

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390532

研究課題名（和文）外科系インプラントとしてのスカフォールドフリー3次元再生軟骨の開発

研究課題名（英文）Development on scaffold-free 3D regenerative cartilage as surgical implants

研究代表者

星 和人（HOSHI KAZUTO）

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号：30344451

研究成果の概要（和文）：唇裂鼻変形の形成術や顎関節再建に使用することを目指し、複雑形状の再生軟骨や軟骨・骨2層型再生関節を作製した。いずれの再生軟骨も、細胞凝集塊（ペレット）を大量に作製し、力学的強度および低酸素・低栄養への抵抗性を付加した後に、ペレットを集積・癒合させて3次元形状を付与した。移植の時には、移植部位の組織張力軽減を図った。これらの知見をもとに、スカフォールドフリー3次元再生軟骨を実現した。

研究成果の概要（英文）：We have produced complex regenerative cartilage or regenerative joints that consist of two layers of cartilage and bone to apply them to the repair of cleft lip-nose or temporomandibular joint reconstruction. Regarding every regenerative cartilage which we have invented, a large amount of cell pellets were produced, and then physical strength and resistance to hypoxia or undernutrition were added to them. After that, 3D shape was formed by accumulating and fusing those pellets together. At transplantation, tissue tension relief was attempted in the transplantation site. Based on the techniques, we have realized scaffold-free 3D regenerative cartilage.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2010年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2011年度	3,100,000	930,000	4,030,000
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：再生軟骨、インプラント、スカフォールド、顎顔面、軟骨細胞

## 1. 研究開始当初の背景

顎顔面領域には多彩な軟骨が存在する。鼻軟骨や耳介軟骨は、唇裂鼻あるいは小耳症を呈する場合がある。ヘミフェイシャルマイクロ

ソミアでは顎関節が形成不全あるいは欠損する。また顔面は外傷を受けやすく、鼻、耳介が欠損したり、骨折により顎関節が損傷を受けたり顎関節強直症になる場合がある。悪

性腫瘍による切除後のこうした領域の再建も非常に難易度が高い。これらの疾患に対する治療としては、従来、自家軟骨移植あるいはシリコンや人工顎関節などの人工物による再建などが行われてきたが、手術侵襲、露出、自家軟骨移植後の吸収や耐用年数などの問題が指摘されてきた。自家軟骨が最も好ましいが、ヒトの身体からは、鼻中隔軟骨、耳介軟骨および肋軟骨しか採取部がなく、量的にも大きな制限がある。そのため、再生医療が脚光を浴びてきたが、現時点での軟骨再生医療は局所的欠損にゲル状細胞塊を投与するもので、再生軟骨への形状付与が困難である。そのため、足場素材を用いて形状付与を試みたが、異物反応が不可避で、一定の成果を得たが、同時に移植後変形という課題が残った。

## 2. 研究の目的

厳密な3次元形状の維持を必要とする口腔外科領域への再生軟骨の応用法を確立することを目的とし、再生軟骨ペレットを三次元的に癒合させてスカフォールドフリーの再生軟骨を作製し、かつ、再生軟骨が移植後に吸収されないように母床組織の組織張力を調節する手術手技を確立する。

## 3. 研究の方法

唇裂鼻変形の形成術に対してL字型再生軟骨を、顎関節再建に対しては関節曲面を再現した関節軟骨と人工骨を結合させた2層型再生関節を作製する。いずれの再生軟骨も、軟骨細胞を3mm間隔グリッド付温度応答性ポリマーコート培養皿で培養し、温度変化のみで3x3mmの細胞シートを大量に作製し、細胞凝集塊(ペレット)化させる。BMP-2/insulin/T3刺激により力学的強度および低酸素・低栄養への抵抗性を付加した後に、アガロース鑄型(キャスト)を用いてペレットを集積・癒合させて3次元形状を付与する。L字型再生軟骨においては、皮下移植に先だって、同形状のシリコンテンプレートを用いて皮下に挿入し、移植部位の組織張力軽減を図る。これらの再生軟骨の作製条件および移植条件を検討し、ビーグル犬での実証実験を行う。

