研究開始当初の背景

生体は様々な原因 (例、先天異常・外傷・腫瘍切除後など) で組織欠損を生じうる。特に軟骨組織はその性質上治癒能力に劣るた

め、その組織欠損の治療は自家組織を用いての再建術が考慮される。しかし自家組織移植には問題点がある。自家組織の採取量には限

りがあること、そして採取に伴い供給部位へ犠牲を強いること (donor morbidity) である。

最近、組織工学的分野が発展し、形態学的な組織再生をも可能にすることが示唆されてきている (Langer R, Vacanti JP: Tissue engineering. Science 260:920-926, 1993)。それに伴い自家軟骨移植の一手法として、自家の軟骨細胞を培養し鋳型に埋入し移植する方法が進歩的かつ有効的治療として臨床的にも報告されてきている (Ochi M, Uchio Y, Kawasaki K, Wakitani S, Iwasa J: Journal of Bone Joint Surgery [Br] 84(4): 571-578, 2002)。しかし、これらの方法はいずれも *ex vivo* で作製されているものであり、形態維持能は有さず、変形、吸収、または分解されてしまう。このことは、臨床的に整容面重視で再建をする際に、致命的な問題であり未だ臨床的には一般的な手技にならないのが現状である。この現象は、体外では、体内で自然に生じる創傷治癒機転や種々のサイトカインの影響がないため、移植後に強く影響を受けることが原因と考えられる。

Yotsuyanagi Tらは軟骨膜の軟骨再生能に着目し体内での軟骨膜移植による軟骨再生能を調査し、生体内軟骨再生の概念を開発した (科学研究費、基盤研究 C、期間：平成 10-12 年度、課題名：軟骨膜の軟骨再生能を利用した 3 次元的組織再建方法の開発)。本法により生成された軟骨は、移植後の吸収量も少なく、臨床応用が可能な手段のひとつとして期待できるものである。しかし問題点として、分量の軟骨が得られないことが挙げられている。

2. 研究の目的

生体内における軟骨組織再生技術の開発はこれまで報告がない。軟骨は他の組織とは異なり低酸素状態で生育が可能な細胞であるため、生体内再生は可能なものと考えられる。

これら生体内軟骨再生に適する細胞、鋳型 (scaffold) の検討、またモデル動物や手技を開発することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 軟骨再生のための cell source の検討

① ラット骨髄間葉系幹細胞 (rat MSC) の分離・培養

Adel Alhadlaq (STEM CELLS AND DEVELOPMENT 13:436-448, 2004) らの方法に則った。SD ラットの大腿骨から骨髄を採取、10%FCS 含 DMEM で suspend し培養フラスコに入れ、5% CO₂, 37°C でインキュベーター内にて培養した。翌日に浮遊細胞を除去、接着細胞のみ培

養し、3、4 日に一度培養液を交換した。Confluent 時に半分をストックする方法 (population doubling) で継代した。

② rat MSC の同定

上記接着細胞の表面抗原に対し血球系細胞表面マーカーである CD31, CD34 そして接着因子マーカーである CD29, CD44 の抗体を用いてフローサイトメトリー (FACS) で検索した。

③ rat MSC から軟骨細胞へ分化誘導およびその確認

上記接着細胞を TGF- β 1 含有培養液で培養し、軟骨細胞への分化を促した。軟骨細胞への分化の指標として、転写因子である SOX9 の発現、II 型コラーゲンの産生を検討した。

rat MSC を TGF- β 1 の濃度が異なる培養液で培養し、培養後 3 日目にそれぞれの細胞を回収し RNeasy にて mRNA を抽出し、ラットの SOX9 に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を施行した。

また rat MSC を TGF- β 1 の濃度の異なる培養液で培養し、培養後 2, 4 週目にそれぞれの細胞を回収し II 型コラーゲン抗体を用いて Western blot を施行した。

