

令和 5 年 5 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18425

研究課題名（和文）コラゲナー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

研究課題名（英文）Surface modification of the cubic micro-cartilage by collagenase treatment and its efficacy in cartilage regeneration for ear tissue engineering

研究代表者

伊谷 善仁 (itani, yoshihito)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：70510973

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：われわれは、耳介軟骨を微細加工して軟骨細胞および細胞外基質を含む均一サイズのマイクロ軟骨を作製し、これを細胞供給源として新規軟骨再生技術の確立を試みてきた。この方法は細胞培養を経由しない方法として早期の臨床応用が可能になる利点があるが、再生軟骨組織が充分といえなかった。そこで今回、至適コラゲナーゼ表面処理時間および播種マイクロ軟骨の最適化を検討し、生体軟骨組織から臨床応用に必要な軟骨量を低侵襲で効率的に再生誘導しえる事が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで軟骨の再生誘導では、まず軟骨細胞を体外で細胞培養して増殖させ、次に足場材料に播種させ、作成した細胞・足場の複合体を体内に自家移植する方法が主流であった。この方法では複数回の手術が必要となり、細胞培養は不可欠であった。本研究では、微細加工したマイクロ軟骨にコラゲナーゼ表面処理して細胞供給源とし、足場材料およびサイトカイン徐放システムと組み合わせて移植する手法を提唱した。至適コラゲナーゼ表面処理時間および播種マイクロ軟骨の最適化を検討した。この手法を導入することにより、限られた生体軟骨組織から臨床応用に必要な軟骨量を低侵襲で効率的に再生誘導しえる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In order to enhance cartilage regeneration, surface modification of the cubic micro-cartilage with the collagenase treatment was tested and its efficacy to tissue engineer ear cartilage was investigated. This method has the advantage of enabling early clinical application as it does not require cell culture, but the regenerated cartilage tissue was not sufficient. In this study, efficacy of collagenase treatment on micro-cartilage to expand cartilage regeneration capacity was examined in special reference to optimum length of collagenase treatment and seeding volume of micro-cartilage blocks for ear cartilage tissue engineering, especially in situations where donor cartilage is limited or unavailable.

研究分野：軟骨再生

キーワード：軟骨再生 微細加工軟骨 コラゲナーゼ処理

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

組織工学 (Tissue engineering) とは、吸収性ポリマーに細胞および成長因子を組み合わせ、生体に移植可能な組織を体内で再生誘導する技術である。3次元ヒト耳介形状軟骨の再生誘導に関する数多くの研究結果が報告されてきた。さらに近年の再生誘導法に関する技術開発では、これまで必須とされてきた3大因子(細胞, サイトカイン, 足場)以外に、播種細胞とポリマー材料表面との間に形成されるバイオインターフェイスや組織微小環境などの問題が注目されており、これらに深く関与する細胞外基質、特に細胞接着タンパクの解明が急務となっている。細胞と細胞の間を埋める細胞外基質には、様々なシグナル分子や細胞接着性タンパクが組み込まれており、軟骨細胞の増殖・分化の調整に深く関与していることが広く知られている。再生された耳介形状軟骨を变形させずに長期形状維持するためには、軟骨再生の誘導過程において成熟したコラーゲンやエラスチンが再生軟骨内部に構築されなければならない。この点に関して、bFGF および TGF- $\beta$ 1 を再生過程において投与すれば、形態学的、生化学的にも正常軟骨組織と区別できない成熟した軟骨組織が誘導できることが近年報告された。bFGF は、種々の細胞に対して細胞増殖能の促進作用や血管新生作用を有している。しかしながら、軟骨組織では軟骨細胞が細胞外基質に取り囲まれているため、bFGF が細胞に到達しないことが報告されている。そこで今回の研究では、コラゲナーゼ表面処理によりマイクロ軟骨の細胞外基質を部分的に分解させ、表層に露出した細胞接着タンパクと bFGF により増殖した軟骨細胞が結合する結果、軟骨再生が促進される機序を仮説として考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、マイクロ軟骨を用いた軟骨再生を促進する目的で、コラゲナーゼによる表面処理を加え、マイクロ軟骨表層の細胞外基質を酵素分解させた。実験では、マイクロ軟骨の表面性状の変化が自家移植後の軟骨再生誘導に及ぼす影響を明らかとすることを目的として、コラゲナーゼ表面処理によるマイクロ軟骨の形態変化(実験1)、軟骨再生におけるコラゲナーゼ表面処理の有用性と至適コラゲナーゼ処理時間(実験2)、およびマイクロ軟骨播種量の最適化(実験3)について検討した。