そのため、以下の研究を研究期間内(平成21年-23年)で行った。

- ①各種軟骨細胞を用いた細胞凝集塊(ペレット)形成条件の検討
- ②アガロース鑄型(キャスト)によるペレット癒合条件の検討
- ③3次元化のための培養システムの確立
- ④移植部位の母床形成および組織張力の軽減のための処置検討
- ⑤ビーグル犬を用いた in vivo 実証実験

## 4. 研究成果

- ①各種軟骨細胞を用いた細胞凝集塊(ペレ

### ト) 形成条件の検討

培養軟骨細胞を3mm間隔グリッド付温度応答性ポリマーコート培養皿に播種した後、低温処理(20°C)にて3x3mmの細胞シートを大量に作製し、基質産生促進培養液で静置培養することにより大量のペレットを入手する方法と、培養軟骨細胞を酵素処理にて回収し、20万細胞ずつチューブに分注し、同培養液で培養することにより大量のペレットを入手する方法を比較した。ヒト軟骨細胞を用いて、それぞれのペレットを作製して比較検討した。前者は酵素処理をしないため、分泌された細胞外基質を最大限活用することによりペレットを大量に作製することが出来たが、ペレットの大きさの不均一であり、個数や体積を一定にして実験を行うには不向きであった。それに対し、酵素処理法では、ペレットの大きさが一定になり、実験としてペレット癒合条件などを検討するには、後者のほうが妥当であろうと思われた。

### ②アガロース鑄型(キャスト)によるペレット癒合条件の検討

アガロースの使用条件を検討し、アガロースの硬さや物質拡散性などの点から、アガロースの濃度を選定した。1-5%濃度のアガロースをアルシアンブルーの拡散性、力学強度を検討した。拡散性が良好で、かつ形状保持が可能な力学強度を有する濃度が適切と考えて、アガロース濃度を2%と選定した(図 アガロース濃度の検討)。

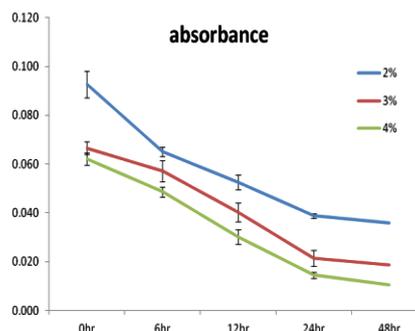


図 アガロース濃度の検討  
各濃度のアガロースゲルに対し、アルシアンブルーの浸透性を吸光度で評価した。

この同濃度アガロースもちいて、1x1x1cmの陥凹を有するアガロースキャストを作製し、①項で設定した酵素処理法による軟骨細胞ペレットを投与し、癒合のための加圧条件を検討した。加圧条件に関しては、2.918 – 8.612g/cm<sup>2</sup>の圧力で3週間圧迫することを検討した。加圧後のペレット癒合状況を観察すると、8.612g/cm<sup>2</sup>の条件が最も癒合状況が良好であったため、加圧条件は8.612g/cm<sup>2</sup>とした(図 加圧条件の検討)。

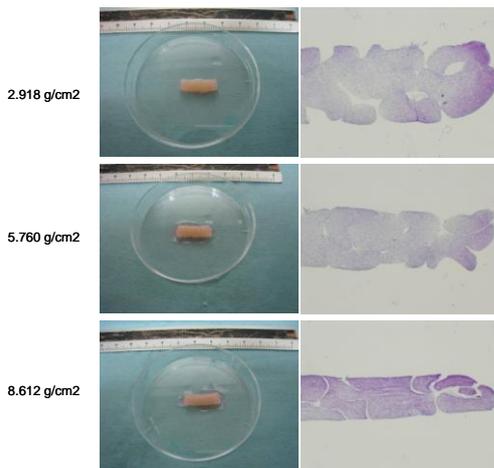


図 加圧条件の検討  
加圧後3週。左が肉眼所見。右がトルイジンブルー組織所見

さらに、同条件で作製した癒合ペレット(再生軟骨、1x1 cm)をヌードマウスに移植し、2ヵ月後摘出して評価したところ、プロテオグリカンを含む再生軟骨を観察し、同条件がペレット癒合には妥当であることを確認した(図 ニードマウス移植)。