(2) scaffold と 3 次元培養

Scaffold と 3 次元培養には Ochi M (Journal of Bone Joint Surgery [Br] 84(4): 571-578, 2002) らの I 型コラーゲンを scaffold に用いる方法を行った。I 型コラーゲン酸性溶液に 10 倍濃度の培養液、血清などを冷却混和し、ペレットにしておいた rat MSC をこの溶液で suspend した。それを直径 25mm の petri dish に注ぎインキュベーターで 2 時間培養しゲル化させた。あらかじめ 10 cm 培養皿に培養液を注いでおき、先程固めた細胞包含ゲルを petri dish からはがし培養皿へ移し入れた。細胞包含ゲルが培養液に浮遊した状態で培養した。TGF- β 1 (10 ng/ml) 含有培養液で培養し、4 週間後にゲルを採取し組織標本とした。HE 染色および軟骨器質を染色するアルジャンブルー染色、トルイジンブルー染色、免疫染色 (II 型コラーゲン抗体) を行い組織学的に検討した。

(3) 生体内軟骨培養モデルの作製

生体内軟骨培養に先立ち、生体内肉芽組織作製モデル (Tanaka Y: Plastic and Reconstructive Surgery 112(6):1636-1644, 2003) を模倣し新生肉芽組織を生体内で作製することを試みた。SD ラットをエーテル麻酔後、鼠径部皮膚を皮切し、大腿動静脈を同定しそこから下腹部皮膚皮下組織 (脂肪) へ走行する枝を確認した。その枝を血管茎とし脂

肪組織弁を挙上し(図 1a)、これに人工真皮を縫合固定し(図 1b)、プラスチックの chamber に入れて(図 1c)、ラットの下腹部皮下に埋入し(図 1d)、鼠径部皮膚を閉創した。1 ヶ月後、chamber を取り出し、肉芽組織が作製されているか組織学的に検討した。さらに、これら肉芽組織が viable であるか確かめるためにラット腹部より皮膚を採取し新生肉芽組織へ移植し、2 週間後生着の有無を肉眼的、組織学的に検討した。



図 1a



図 1b



図 1c



図 1d

4. 研究成果

(1) 軟骨再生のための cell source の検討

軟骨細胞の培養を行っている施設の研究者と軟骨細胞培養に関し検討した際、軟骨細胞は増殖するが次第に軟骨基質を産生しなくなる (dedifferentiation)、軟骨基質を産生させ続けるにはサイトカイン (TGF-beta1 など) が必要、との情報を得た。元々増殖能力に乏しく in vivo での採取量も少ない軟骨細胞を用いた軟骨組織再生は基質を産生させていく点からも問題を含む可能性があり、増殖能力に長け臨床的にも採取の容易な骨髄間葉系幹細胞 (MSC) を用いての軟骨組織再生の方が有利であると考えた。

そこでラットを用いての実験系において MSC を採取し軟骨細胞へ分化させ軟骨組織を再生できるのか検討した。ラット骨髄から採取された接着細胞は、Population doubling にて継代していくと 50 継代以上培養可能なことを確認した。

次にこれら細胞が MSC であることを確認するために細胞表面抗原を調べてみた。現在のところ、MSC 特異的な表面抗原は同定されていないので、様々な表面抗原の組み合わせで確認することとした。FACS による結果は CD31(-)、CD34(-)、CD29(+)、CD44(+) で文献的に矛盾なく MSC であることが示唆された。

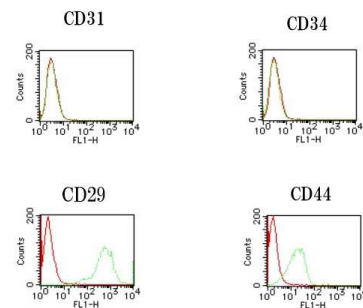


図 2 ラット骨髄培養細胞 (rat MSC) の細胞表面抗原

次に MSC を軟骨細胞に TGF- β 1 を投与し分化誘導を行った。RT-PCR を用いて SOX9 の発現を検討したところ、TGF β 1 含有培養液で培養されたこの細胞では、TGF β 1 の濃度依存性に SOX9 の発現が増強した(図 3)。

