

機関番号：22701  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20592101  
 研究課題名（和文） 頭蓋・顎・顔面領域におけるヒト耳介軟骨前駆細胞を用いた軟骨再生法の開発  
 研究課題名（英文） The development of cartilage regeneration methods using the human auricular cartilage progenitor cells in craniofacial deformity.  
 研究代表者  
 小林真司 (KOBAYASHI SHINJI)  
 横浜市立大学・医学研究科・客員研究員  
 研究者番号：90464536

## 研究成果の概要（和文）：

ヒト耳介軟骨膜から分離されたヒト軟骨前駆細胞は、軟骨細胞と比較して極めて高い増殖能と多分化能を有しているだけでなく、軟骨細胞と同様に軟骨基質産生能を有していることが明らかとなった。さらに、軟骨前駆細胞を重症免疫不全マウスに移植した結果、正常な耳介軟骨と同様に軟骨膜組織で覆われた軟骨が再構築された。コンドロイチン硫酸とハイドロキシアパタイト粒子を複合化した新規スキャフォールド(pCol-HAp/ChS)に播種した結果では、より大きい軟骨が再構築された。

## 研究成果の概要（英文）：

Human cartilage progenitor cells(hCPCs), which were isolated from auricular perichondrium had not only high proliferative and multipotent capacity that human chondrocytes(hCs) did not have, but had same cartilage extracellular matrix capacity as hCs. Furthermore, in vivo hCPCs formed the cartilage with perichondrium as normal auricular cartilage. The hCPCs with hydroxyapatite/chondroitin sulfate composite also formed larger cartilage in vivo.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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

## 1. 研究開始当初の背景

形成外科で扱う頭蓋・顎・顔面領域では、先天奇形や外傷による組織欠損のために、組織充填物として自家組織が用いられることが多い。自家組織の中でも耳介軟骨や肋軟骨は加工が容易であるため使用頻度が高い。しかし、軟骨採取部位の犠牲は大きく、変形、醜形、欠損などがしばしば問題となる。これらの問題点を解決するために、培養軟骨細胞から軟骨組織を再構築する軟骨再生医療が試みられているが、採取部位の損傷や軟骨細胞の寿命に起因する長期間（10年単位）の形態保持能力の点で問題があると考えられる。我々は、これら従来の軟骨移植の問題点を解決するためにヒト耳介軟骨前駆細胞に着目した。我々はすでに、ヒト耳介軟骨膜から極めて高い増殖能と多分化能を有する軟骨前駆細胞を分離・培養することに成功している。本細胞を用いることにより、長期形態維持性に優れた軟骨再生が可能となることが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では、このヒト軟骨前駆細胞の分離・培養技術を基盤として、3次元的なヒト軟骨組織を再構成し医療応用するための細胞操作技術を開発することを試みる。すなわち、ヒト耳介の弾性軟骨における軟骨前駆細胞の分離・同定後に、軟骨への分化能の特性解析を行う。次に、分離したヒト軟骨前駆細胞の操作技術を検討し、臨床応用の可能な優れた弾性軟骨再構築法の開発を行うために、生体内におけるヒト軟骨前駆細胞由来再生軟骨の免疫不全マウスへの移植による再生軟骨の評価を行う。さらに新規に開発した生分解性足場材料がヒト弾性軟骨の再構築に有用か否かを検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト軟骨前駆細胞の特性解析

#### A. ヒト軟骨前駆細胞の分離・培養

横浜市立大学附属病院倫理委員会より承認を得て (approval #03-074), 30人の小耳症患者より、手術の際に余剰となる残存耳介弾性軟骨を供与頂き研究を遂行した。軟骨膜部を分離し、組織を細切後、細胞を分取した。各組織の細胞懸濁液はナイロンメッシュ (BD Biosciences) で濾過し、PBSによる洗浄を3度行った。細胞懸濁液は、37℃, CO<sub>2</sub> 5%に設定したインキュベータで10% fetal bovine serum (MOREGATE), 1% Antibiotic Antimycotic Solution (SIGMA) を含有する Dulbecco's modified Eagle medium and Ham's F-12 medium (日水製薬) を含む増殖培地により培養を行った。尚、長期増殖能の評価では、継代に際し血球計算板を用いて細胞数をカウントした後、1200 cells/cm<sup>2</sup> の密度で 35mm ディッシュに播種し、コンフルエントに達した際に同様に継代をする、という操作を繰り返した。