### ③3次元化のための培養システムの確立

鼻形成や顎関節形成に必要な軟骨の3次元形状を再現するプレートを作製した。このプレートに基づき、アガロースキャストを作製し、軟骨細胞ペレットを投与してペレット同士の接着を促進する3次元培養をおこなった。3次元培養は基質産生促進培養液下で、加圧条件下でおこなった。培養後、再生軟骨を回収し、3次元形状を測定したところ、シリコンプレートより若干収縮傾向は見られたものの、ほぼ同等の形状を示した(図 ビーグル移植実験)。また、特徴的な軟骨基質であるGAGの産生も確認された。関節再生を目指した人工骨との複合化も、上記と同様

に基質産生促進培養液下で、加圧条件下で軟骨細胞ペレットの接着を促進する方法で可



図 ニードマウス移植実験  
移植後2ヶ月。上が肉眼所見。下がトルイジンブルー組織所見

能であった。

### ④移植部位の母床形成および組織張力の軽減のための処置検討

再生組織の皮下移植に先行してシリコンプレートを皮下に移植し、移植母床の形成、組織張力の軽減を計る手法を検討した。動物にはヌードマウスを用い、再生軟骨を皮下移植する際に、あらかじめ、シリコンプレートを移植し、移植後4週間で、移植したシリコンプレートを抜去し、その空間に再生軟骨を挿入し、移植後の形状をVIVID910で追跡した。その結果、移植軟骨と同一サイズのシリコンプレートの移植により、移植後の再生軟骨の3次元形状が維持されやすいことが示唆された。

### ⑤ビーグル犬を用いた in vivo 実証実験

ビーグル犬を用いた in vivo 実証実験、においては、これまで検討した作製方法、移植方法に準じ、ビーグル犬(8ヶ月齢オス)の細胞を用いて、ドーム型再生軟骨を作製し、自家再生組織移植を行った。ビーグル犬より全身麻酔下に軟骨を採取し、軟骨細胞を単離した。また、個体には前項に順じシリコンインプラントを背部皮下に移植した。単離した軟骨細胞はイヌ自己血清下で増殖培養し、再生軟骨を作製した後、シリコンインプラントを抜去して背部皮下ポケットに移植した。移植後2ヵ月で再生軟骨を抜去すると、再生軟骨の3次元形状は維持されており、また、豊富な軟骨基質が検出され、良好な軟骨再生が確認された(図 ビーグル移植実験)。一方、

ビーグルの皮下組織においては摩擦が大きく、移植軟骨とシリコンテンプレートの大きさが同一の場合は、移植軟骨の挿入が難しい傾向があったので、テンプレートは若干大き目がよいと考察された。

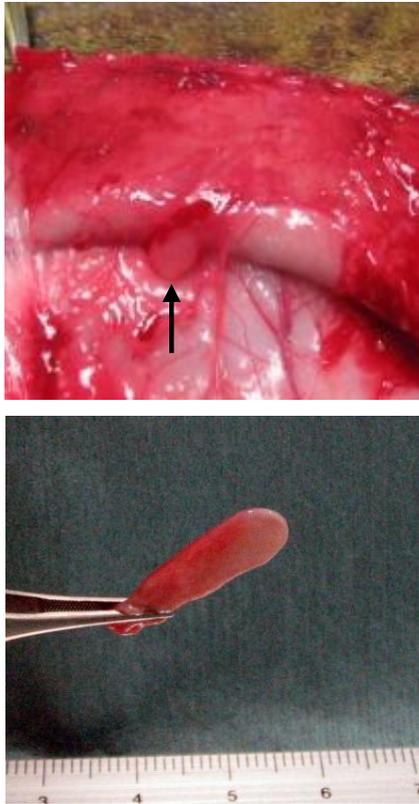


図 ビーグル移植実験  
矢印は皮下に移植された再生軟骨

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計35件)

