

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K20695

研究課題名（和文）靱帯組織成分から構成される組織工学的人工靱帯の開発

研究課題名（英文）Development of Tissue-Engineered Artificial Ligament made from Ligament Matrix

研究代表者

晝河 政希（HIRUKAWA, Masaki）

三重大学・工学研究科・助教

研究者番号：40823456

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：前十字靱帯などの膝関節靱帯はスポーツ等で損傷を受けやすい組織であり、損傷した際には再建手術が行われているが、自家腱を用いた方法では採取部の腱組織の強度が低下し、人工靱帯を用いた方法では移植する靱帯と移植部周辺の骨組織との結合が困難という問題がある。本研究ではこれらの問題を解決するため、正常組織を犠牲にすることなく患者自身の靱帯組織を再生できる新規人工靱帯の開発を目的とした。コラーゲン、エラスチンからなる高強度材料を基材とした新規人工靱帯モデルを考案し、生体外での培養により組織化誘導が可能な組織工学的人工靱帯を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工靱帯に関する研究は現在でも多くの研究者が取り組んでおり、合成高分子材料や天然由来材料を用いて作製した人工靱帯が報告されている。他の報告例と本研究の異なる点および特徴として以下が挙げられる。

靱帯の成分として知られるコラーゲン、エラスチン、靱帯細胞で靱帯組織特有の靱帯一骨段階構造を再現できる新規人工靱帯の開発を試みた。これまでにコラーゲンと細胞を用いた報告例は様々あるが、エラスチンを用いた報告例はほとんどない。

靱帯一骨段階構造再現のために幹細胞や骨芽細胞でなく、靱帯細胞への刺激による骨化誘導を行う。人工靱帯作製に靱帯細胞のみを用いることで、より簡便なプロセスでの開発を目的とした。

研究成果の概要（英文）：When knee ligaments (e.g. anterior cruciate ligament) are injured, reconstructive surgery is sometimes required to restore function. Methods of reconstructive surgery include transplantation of an artificial ligament and autotransplantation of a tendon. However, these methods have limitations related to the strength of the bone-ligament insertion and biocompatibility of the transplanted tissue after surgery. In this study, we focused on development of Tissue-Engineered Artificial Ligament (TEAL) which does not need autologous tendon. We fabricated TEAL made from elastin/collagen high strength fiber materials. From the in vitro experiments, we have succeeded in the development of TEAL which can be expected to replace the original tissue caused by ligamentization.

研究分野：生体材料学

キーワード：人工靱帯 エラスチン コラーゲン 靱帯細胞 組織工学 細胞足場

1. 研究開始当初の背景

靭帯組織は骨と骨をつなぎ、関節の運動を制御する組織である。近年、スポーツ等の運動時に起こる無理な動き等が原因となって靭帯に負荷がかかり、靭帯損傷が起こるケースが多く、テレビ等でもスポーツ選手の靭帯損傷が報道されている。しかし、前十字靭帯をはじめとする関節内靭帯は血管が乏しい環境下に存在しているため自然修復が望めず、損傷した状態で放置すると変形性関節症などの二次的損傷につながる恐れがある。現在では自家腱を用いた再建手術による治療が主であり人工靭帯は補助的にのみ使用されている。しかし、自家腱を用いるため採取部の本来の腱組織の強度が低下し、術後の痛みが残るという問題がある。人工靭帯に関して、生分解性高分子材料を用いた研究や、天然由来材料を用いた研究も多く報告されているが、実用化には至っていない。また、靭帯成分の1つであるエラスチンを用いた人工靭帯の報告も我々の先行研究のみである。そこで本研究では、「靭帯を構成する成分(コラーゲン、エラスチン、靭帯細胞)のみでの組織工学的人工靭帯の作製」を目的とする。

コラーゲンは組織の剛性を担うタンパク質であり、エラスチンは組織の弾性を担うタンパク質として知られる。我々の先行研究より、靭帯基質のエラスチンを損傷靭帯に対して局所投与することで組織の治癒反応を促進することが明らかとなった。また、コラーゲン、エラスチン足場材料および生分解性高分子材料のポリジオキサノン系を複合した組織工学的人工靭帯の開発にも取り組んできた。足場材料にあらかじめ靭帯細胞を播種することで人工靭帯の組織化を促進し、ウサギ膝関節靭帯損傷モデルへの移植後6週の時点において、正常靭帯に近い力学強度を達成した。本研究では、新規組織工学的人工靭帯を開発し、生体内への移植、評価までを目指す。これを達成するため、既にウサギ正常膝関節靭帯と同程度の弾性率を有するコラーゲン系状材料の作製に成功している(未発表)。本研究の達成により、患者のスポーツ等への復帰できる可能性を大きく向上させることが可能であると考えている。また、本研究で得られる知見や材料開発の技術は、靭帯だけでなく、腱をはじめとする他の結合組織の再生医療分野にも応用していく。