#### B. コロニーアッセイ

各細胞を、35 mm 細胞培養ディッシュに 52 cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種した。14日間の増殖培地による培養後、コロニー数のカウントを行った。カウントに際してはギムザ染色 (武藤化学薬品) による染色を行った後、50個以上の細胞集団を1コロニーとし定量した。

#### C. 軟骨分化能解析

軟骨分化誘導に関して、積層化培養法を用いた。各細胞を 2.5×10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種し、播種後 48時間まで増殖培地で培養を行い、その後は L-ascorbic acid 2-phosphate (SIGMA), Dexamethasone (SIGMA), human-recombinant Insulin-like Growth Factor- I (SIGMA), human-recombinant basic

Fibroblast Growth Factor (Wako) を添加した分化誘導培地を用いて培養を行った。5 日間の培養の後、さらに  $2.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の細胞を上に乗せ、同様の手順で培養を行うという操作を計 2 回繰り返した。軟骨への分化能を調べるため、Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)、並びに quantitative PCR (qPCR) を行った。RT-PCR による各分化関連遺伝子の発現の確認には以下のプライマーを用いた。type I collagen (COL1A1), type II collagen (COL2A1), type X collagen (COL10A1), aggrecan (ACAN), elastin (ELN) を用いた。qPCR には、TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) の COL1A1 : Hs00266273\_m1, COL2A1 : Hs00164099\_m1, CSPG2 : Hs01007933\_m1, ELN : Hs00355783\_m1, FBN1 : Hs00171191\_m1 の primer/probe set を用いた。さらに、ELISA により軟骨基質産生を調べた。積層化培養による軟骨分化誘導下で培養 1, 3 週間目に、培養上清を回収した。上清中に分泌されたプロテオグリカン、エラスチン、コラーゲンを、それぞれ BLYSCAN, FASTIN, SIRCOL assays (Biocolor) のキットを用いて定量測定を行った。統計学的解析には、まず 3 あるいは 4 群のデータに対し Kruskal Wallis-H test を行い、 $P < 0.01$  と判定された場合に、Mann-Whitney' s U test with Bonferroni correction による多重比較検定を行った。有意確率 P 値が  $P < 0.001$  または  $P < 0.01$  を満たす場合を統計学的有意差ありと判定した。

(2) 生体内におけるヒト軟骨前駆細胞由来再生軟骨の免疫不全マウスへの移植による再生軟骨の評価  
軟骨分化誘導を行った細胞をその産生基質

とともにシリンジに回収し、重症免疫不全マウス (NOD/SCID) (三協) の背部皮下に 1 ml ずつ移植を行った。移植後、1 か月、3 か月、および 10 か月目に摘出を行い、組織学的に検討した。尚、実験動物の飼育、取り扱いに関しては横浜市立大学医学部動物実験センターの規定に基づき行った。組織学的な検討は、組織切片を固定した後、H&E、アルシアンブルー、エラスチカ・ワンギーソン、アリザリンレッド S、オイルレッド O (武藤化学薬品) で組織化学染色を行った。免疫組織化学染色に際しては、rabbit anti-human type I collagen monoclonal antibody (Coll1) (MONOSAN), mouse anti-chicken type II collagen polyclonal antibody (Col2) (CHEMICON) を用いて 4 °C、over night で反応させた。洗浄後、適切な動物種に対する Alexa488- and/or Cy3-conjugated 二次抗体 (1:800, Molecular Probes) を添加し、室温で 1 時間反応させた。その後 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を添加した FA Mounting Fluid (BD Biosciences) にて核染色及び封入を行い、LSM510 Laser Scanning Microscope (ZEISS) を用いて観察、画像を撮影した。