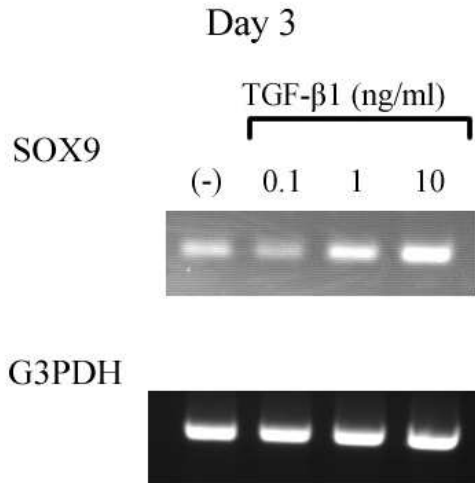


図 3 rat MSC の TGF- β 1 による SOX9 の発現増強

Western Blotting を用いて II 型コラーゲン産生について検討したところ、TGF β 1 の濃度依存性に II 型コラーゲンの産生が増加した(図 4)。

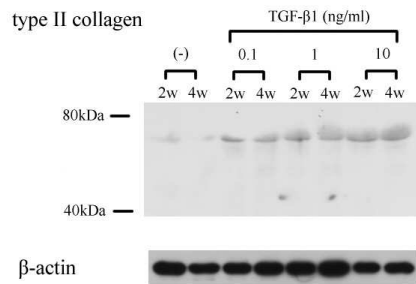


図 4 rat MSC の TGF- β 1 による II 型コラーゲンの産生促進

以上のことより rat MSC は軟骨細胞へ分化誘導されうることを確認した。

(2) scaffold と 3 次元培養

rat MSC を I 型コラーゲンゲルに包埋し、TGF- β 1 含有培養液にて 3 次元培養を 4 週間行い組織学的に検討した。軟骨器質を染色するアルシアンブルー染色(図 5 右上)やトルイ

ジンブルー染色(図 5 左下) ではほぼ全体的に染色されていたが II 型コラーゲンの免疫染色(図 5 右下)では部分的にしか染色されていないかった。HE 染色(図 5 左上)では単球様の細胞も認められた。

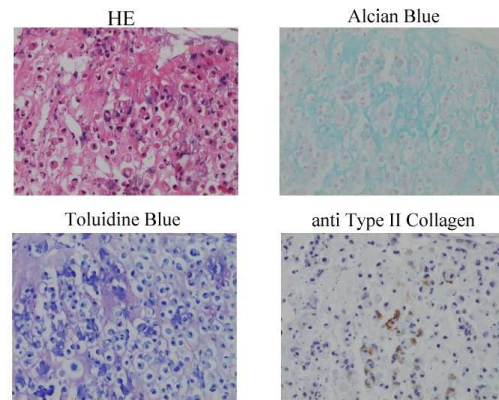


図 5 rat MSC の 3 次元培養 4 週間後の組織像 (左上: HE 染色、右上: アルシアンブルー染色、左下: トルイジンブルー染色、右下: II 型コラーゲン免疫染色)

また図 3、図 4 において、特に TGF- β 1 で刺激しなくとも SOX-9 の発現がみられたり、II 型コラーゲンを産生したりしていることから、既に軟骨へ分化している細胞も含まれており、この方法で分離採取される rat MSC は雑多な細胞集団であることが示唆された。

今後この細胞集団から軟骨分化をしやすい細胞群を純化させる方法の検討が必要と考えられた。

(3) 生体内軟骨培養モデルの作製

手術から 1 ヶ月後に chamber を取り出したところ、人工真皮は消失し部分的に肉芽組織の増生を認めた(図 6a)。これらは組織学的にも肉芽組織を認めた(図 6b)。

