

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10020

研究課題名(和文) 表面改質した複合型吸収性ナノファイバー足場を用いた耳介形状軟骨の3次元再生誘導

研究課題名(英文) Ethanol pretreatment of nanoPGA/PCL composite scaffolds enhances human chondrocyte development in the tissue-engineered auricle constructs

研究代表者

磯貝 典孝(Noritaka, Isogai)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：90203067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：耳介形状の軟骨再生において、生体内で3次元耳介形状を維持する方法を確立することを目的とした。実験では、PGA ナノファイバー(nanoPGA)とポリ-ε-カプロラクトン(PCL)を組み合わせた複合型吸収性スキャフォールドをエタノール処理して播種細胞の親水性を高め、軟骨再生における効果を検討した。その結果、スキャフォールドの生体内移植後20週間目において、有意に高いSOX5遺伝子発現が誘導され、サフラニン陽性染色部位はスキャフォールド内部に拡大していることが判明した。エタノールによる複合型吸収性スキャフォールドの表面改質は、経時的に軟骨の基質産生を促進し耳介形状軟骨再生における有効性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

耳介軟骨の再生誘導技術を臨床応用する上で、耳介特有の3次元形状が単に再現されるのみでなく、長期的形状が維持され、成長や経年変化についても考慮されていることが望まれる。今回の研究より、エタノール表面改質した複合型吸収性スキャフォールド(耳介足場)は、高い軟骨再生能と3次元耳介形状を長期維持するために必要な高い力学的特性を有しており、今後、本表面改質技術は3次元形状軟骨の再生誘導を臨床応用する上で、有用な基盤技術になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Human chondrocytes were seeded onto three-dimensional bioresorbable composite scaffolds (PCL with surface coverage of nanoPGA) either with or without ethanol pretreatment and then implanted into athymic mice for 10 and 20 weeks. After implantation for 10 weeks, constructs of human auricular chondrocytes seeded onto ethanol-treated scaffolds were covered with glossy cartilage. RT-qPCR analyses of chondrocytes grown on ethanol-treated scaffolds showed greater expression levels for several cartilage-related genes compared to cells developed on untreated scaffolds with statistically significantly increased SRY-box transcription factor 5 (SOX5) and decreased interleukin-1 (inflammation-related) expression levels. Findings suggest enhancing nanoPGA/PCL scaffold hydrophilicity utilizing ethanol improves the cellular microenvironment and cartilage regeneration in tissue-engineered auricle constructs.

研究分野：形成外科学

キーワード：Ethanol treatment scaffold cartilage tissue engineering ear hydrophilicity

1. 研究開始当初の背景

(1) Tissue engineering は、生分解性ポリマーに細胞および成長因子を組み合わせ、臨床的に使用可能な移植組織を再生誘導する技術であり、1988年 Vacanti らによってその基本概念が提唱された¹。1997年、Cao らはこの基盤技術をさらに発展させ、ヒト耳介形状を有する軟骨を再生誘導し、耳介形成手術における新しいオプションとして Tissue engineering が将来重要な役割を果たすことを示唆した²。

(2) 本技術をヒトへ臨床応用するためには、小動物実験および前臨床試験となる大動物を用いた自家移植モデルにおける軟骨再生が不可欠であるが、その実験成績は未だ不良である³⁻⁵。小動物モデル(免疫不全マウス)では、移植後10か月において耳輪、対耳輪、舟状窩などの耳介に特徴的な構造が部分的に消失し、さらに、大動物自家移植モデルでは、強い炎症反応と不良な軟骨再生により、移植後3か月において耳介構造の全体が消失することが報告されている⁶。

(3) 組織再生誘導において、播種細胞の種類⁷⁻¹¹、至適濃度、細胞分布、接着性、生存率、軟骨細胞増殖や基質産生を誘導するサイトカイン、細胞の増殖や分化に必要な微小環境や3次元形状を付与する足場材料(スキャホールド)の力学的強度、多孔性、連通性、組織親和性の諸問題が推測され、基盤技術を確立するためにはこれらの因子を詳細に再検討する必要があると考えた。