(3) 生体内における足場材料を用いたヒト軟骨前駆細胞由来再生軟骨の作成  
および評価

(2) と同様に軟骨分化誘導を行った細胞を新規足場材料であるコンドロイチン硫酸とハイドロキシアパタイト粒子を複合化した (pCol-HAp/ChS) (Tokyo Institute of Technology) と Collagen sponge (テルモ) に各々 3 カ所ずつ計 1 ml の細胞浮遊液を添加し、NOD/SCID マウスの背部皮下に移植した。移植後は (2) に準じた。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト軟骨前駆細胞の特性解析

###### A. ヒト軟骨前駆細胞の分離・培養

残存耳介軟骨を提供した患者の性別に偏りはなく、平均年齢は  $10.6 \pm 1.4$  歳であった。

###### B. コロニーアッセイ

残存耳介軟骨を外科的に摘出後、軟骨膜部、軟骨-軟骨膜移行部、軟骨実質部の三層に分離し、各々から単離した細胞をそれぞれ培養した。まず各層由来細胞の増殖能を比較するため、低密度培養 ( $52 \text{ cells/cm}^2$ ) によるクローン性コロニー形成能の解析を行った。培養4週後、各細胞からクローン性コロニーが形成された (図1)。

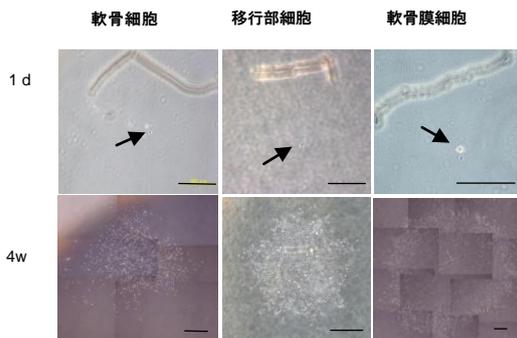


図1 軟骨、移行部、軟骨膜細胞のクローン性コロニー形成能の形態学的観察。 Bars,  $500 \mu\text{m}$ .

形成されたクローン性コロニー数は、播種細胞500個あたり軟骨膜細胞で  $23.9 \pm 4.5$  個、軟骨膜-軟骨移行部細胞で  $9.9 \pm 6.8$  個、軟骨細胞で  $2.3 \pm 0.4$  個であり、軟骨膜細胞は他と比べて極めて高いコロニー形成能を有していた。

軟骨膜細胞の長期的な増殖能を継代培養系で解析した。形態学的には、各層由来細胞は長期培養後 (12w-) には扁平化し、線維芽細胞様の形態を有するようになった。196日

間にわたって14回の継代培養を行った結果、 $9.42 \times 10^3$  個の軟骨膜細胞は、 $1.20 \times 10^{27}$  個まで約  $1.27 \times 10^{22}$  倍に増殖した。一方、 $9.42 \times 10^3$  個の軟骨細胞は、 $1.26 \times 10^{24}$  個まで約  $1.30 \times 10^{19}$  倍に増殖した。すなわち、軟骨膜細胞は軟骨細胞に比べ約949倍の子孫細胞を生み出す能力を有していることが判明し、有意に高い増殖活性をもつことが明らかとなった (図2)。

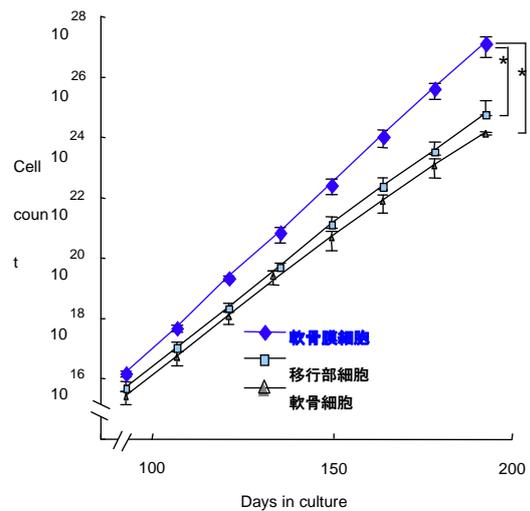


図2 軟骨、移行部、軟骨膜細胞の長期的培養における増殖能 \*Mann-Whitney's U test with Bonferroni correction:  $P < 0.01$ ,  $n=5$ .