2. 研究の目的

人工靭帯に関する研究は現在でも多くの研究者が取り組んでおり、合成高分子材料や天然由来材料を用いて作製した人工靭帯が報告されている。他の報告例と本研究の異なる点および特徴として以下が挙げられる。

靭帯の成分として知られるコラーゲン、エラスチン、靭帯細胞のみで靭帯組織特有の段階構造を再現できる新規組織工学的人工靭帯の開発を試みる。これまでにコラーゲンと細胞を用いた報告例はあるが、エラスチンを含む人工靭帯を報告しているのは申請者のみである。

細胞は、靭帯組織より単離、培養した靭帯細胞のみを用いる。他の研究では靭帯と骨の段階構造を再現するために、幹細胞を分化誘導する、または軟骨細胞、骨芽細胞を併用する例が報告されている。本研究では、人工靭帯作製プロセスを簡便にするため、靭帯細胞のみを用いる。先行研究より、エラスチン足場上での靭帯細胞は骨関連マーカーの活性が上昇したため、エラスチンが靭帯細胞の骨分化を誘導することが示されている。また、予備試験結果として、エラスチンを表面コートした生分解性の合成高分子材料を生体内で骨へ移植した結果、材料の引き抜き強度が有意に高くなる結果も得られているため、靭帯と骨の段階構造の再現に効果的であると考えている。

3. 研究の方法

合成高分子材料やシルクなどの天然由来材料を用いた人工靭帯は数多く研究されているが、靭帯基質のみで作製した人工靭帯は今までに報告されていない。本研究では靭帯基質であるコラーゲン、エラスチンを材料化し、靭帯細胞と複合させた正常靭帯を模倣した新規組織工学的人工靭帯の開発を目的とする。研究期間内に以下の項目に関する研究を進める。

人工靭帯のベースとなるコラーゲン材料およびエラスチン材料を作製する。酸可溶性コラーゲンをを用いて湿式紡糸法により糸状材料へ成型し、正常靭帯と同程度の力学的強度を有するコラーゲン線維束を作製する。また、水溶性エラスチンを用いてエレクトロスピンニング法による配向性ファイバーシート材料を作製する。材料の作製は現時点で達成できており、コラーゲン糸状材料に関してはウサギ正常靭帯と同程度の弾性率(18MPa)を有する材料の作製に成功している(未発表)。

作製したコラーゲン、エラスチン材料を足場として靭帯細胞を培養し、細胞応答(細胞増殖速度や基質産生能など)を明らかにする。先行研究より、エラスチンファイバー足場上で靭帯細胞は骨関連マーカーの活性が上昇し、エラスチンが細胞の骨分化を誘導する結果が得られている。また、コラーゲンファイバー足場上では靭帯マーカーであるテノモジュリンの発現上昇が確認された。本研究ではコラーゲン系束上での細胞培養を行い、評価する。

新規人工靭帯モデルを作製する。人工靭帯の移植時には骨との接合が重要となるため、骨挿入部の構造は細胞の骨基質産生が促進される材料を用いる。また、一般的に人工靭帯は再建手術時に固定器具(スクリューやボタン)を用いて骨に固定されるが、人工靭帯の構造を破壊する恐れ

があるため、固定器具を必要としない挿入部構造を同時に検討する。申請者は以前に固定器具を用いない人工靭帯を作製し、動物モデルへ6週間移植したが、試験中に引き抜けるものは無く、骨接合強度が十分であった。

人工靭帯モデル上で靭帯細胞を培養し、生体外において靭帯組織化および骨挿入部の骨化誘導を検討する。誘導には靭帯基質（コラーゲン、エラスチン）の添加培養や動的刺激（加圧、ねじれ等）培養を考えている。先行研究より、加圧刺激を受けた靭帯細胞は骨関連マーカーの遺伝子発現が上昇する結果が得られている。