### 3. 研究の方法

#### 実験1: コラゲナーゼ表面処理によるマイクロ軟骨の形態変化

出発原料であるイヌ耳介軟骨(サイズ: 1cm × 1cm × 300 $\mu$ m, 重量: 85mg)を微細加工装置にて微細加工し、1辺を 200 $\mu$ m とするマイクロ軟骨を作製した。次に 0.3%コラゲナーゼを用いて 37 $^{\circ}$ C で振盪拡散させ、マイクロ軟骨の表面処理を行った。実験群として、コラゲナーゼ処理時間の異なる 4 群(0, 15, 60, 120 分間)を設定した。その後、レーザー回折/散乱式粒度分布計を用いて、作製したマイクロ軟骨の粒度分布を測定した。またマイクロ軟骨の形態学的検索を行うため、表面性状を走査電顕、断面形態を光顕および透過電顕を用いて検討した。さらに細胞接着因子であるフィブロネクチン発現について免疫組織染色法を用いて検討した。マイクロ軟骨の粒度分布: レーザー回折/散乱式粒度分布計を用いて散乱光強度の角度分布から、マイクロ軟骨の平均径(マイクロ軟骨の平均径)およびモード径(最頻値を示すマイクロ軟骨の平均径)を算出した。

#### 実験2: 軟骨再生におけるコラゲナーゼ処理の有用性と至適コラゲナーゼ処理時間

複合型吸収性ポリマーと同面積の耳介軟骨片(10mm × 10mm)を採取した。実験1と同様に、微細加工装置を用いてマイクロ軟骨(200 $\mu$ m)を作製し、コラゲナーゼ表面処理時間の異なる 4 群(0, 15, 60, 120 分間)を設定した。このマイクロ軟骨を複合型吸収性ポリマーに播種した。マイクロ軟骨を播種した複合型足場の皮下移植操作は、イヌの頭部に自家移植した。自家移植時には、複合体の表裏面に bFGF-DDS (Drug Delivery System) を同時投与した。移植後 10 週目に組織採取し、組織学的検討を行った。軟骨細胞の細胞接着因子であるフィブロネクチン、転写因子として重要な SOX5、さらに細胞増殖と細胞周期のマーカーである Ki67 の発現および局在について、免疫組織学的検索を行った。

再生軟骨量の定量的解析: 再生軟骨量を比較検討するため、デルマパンチ(直径 5mm)にてイヌ耳介軟骨を採取した。採取組織はサフラニンO染色を施した。

#### 実験3: マイクロ軟骨播種量の最適化

実験3では、実験2と同様に、コラゲナーゼを用いてマイクロ軟骨の表面処理を行った。その後マイクロ軟骨を PBS にて洗浄(15分)し、複合型吸収性ポリマーに播種した。実験群として、播種するマイクロ軟骨量の異なる 4 群(50, 25, 12.5, 8%)を設定した。作製したマイクロ軟骨・

#### 4. 研究成果

##### 実験 1：コラゲナーゼ表面処理によるマイクロ軟骨の形態変化

微細加工軟骨装置により微細加工されたマイクロ軟骨の粒子径が、コラゲナーゼ表面処理によりどのように変化するかについて、粒度分布計を用いて検討した。その結果、コラゲナーゼ表面処理によりマイクロ軟骨の Mode 径は低値を示し、コラゲナーゼ未処理群 ( $255.5 \pm 55.8 \mu\text{m}$ ) に比較して、15 分群 ( $245.5 \pm 30.5 \mu\text{m}$ ) では約 96%、60 分群 ( $185.5 \pm 15.5 \mu\text{m}$ ) では約 73%、120 分群 ( $136.7 \pm 17.7 \mu\text{m}$ ) では約 54% の粒子径減少が認められた。コラゲナーゼ表面処理を行ったマイクロ軟骨を複合型吸収性ポリマーに播種した後、マイクロ軟骨の形態変化を観察した。肉眼所見では、処理時間に伴いマイクロ軟骨の組織量は減少する傾向が観察された。次にトルイジンブルー染色を用いた組織学的検討では、コラゲナーゼ処理に伴いマイクロ軟骨表層の細胞外基質分解が促進され、マイクロ軟骨内部の軟骨細胞が表層に露出される傾向が認められた。特に、120 分群では、細胞外基質分解が進みマイクロ軟骨の 3 次元形状が維持されず、軟骨細胞は散在性に分布していた。さらに走査型電子顕微鏡 (SEM) および透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて、マイクロ軟骨の表面および断面性状の微細構造を検討した。その結果、コラゲナーゼ未処理群では、マイクロ軟骨の表面性状が平滑であり、軟骨細胞は細胞外基質に被覆されていた。一方、コラゲナーゼ処理群 (15 分群および 60 分群) では、表面性状は粗造化し、軟骨細胞がマイクロ軟骨表面へ露出する傾向が著明となった。120 分群では、細胞外基質が分解しており軟骨細胞および軟骨基質の観察は不能であった。細胞接着因子としてフィブロネクチンを選択し、その発現を検討した。その結果、コラゲナーゼ処理群において発現を認め、フィブロネクチンの発現は 60 分群、120 分群において、マイクロ軟骨の細胞外基質全体に及び、増強していた。一方、コラゲナーゼ未処理群ではフィブロネクチンの発現を認めなかった。