1. Ochiai H, Okuda S, Saito A, Hoshi K, Yamashita H, Takato T, Azuma T: Inhibition of IGF-1 expression by prolonged TGF- $\beta$ 1 administration suppresses osteoblast differentiation. J Biol Chem. In press (査読有)
2. Ogasawara T, Ohba Shinsuke, Yano F, Kawaguchi H, Chung UI, Saito T, Yonehara Y, Nakatsuka, T, Mori Y, Takato T, Hoshi K: Nanog promotes osteogenic differentiation of the mouse mesenchymal cell line C3H10T1/2 by modulating bone morphogenetic protein (BMP) signaling. J Cell Physiol. In press (査読有)
3. Asawa Y, Sakamoto T, Komura M, Watanabe M, Nishizawa S, Takazawa Y, Takato T, Hoshi K (in press) Early-stage foreign body reaction against biodegradable polymer scaffolds affects tissue regeneration during the autologous transplantation of tissue-engineered cartilage in the canine model. Cell Transplant. In press (査読有)
4. Hoshi K, Fujihara Y, Asawa Y, Nishizawa S, Kanazawa S, Sakamoto T, Watanabe M, Ogasawara T, H S, Mori Y, Takato T: Recent trends of cartilage regenerative medicine and its application to the oral and maxillofacial surgery. Oral Science International. In press (査読有)
5. Iwata K, Asawa Y, Nishizawa S, Mori Y, Nagata S, Takato T, Hoshi K: The development of a serum-free medium utilizing the interaction between growth factors and biomaterials. Biomaterials 33: 444-454, 2012 (査読有)
6. Tanaka Y, Saijo Y, Fujihara Y, Yamaoka H, Nishizawa S, Nagata S, Ogasawara T, Asawa Y, Takato T, Hoshi K: Evaluation of the implant type tissue-engineered cartilage by scanning acoustic microscopy. J Biosci Bioeng 113: 252-257. 2012 (査読有)
7. Kanazawa S, Fujihara Y, Sakamoto T, Asawa Y, Komura M, Nagata S, Takato T, Hoshi K: Tissue responses against tissue-engineered cartilage consisting of chondrocytes encapsulated within non-absorbable hydrogel. J Tissue Eng Regen Med. 2011 (査読有)
8. Ko EC, Fujihara Y, Ogasawara T, Asawa Y, Nishizawa S, Nagata S, Takato T, Hoshi K: Administration of the insulin into the scaffold atelocollagen for tissue-engineered cartilage. J Biomed Mater Res A 97: 186-192. 2011 (査読有)
9. Ko EC, Fujihara Y, Ogasawara T, Asawa Y, Nishizawa S, Nagata S, Takato T, Hoshi K: BMP-2-embedded atelocollagen scaffold for tissue-engineered cartilage cultured in the medium containing insulin and Triiodothyronine - A new protocol for