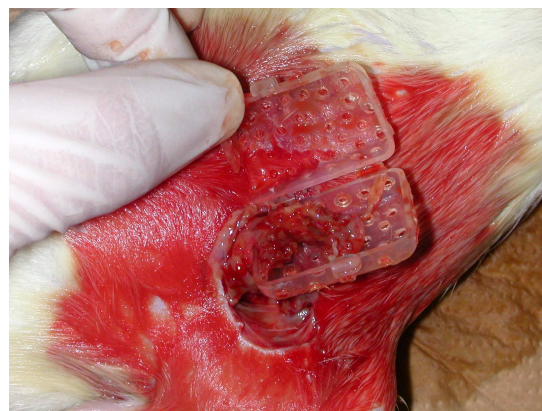


図 6a

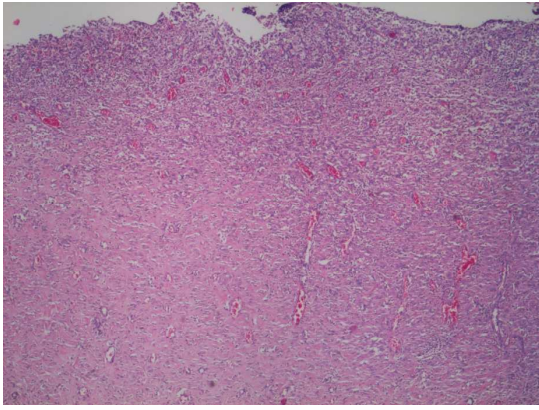


図 6b

更にこの肉芽組織に自家皮膚移植をしたところ生着が認められ、有茎皮弁様に血管茎を用いて移動も可能であった(図 7a)。組織学的にも肉芽には上皮が覆っていた(図 7b)。

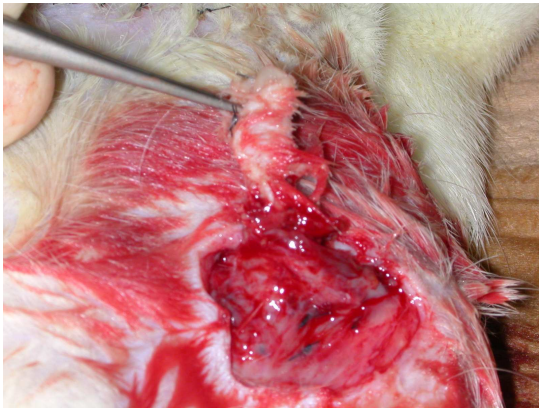


図 7a

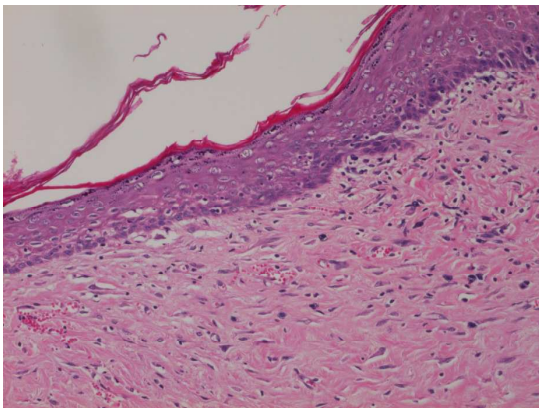


図 7b

以上のことより、この新生肉芽組織は viable であり血行に富むため、細胞が生存しやすい環境となることが考えられた。今後、この新生肉芽組織内へ上記(2)で作製した3次元培養軟骨組織を移植し軟骨新生が可能であるか検討する予定である。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白石 将毅 (SHIRAIISHI MASAKI)

札幌医科大学・医学部・研究員

研究者番号：60438059

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

四ッ柳 高敏 (YOTSUYANAGI TAKATOSHI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：70250595