###### C. 軟骨分化能解析

軟骨膜細胞の弾性軟骨への分化能を評価することを目的として、積層化培養法を用いて軟骨細胞への分化誘導を行った。軟骨膜細胞は積層化を行うことによって、プロテオグリカン、Type II collagen (Col 2) を産生する軟骨細胞へ分化することが確認された。軟骨膜細胞から分化した軟骨細胞は種々のムコ多糖類を分泌するようになり、培養液は高い粘性を有する基質様性状へと変化した。

軟骨細胞への分化能を定量的に検討するため、リアルタイムPCRを用いた弾性軟骨分化関連遺伝子の発現変化を解析した。軟骨膜細胞を積層化培養することにより、弾性軟骨

に特徴的な基質である versican(CSPG2), elastin (ELN), alpha 1 type II collagen (COL2A1), fibrillin 1 (FBN1) 遺伝子の発現レベルは、各々4.2倍、9.6倍、2.1倍、17.2倍に著明に上昇することが確認された。一方、軟骨膜部に特徴的な alpha 1 type I collagen(COL1A1)の発現は 0.18 倍に低下した。ELISA を用いて、弾性軟骨組織の細胞外マトリックスであるプロテオグリカン、エラスチン、コラーゲン産生能の解析を行ったところ、積層化した軟骨膜細胞においては各々  $17.5 \pm 4.3$ 、 $235.6 \pm 19.9$ 、 $61.8 \pm 7.5 \mu\text{g/ml}$  の基質産生が確認された。驚くべき事に、この基質産生能は、同様に積層化した軟骨細胞のプロテオグリカン、エラスチン、コラーゲン産生能（各々  $19.0 \pm 1.3$ 、 $234.0 \pm 16.3$ 、 $55.8 \pm 4.9 \mu\text{g/ml}$ ）と同等であることが判明した。

## (2) 生体内におけるヒト軟骨前駆細胞

由来再生軟骨の免疫不全マウスへの移植による再生軟骨の評価

ヒト軟骨膜細胞を軟骨分化誘導の後、粘性を帯びた培養上清とともに重症免疫不全マウスの皮下に移植した。尚、比較のためヒト軟骨細胞についても同様の手順で移植を行った。軟骨膜細胞は、移植3ヶ月目に軟骨様組織形成した(図3 i)。組織学的解析から、軟骨膜細胞は、軟骨細胞と同様に *in vivo* で成熟軟骨細胞へと分化し、その産生基質であるプロテオグリカンや弾性線維に富む弾性軟骨組織を再構築することが判明した(図3 b-g, j-o)。一方、免疫組織化学染色からは軟骨膜細胞より再構築された組織においてのみ、Col 2 陽性弾性軟骨組織の周囲を Type I collagen (Col 1) 陽性の膜様組織が被覆していることが確認された(図3 h, p)。長期間に渡って再構築組織が維持されていることを

示すため、軟骨膜細胞を移植後 10 ヶ月目に摘出した組織においても同様の解析を行った。いずれの時点においても摘出組織は Col 1 陽性膜様組織で被覆されており、成熟軟骨細胞とその産生基質から構成される弾性軟骨組織であることが判明した。一方、腫瘍形成や、骨髄由来間葉系幹細胞で見られる様な線維性組織形成、血管侵入や石灰化沈着は全く観察されなかった。これらの結果から、軟骨膜細胞は *in vivo* で生体組織と同様に軟骨実質部、軟骨膜部からなる組織構造を持つ弾性軟骨組織を長期的に再構築することが判明した。

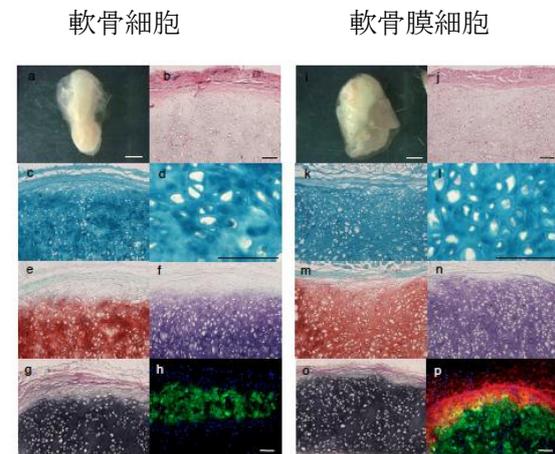


図3 移植後3か月で再構築された軟骨細胞および軟骨膜細胞由来再生軟骨

a, i:肉眼的観察、b, j:H&E 染色、c, d, k, l:アルシアンブルー染色、e, m:サフラニンO染色、f, n:トルイジンブルー染色、g, o:エラスチカ・ワン・ギーソン染色、h, p:コラーゲン1(緑色)、コラーゲン2(赤色)染色