(4) 近年、足場材料を本来の細胞外基質に近い微細構造をもつナノファイバーに加工する技術が開発され、軟骨組織再生用の新しい足場材料として注目されている。これまでわれわれは、ナノファイバー化した生分解性ポリマーPGA (Poly glycolic acid) を生体親和性と力学的強度を兼ね備えた非分解性ポリマーであるプロリンと組み合わせ、ヒト耳介形状を有する複合型非吸収性高分子を導入して軟骨再生を試みた。この結果、播種細胞の接着効率は著しく向上し、大動物(イヌ)を用いた自家移植モデルにおいて、良好な軟骨再生が可能となった。しかし、プロリンでは、正常耳介が持つ複雑な3次元形状、薄さ、しなやかさを長期間維持することは不可能であり、臨床応用を可能とする耳介形状軟骨の再生誘導は、未だ改善の余地が残されている。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、Tissue engineering における3要素の中で、特にスカフォールドの改良に焦点を絞り、耳介形状PCL (poly-ε-caprolactone) の表面をナノファイバー化したPGA (nanoPGA) にて被覆して複合型吸収性スカフォールド(nanoPGA/PCL) を作製した。この足場を導入して、これまで困難であった耳介の複雑な立体構造を生体内で長期維持できる技術を新規に開発することを目的として研究をおこなった。

(2) 本研究では、ナノファイバー化したPGA にヒト軟骨細胞を播種し、ナノファイバーにおける播種細胞の細胞分布および生存率を検討した(実験1)。さらに、細胞接着を高めるため複合型吸収性スカフォールドの疎水化表面を親水化し、これにヒト耳介軟骨細胞を播種した後にヌードマウス皮下に移植して、耳介形状軟骨の再生誘導を行った。複合型吸収性スカフォールドの表面改質が軟骨基質産生および軟骨被覆率に及ぼす影響について検討した(実験2)。

3 . 研究の方法

(1) 実験 1 : ナノファイバー化した PGA における播種細胞の細胞分布、接着能、および生存率
ヒトたち耳軟骨より単離した軟骨細胞を nanoPGA 不織布 長さ 1 cm、幅 1 cm、厚さ 80 μ m に播種した。コントロール群の足場材料として従来径 PGA を用いた。軟骨細胞の播種濃度は、 100×10^6 個/ml に調節した。細胞・ポリマー複合体は、播種細胞がポリマー表面に細胞接着するために要する 6 時間の間、インキュベーター内 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2) に静置した。その後、あらかじめ作成した細胞培養液を培養皿に静かに注ぎ、細胞・ポリマー複合体をインキュベーター内 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2) で 7 日間培養した。培養液の交換は、週 2 回行った。培養開始後 1 週目に、培養軟骨細胞を 10%ホルマリンにて固定し、トルイジンブルー染色を行った。倒立および偏光顕微鏡を用いて複合体を構成する細胞およびポリマーを観察した。また、培養開始より 1 週間の培養過程における播種細胞の継時的な生存率を検討した。培養液に 1.5 ml PrestoBlue 液 (invitrogen, Frederick, MD, 10 倍希釈) を加えて培養 (20 分) し、プレートリーダー (Synergy MX, Bio Tek, USA) にて吸光度を計測し、総播種細胞数に対する生軟骨細胞の割合を算出した。

(2) 実験 2 : 複合型吸収性スカフォールドの表面改質が軟骨基質の産生および軟骨被覆率に及ぼす影響

ナノファイバーPGAシートおよび耳介形状PCLの表面性状はともに疎水性である。細胞接着は、親水性表面に吸着する細胞接着性たんぱく質を介して生じるため、ポリマー材料の疎水性表面を親水化する必要がある。そこで、エタノール浸漬処理を行いポリマー材料の疎水性表面に親水性を付与した。エタノール浸漬処理の後、複合型吸収性スカフォールドにヒトたち耳より単離した軟骨細胞を播種して、無胸腺マウスの背部皮下に移植した。移植後 10 週および 20 週目に標本を採取し、複合型吸収性スカフォールドの表面改質が軟骨基質の産生および軟骨被覆率に及ぼす影響について、肉眼所見、組織所見、および遺伝子発現を検討した。

4 . 研究結果

(1) ナノファイバー化した PGA (nanoPGA) における播種細胞の細胞分布、接着能、および生存率 (生細胞比による比較)

播種細胞の細胞分布: 培養開始後 7 日目におけるポリマーおよびポリマー内部の細胞分布を検討した。偏光顕微鏡を用いた検討より、nanoPGA 群では、薄く密なナノファイバー構造が観察された。一方、PGA 群では、厚いポリマー内部に散在するポリマーが観察された。次に倒立顕微鏡を用いた検討より、nanoPGA 群では、薄いポリマーの両面に播種細胞が集積し、細胞質の好塩基性は強く染色されていた。軟骨細胞は分化すると、プロテオグリカン合成が盛んとなり、著明なメタクロマジーを示す。今回の結果より、nanoPGA に播種された細胞では、メタクロマジーの顕著な増強が観察され、高い細胞活性が示唆された。ポリマー内部への細胞浸潤像は認められなかった。一方、PGA 群では、播種細胞がポリマー繊維束の周辺に散在して観察され、ポリマー一間の空隙に細胞成分は認められなかった。