人工靭帯を動物モデルへ移植し、生体内での評価を行う。評価方法は力学強度測定および組織標本の染色による組織学的評価を検討している。

4. 研究成果

2019年度における研究成果を以下に示す。

人工靭帯モデル作製のため、コラーゲンおよびエラスチンを用いた材料作製を行った。コラーゲンに関しては湿式紡糸法により糸状材料へ成型しており、その際の条件（押出口径、流速、コラーゲン濃度、架橋剤濃度）による力学的特性への影響を調査し、モデル作製のための基礎データを得た。作製した材料を足場として細胞の応答調査を行った。コラーゲン糸状材料については複数本を束ねた糸束へ細胞を播種し、細胞活性を調査した。一週間の培養において細胞活性の低下はなく、足場材料としての問題は見られなかった。エラスチン材料についてはエレクトロスピンニング法によりファイバーシート材料を作製し、それを足場とした細胞のALP活性について調査した。ファイバーシート材料の線維配向の有無によらず細胞のALP活性は確認されたため、人工靭帯の骨挿入部材料としての有用性が示唆された。人工靭帯モデルを検討のため、コラーゲン糸束の力学的特性について評価した。コラーゲン糸状材料の弾性率に関しては、今後の移植試験を想定している家兎膝靭帯（約18MPa）より高い値（約26MPa）であったが、破断強度に関しては、まだ不十分であることが示唆された。

2020年度における研究成果を以下に示す。

人工靭帯の移植時には骨との接合が重要である。骨挿入部の材料には、靭帯の成分であり、細胞の骨基質産生を促すことが示唆されたエラスチンを細胞足場とし、靭帯実質部にはI型コラーゲンおよびIII型コラーゲンからなる足場材料を用いて靭帯骨段階構造の再現を目的とした人工靭帯モデルを作製した。コラーゲン足場は本来の靭帯同様に線維に配向性を持たせ、エラスチン足場は骨基質産生に有利な結果が得られた配向性を持たない構造とした。作製した人工靭帯モデル上で靭帯細胞を培養し、生体外における靭帯組織化および骨挿入部の骨化誘導について検討した。前十字靭帯は膝の屈曲に応じてねじれが生じることが報告されているため、ねじれ刺激と加圧刺激を与える独自の培養装置を作製し、人工靭帯モデルに与える靭帯化、骨化への影響について評価したところ、モデルの靭帯実質部ではテノモジュリンやIII型コラーゲンの遺伝子発現増加が、骨挿入部ではRunx2の遺伝子発現増加が見られた。

2021年度における研究成果を以下に示す。

新規組織工学的人工靭帯モデルに関して力学的強度が不十分であったため、新規組織工学的人工靭帯の基材となるコラーゲン材料およびエラスチン材料の改良を試みた。これまで当研究では人工靭帯の基材としてコラーゲン線維材料を作製してきたが、よりネイティブな靭帯組織を模倣するため、エラスチンを含む混合線維材料を開発した。コラーゲンとエラスチンの比率を変えることでヒト前十字靭帯の力学特性と近い値を有する材料の作製に成功した。この材料を用いて再度新規組織工学的人工靭帯モデルの検討と新規組織工学的人工靭帯モデルの培養試験および靭帯化、骨化誘導方法についての試験を行った。また、人工靭帯移植時の骨癒合促進材料としてのエラスチンゲルの作製と評価を行い、細胞の骨分化誘導効果が見られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 長谷美里, 長瀬周平, 森田透地, 晝河政希, 宮本啓一
2. 発表標題 組織工学的人工靭帯開発のための靭帯基質（コラーゲン・エラスチン）を用いた糸状材料の作製と特性制御
3. 学会等名 第36回ライフサポート学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shuhei Nagase, Misato Hase, Tochi Morita, Masaki Hirukawa, Keiichi Miyamoto
2. 発表標題 Study on braided collagen scaffold for tissue engineered artificial ligament development
3. 学会等名 The 11th International Symposium for Sustainability by Engineering at MIU (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Misato Hase, Shuhei Nagase, Tochi Morita, Kota Inoue, Masaki Hirukawa, Keiichi Miyamoto
2. 発表標題 Mechanical Properties of Collagen/Elastin Hybrid Scaffold for Tissue-Engineered Artificial Ligament
3. 学会等名 The 11th International Symposium for Sustainability by Engineering at MIU (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 晝河政希, 山本星都, 長谷美里, 長瀬周平, 森田透地, 井上綱太, 宮本啓一
2. 発表標題 動的刺激による組織工学的人工靭帯の靭帯 骨段階構造の誘導
3. 学会等名 第59回日本人工臓器学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hoshito Yamamoto, Misato Hase, Syuhei Nagase, Kota Inoue, Masahiro Hasegawa, Akihiro Sudo, Keiichi Miyamoto, Masaki Hirukawa
2. 発表標題 Effect of Dynamic culture to tissue engineered artificial ligament for reproducing ligament-bone junction
3. 学会等名 The 10th International Symposium for Sustainability by Engineering at MIU (国際学会)
4. 発表年 2020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

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