##### 実験 2：軟骨再生におけるコラゲナーゼ処理の有用性と至適コラゲナーゼ処理時間

移植 10 週目の標本を採取し、各群におけるサフラニン 0 陽性断面積から再生軟骨量を算出し、比較検討した。その結果、コラゲナーゼ未処理群 ( $79 \pm 8.3 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ ) の再生軟骨量は、本来の軟骨に比較して、約 2.5 倍増加していた。一方、15 分群 ( $127 \pm 23.1 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ )、60 分群 ( $122 \pm 17.6 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ )、および 120 分群 ( $132 \pm 96.1 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ ) の再生軟骨量は、約 4 倍増加していた。

各実験群における再生軟骨の接着因子、細胞増殖、および分化を評価する目的で免疫染色をおこなった。フィブロネクチン発現を検討した結果、15 分群および 60 分群のマイクロ軟骨周辺部に一致して、フィブロネクチン発現が亢進し、軟骨再生に寄与している機序が示唆された。一方、未処理群では、フィブロネクチン発現は著明に減弱し、120 分群では発現が認められなかった。次に細胞増殖マーカーとして選択した Ki67 の発現を検討した。その結果、未処理群、15 分群および 60 分群のマイクロ軟骨および周辺の再生軟骨領域において、Ki67 陽性細胞が観察された。一方、120 分群においては、マイクロ軟骨内の Ki67 陽性細胞は観察されなかったが、再生軟骨領域のみに Ki67 陽性細胞が認められた。この結果から、全ての実験群において、再生軟骨領域の軟骨細胞増殖能は維持されていることが示唆された。さらに軟骨分化因子である SOX5 の発現を検討した。その結果、60 分群において、マイクロ軟骨周囲の再生軟骨領域に数多くの SOX5 陽性細胞が観察された。未処理群および 120 分群では、SOX5 陽性細胞が観察されなかった。この結果から、軟骨分化は 60 分群において最も促進していることが示唆された。

##### 実験 3：マイクロ軟骨播種量の最適化

移植 10 週目の標本を採取し、マイクロ軟骨播種量とサフラニン 0 陽性面積との相関を検討した。その結果、全ての群において、マイクロ軟骨播種量の増加に伴いサフラニン陽性断面積が増加し、マイクロ軟骨播種量とサフラニン陽性断面積は正の相関を示した。また、コラゲナーゼ表面未処理群と比較して、表面処理群ではサフラニン 0 陽性断面積は高値となる傾向が認められた。さらにコラゲナーゼ表面処理群の中では、サフラニン陽性断面積は 60 分群において最も高くなる傾向が観察された。次にマイクロ軟骨播種量と再生軟骨量の相関を調べた。その結果、マイクロ軟骨 8% 播種群では、コラゲナーゼ表面処理時間に関係なく、再生軟骨量は基準断面積 ( $3 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ ) に比較して低値を示した。マイクロ軟骨 12.5% および 25% 播種群では、コラゲナーゼ表面処理群の再生軟骨量は、基準断面積 ( $3 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ ) に比較して高値を示した。コラゲナーゼ表面処理群の中では、60 分群が未処理群と比較して有意に高い再生軟骨量を示した ( $p < 0.05$ )。マイクロ軟骨 50% 播種群では、コラゲナーゼ処理の有無に関係なく再生軟骨量は基準断面積 ( $3 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ ) に比較して高値を示した。またコラゲナーゼ未処理群と比較して、全てのコラゲナーゼ処理群において有意に高い再生軟骨量を示した。

以上の結果より、マイクロ軟骨 12.5%、25% および 50% 播種群において、コラゲナーゼ表面処理時間を 60 分とした際、再生軟骨量は基準断面積 ( $3 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ ) と比較して有意に高値を示した。さらにマイクロ軟骨播種量と再生軟骨量から、マイクロ軟骨を播種する際のマイクロ軟骨間至

適距離を算出した。その結果、コラゲナーゼ表面処理時間を 60 分間、マイクロ軟骨播種量を 12.5%群に設定した場合のマイクロ軟骨間至適距離は 548 $\mu$ m であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sueyoshi Yu, Niwa Atsuko, Itani Yoshihito, Yamauchi Makoto, Asamura Shinichi, Teramura Takeshi, Isogai Noritaka	4. 巻 153
2. 論文標題 Surface modification of the cubic micro-cartilage by collagenase treatment and its efficacy in cartilage regeneration for ear tissue engineering	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology	6. 最初と最後の頁 111037 ~ 111037
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijporl.2021.111037	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西川侑輝、伊谷善仁、磯貝典孝
2. 発表標題 耳介軟骨の再生における軟骨膜細胞の重要性
3. 学会等名 第10回DDS再生医療研究会
4. 発表年 2020年～2021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
---------	---------