接着能と生存率：培養期間中の総播種細胞数に対する生細胞数の割合を、生存率として検討した。その結果、培養1日目における生存率は、nanoPGA群（約39%）とPGA群（約17%）の間に有意差を認めた。この結果より、播種細胞のポリマーへの接着は、nanoPGA群が明らかに良好であることが判明した。その後の培養経過において、両群ともに生細胞数は急速に増加し、培養3日目にプラトーに達した。培養経過中の生存率はnanoPGA群において有意に高く、培養5日目のnanoPGA群における生存率は、PGA群に比較して、約1.5倍高い値を示した。

（2）複合型吸収性スcaffoldの表面改質が軟骨基質産生に及ぼす影響

肉眼所見および組織学的検討：エタノール処理群において、スcaffoldの表面は白色光沢を帯びた軟骨組織で覆われていた。一方、コントロール群では、スcaffoldが薄い結合組織に覆われ、軟骨再生はスcaffoldの一部に局限して観察された。組織学的に検討した結果、エタノール処理群では、nanoPGA領域に一致した表面部において再生軟骨が観察された。コントロール群における軟骨形成はスcaffold表面部に限局的に認められたが、全体的に不良であった。両群ともに、スcaffold内部は、Safranin OおよびVerhoeff染色に陰性であり、軟骨再生は認められなかった。

RT-PCR：RT-PCRを用いて、再生組織における軟骨関連遺伝子（Type II, Elastin, Sox 5）およびアポトーシス・炎症関連遺伝子（Caspase 8 および 9, IL-1）の発現を解析した。その結果、エタノール処理による表面改質により全ての軟骨関連遺伝子発現は亢進する傾向を示した。特に、エタノール処理により有意に高いSox 5の遺伝子発現が認められた。一方、アポトーシス関連遺伝子の発現に変化は認められなかったが、炎症関連遺伝子であるIL-1の発現は、エタノール処理により有意に低下した。

（3）複合型吸収性スcaffoldの表面改質が軟骨基質の産生および軟骨被覆率に及ぼす経時的な影響

肉眼所見：複合型吸収性スcaffoldを用いて、移植後10週目および20週目の軟骨再生を比較検討した。移植後10週目では、スcaffoldの一部に足場の小孔が透見された。この所見に比較して、移植後20週目では、スcaffold表面に白色色調や光沢が観察され、耳介特有の輪郭形状がより明瞭に表現された。

組織学検討：移植後10週目では、スcaffoldの表面部にSafranin O染色陽性領域を認めた。スcaffold内部における陽性反応は不十分であった。移植後20週目において、スcaffoldの辺縁部のSafranin O染色陽性領域は内部に向けて拡大し、表面のみでなくスcaffold内部においても陽性領域が観察された。この結果、エタノール処理を行ったスcaffoldの表面に生じた軟骨再生は経時的に進行し、スcaffold中心部に向かって軟骨再生が促進することが示唆された。

軟骨基質の産生と軟骨被覆率：画像解析ソフトウェア（Image J, National Institutes of Health）を用いて、Safranin O染色された軟骨再生の面積比およびスcaffoldが再生軟骨により被覆される軟骨被覆率を調べた。その結果、軟骨再生面積比は、移植後10週目（約20%）に比較して、移植後20週目において有意な高値（約40%）を示し、経時的な軟骨基質の増加が認めら

れた。一方、軟骨被覆率は、10週目において63%であったが、20週目には88%に有意に増加した。これらの結果より、表面改質した複合型吸収性スカフォールドは、経時的な軟骨基質産生を促進し、耳介形状を長期維持するための足場として適していることが判明した。