## (3) 生体内における足場材料を用いた ヒト軟骨前駆細胞由来再生軟骨の作成

および評価

分離し培養した軟骨膜細胞および軟骨細胞を生体外で培養し増殖させた後、足場材料に播種し、NOD/SCID マウスの背部皮下に移植を

行った。新規足場材料である pCol-HAp/ChS の電子顕微鏡観察では、その内腔は連通性に富んでおり、力学的特性では弾性軟骨と同様に高い圧縮弾性率を認めた(図 4 上段)。移植 3 ヶ月後に形成された軟骨様組織を摘出し組織学的解析を行った結果、Alcian Blue、弾性線維およびⅡ型コラーゲンで染色され、軟骨周囲をⅠ型コラーゲン陽性の膜様組織が被覆していることが確認された(図 4 下段)。一方、腫瘍形成、線維性組織形成、血管侵入や石灰化沈着は全く観察されなかった。

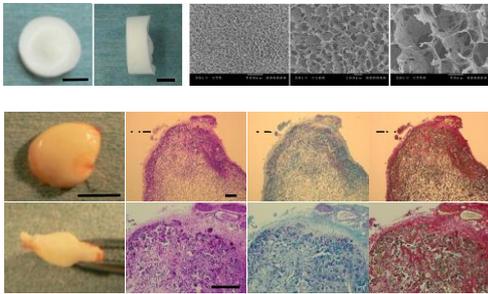


図 4 新規足場材料である pCol-HAp/ChS (上段) と本足場材料を用いた ヒト軟骨前駆細胞由来再生軟骨 (下段)

これらの結果から、軟骨膜細胞は足場材料を用いることにより生体組織と同様な組織構造を持つ、より大型の弾性軟骨組織を長期的に再構築することが判明した。

#### 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 1 件)

①小林眞司、谷口英樹、ヒト耳介弾性軟骨間葉系前駆細胞の特性解析 MATERIALS INTEGRATION 23(2): 43-48, 2010

[学会発表] (計 4 件)

①小林眞司、武部貴則、菅博臣、水野満、矢吹丈一郎、岩井さやか、乾翠、鄭允文、上野康晴、前川二郎、谷口英樹、ヒト耳介由来の弾性軟骨前駆細胞を用いた軟骨再生療法の開発 第 10 回日本再生医療学会総会 2011.3.1-2 東京

②小林眞司、武部貴則、菅博臣、鄭允文、上野康晴、前川二郎、谷口英樹、ヒト耳介弾性軟骨幹/前駆細胞の硝子軟骨組織への分化 第 18 回日本形成外科学会基礎学術集会 10.1-2 2009 東京

③小林眞司、武部貴則、菅博臣、鄭允文、上野康晴、前川二郎、谷口英樹、ヒト耳介軟骨膜細胞の細胞表面マーカーによる特性解析 第 17 回日本形成外科学会基礎学術集会 10.2-3 2008 東京

④武部貴則、小林眞司、前川二郎、谷口英樹、外耳軟骨膜に存在するヒト間葉系前駆細胞の分離・同定 第 6 回幹細胞シンポジウム 5.16-17 2008

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小林眞司 (KOBAYASHI SHINJI)  
横浜市立大学・医学研究科・客員研究員  
研究者番号：90464536

##### (2) 研究分担者

該当なし

##### (3) 連携研究者

前川二郎 (MAEGAWA JIROU)  
横浜市立大学・附属病院・准教授  
研究者番号：70244449

谷口英樹 (TANIGUCHI HIDEKI)  
横浜市立大学・医学研究科・教授  
研究者番号：70292555