<引用文献>

1. Vacant JP , Morse MA , Saltzman WM , Dumb AJ , Perez-Stayed A , Langer R (1988) Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices . J Pediatr Surg 23: 3-9
2. Cao Y , Vacanti JP , Paige KT , Upton J , Vacanti CA (1997) Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear . Plast Reconstr Surg 100: 297-302
3. Saim AB , Cao Y , Weng Y , Chang CN , Vacanti MA , Vacanti CA , Eavey RD (2000) Engineering autogenous cartilage in the shape of a helix using an injectable hydrogel scaffold . Laryngoscope 110 : 1694-1697
4. Shieh SJ , Terada S , Vacanti JP (2004) Tissue engineering auricular reconstruction : in vivo and in vitro studies . Biomaterials 25 : 1545-1557
5. Kamil SH , Vacanti MP , Aminuddin BS , Jackson MJ , Vacanti CA , Eavey RD (2004) Tissue engineering of a human sized and shaped auricle using a mold . Laryngoscope 114: 867-870
6. Han Tsung Liao, et al. (2015) Prefabricated, ear-shaped cartilage tissue engineering by scaffold-free porcine chondrocyte membrane. Plast Reconstr Surg 135: 313e-321e
7. Ting V, et al. (1998) in vitro prefabrication of human cartilage shapes using fibrin glue and human chondrocytes. Ann Plast Surg 40:413-420
8. Xu JW, et al. (2004) Injectable tissue-engineered cartilage with different chondrocyte sources. Plast Reconstr Surg 113:1361-1371
9. Isogai N, Kusuhara H, Ikada Y, Ohtani H, Jacquet R, Hillyer J, Lowder E, Landis WJ (2006) Comparison of different chondrocytes for use in tissue engineering of cartilage model structures. Tissue Eng 12:691-703
10. Kusuhara H, et al. (2009) Tissue engineering a model for the human ear: assessment of size, shape, morphology, and gene expression following seeding of different chondrocytes. Wound Repair and Regeneration 17:136-146
11. Park SS, Jin HR, Chi DH, Taylor RS (2004) Characteristics of tissue-engineered cartilage from human auricular chondrocyte. Biomaterials 25:2363-2369

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 Hirano N, Kusahara H, Sueyoshi Y, Teramura T, Murthy A, Asamura S, Isogai N, Jacquet RD, Landis WJ | 4. 巻 16(7) |
| 2. 論文標題 Ethanol treatment of nanoPGA/PCL composite scaffolds enhances human chondrocyte development in the cellular microenvironment of tissue-engineered auricle constructs. | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 PLoS One | 6. 最初と最後の頁 e0253149 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0253149 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 該当する |

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 Childs RD, Nakao H, Isogai N, Murthy A, Landis WJ | 4. 巻 15(6) |
| 2. 論文標題 An analytical study of neocartilage from microtia and otoplasty surgical remnants: A possible application for BMP7 in microtia development and regeneration | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 PLoS One | 6. 最初と最後の頁 e0234650 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0234650. eCollection 2020. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名 磯貝典孝 |
| 2. 発表標題 高生体親和性人工耳介の開発と実用化 |
| 3. 学会等名 第20回日本再生医療学会 シンポジウム（東京） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 平野成彦 |
| 2. 発表標題 複合吸収性スキャフォールドを用いた耳介形状軟骨の再生誘導におけるエタノール前処置の有効性 |
| 3. 学会等名 第30回日本形成外科学会基礎学術集会（東京） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 末吉 遊, 磯貝典孝 |
| 2. 発表標題 耳介再生医療の実用化に向けた高生体親和性人工耳介の開発 |
| 3. 学会等名 第29回日本形成外科学会基礎学術集会 シンポジウム (横浜) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 西川侑輝, 末吉 遊, 平野成彦, 中尾仁美, 山内 誠, 磯貝典孝 |
| 2. 発表標題 ヒト耳介軟骨の再生誘導における軟骨膜細胞の役割 |
| 3. 学会等名 第29回日本形成外科学会基礎学術集会 シンポジウム (横浜) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 磯貝典孝, 末吉 遊 |
| 2. 発表標題 微細加工装置を用いた新規再生誘導技術の現状 |
| 3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会シンポジウム(横浜) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 磯貝典孝, 末吉 遊 |
| 2. 発表標題 形成外科領域におけるDDS技術を導入した再生医療の臨床展開 |
| 3. 学会等名 第35回日本DDS学会シンポジウム (横浜) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 末吉 遊, 磯貝典孝 |
| 2. 発表標題 コラゲナ - ゼ表面処理を行った微細加工軟骨の性状が軟骨再生に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 第9回日本D D S再生医療研究会(京都) |
| 4. 発表年 2019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 | 諸富 公昭 (Morotomi Tadaaki) (10388580) | 近畿大学・医学部・准教授 (34419) | |
| 研究分担者 | 楠原 廣久 (Kusuhara Hirohisa) (50388550) | 近畿大学・医学部・講師 (34419) | |
| 研究分担者 | 和田 仁孝 (Yoshitaka Wada) (10460883) | 和歌山県立医科大学・医学部・准教授 (24701) | |

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 |
|---------|---------|