- 3D in vitro culture of human chondrocytes. Tissue Eng Part C Methods. 2011 (査読有)
10. **Fujihara Y, Takato T, Hoshi K:** Immunological response to tissue-engineered cartilage derived from auricular chondrocytes and a PLLA scaffold in transgenic mice. Biomaterials 31(6):1227-1234. 2010 (査読有)
  11. Iwata K, Asawa Y, **Fujihara Y**, Tanaka Y, Nishizawa S, Nakagawa T, Nagata S, **Takato T, Hoshi K:** The effects of rapid- or intermediate-acting insulin on the proliferation and differentiation of cultured chondrocytes. Curr Aging Sci 3(1): 26-33. 2010 (査読有)
  12. Liu G, Iwata K, Ogasawara T, Watanabe J, Fukazawa K, Ishihara K, Asawa Y, **Fujihara Y**, Chung UL, Moro T, Takatori Y, **Takato T**, Nakamura K, Kawaguchi H, **Hoshi K:** Selection of highly osteogenic and chondrogenic cells from bone marrow stromal cells in biocompatible polymer-coated plates. J Biomed Mater Res A 92(4):1265-1272. 2010 (査読有)
  13. Tanaka Y, Yamaoka H, Nishizawa S, Nagata S, Ogasawara T, Asawa Y, **Fujihara Y, Takato T, Hoshi K:** The optimization of porous polymeric scaffolds for chondrocyte/atelocollagen based tissue-engineered cartilage. Biomaterials 31(16):4506-4516. 2010 (査読有)
  14. Yamaoka H, Nishizawa S, Asawa Y, **Fujihara Y**, Ogasawara T, Yamaoka K, Nagata S, **Takato T, Hoshi K:** Involvement of fibroblast growth factor 18 in dedifferentiation of cultured human chondrocytes. Cell Prolif 43(1):67-76. 2010 (査読有)
  15. Yamaoka H, Tanaka Y, Nishizawa S, Asawa Y, **Takato T, Hoshi K:** The application of atelocollagen gel in combination with porous scaffolds for cartilage tissue engineering and its suitable conditions. J Biomed Mater Res A 93(1):123-132. 2010 (査読有)
  16. Yonenaga K, Nishizawa S, Akizawa M, Asawa Y, **Fujihara Y, Takato T, Hoshi K:** Utility of NucleoCounter for the chondrocyte count in the collagenase digest of human native cartilage. Cytotechnology 62(6):539-545. 2010 (査読有)
  17. Yonenaga K, Nishizawa S, **Fujihara Y**, Asawa Y, Sanshiro K, Nagata S, **Takato T, Hoshi K:** The optimal conditions of chondrocyte isolation and its seeding in the preparation for cartilage tissue engineering. Tissue Eng Part C Methods 16(6):1461-1469. 2010 (査読有)
  18. Asawa Y, Ogasawara T, Takahashi T, Yamaoka H, Nishizawa S, Matsudaira K, **Mori Y, Takato T, Hoshi K:** Aptitude of auricular and nasoseptal chondrocytes cultured under a monolayer or three-dimensional condition for cartilage tissue engineering. Tissue Eng Part A 15(5):1109-1118. 2009 (査読有)
  19. **Fujihara Y**, Asawa Y, **Takato T, Hoshi K:** Tissue reactions to engineered cartilage based on poly-L-lactic acid scaffolds. Tissue Eng Part A 15(7):1565-1577. 2009 (査読有)
  20. Ogasawara T, Ohba S, **Fujihara Y**, Takahashi T, Liu G, Chikazu D, Suenaga H, Chung U, Yoda T, **Mori Y**, Susami T, **Takato T, Hoshi K:** Effects of transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 in combination with fibroblast growth factor (FGF)-2 and insulin-like growth factor (IGF)-I on chondrocytes proliferation culture for the cartilage regenerative medicine. Asian Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 21:18-26. 2009 (査読有)
- [学会発表] (計42件)
1. **星 和人** 「再生医療を臨床導入するための制度と課題」再生医療の実現化ハイウェイ 生命倫理等の課題の解決に関する研究再生医療における臨床試験コーディネーター向け生命倫理講習会 2012年3月10日 東京都港区
  2. **星 和人** 「再生軟骨医療の現状と将来像」臨床研究者育成プログラム講演 2012年1月13日 東京都文京区
  3. **星 和人** 「足場素材導入による軟骨再生医療の新展開—唇裂鼻変形に対するインプラント型再生軟骨による治療」第56回日本口腔外科学会総会「最新の臨床研究」 2011年10月22日 大阪府大阪市
  4. **Kazuto Hoshi, Yuko Fujihara**, Satoru Nishizawa, Yukiyo Asawa, Sanshiro Kanazawa, Makoto Watanabe, Tomoaki Sakamoto, Ryoko Inaki, Misaki Takei,

Mariko Matsuyama, Sakura Uto, Kumiko Kurabayashi, Toru Ogasawara, \*Satoru Nagata, **Tsuyoshi Takato**. Development of implant-type tissue-engineered cartilage applied for the nasal correction of the cleft lip and palate patients. 9th European Craniofacial Congress. 14-17 Sep 2011, Salzburg, Austria

5. **K. Hoshi, Y. Fujihara, S. Nishizawa, Y. Asawa, S. Kanazawa, M. Watanabe, T. Sakamoto, R. Inaki, M. Takei, M. Matsuyama, S. Uto, K. Kurabayashi, M. Harai, T. Ogasawara, S. Nagata, T. Takato**. DEVELOPMENT OF IMPLANT-TYPE TISSUE-ENGINEERED CARTILAGE APPLIED FOR THE CORRECTION OF THE CLEFT LIP-NOSE PATIENTS. TERMIS-AP 2011 2011.8.3-5. Singapore
6. **Kazuto Hoshi** Human cultured chondrocytes and tissue stem cells for tissue engineering of permanent cartilage ICRS 2010 Stem Cells for Cartilage Repair 2010, 9, 27 Barcelona, Spain Session 7.0 Plenary
7. **星 和人、高戸 毅**: 生分解性ポリマー足場素材を用いた3次元再生軟骨の研究開発 日本再生医療学会雑誌 SY-7-4, 104, 2010 第9回日本再生医療学会総会 プログラム・抄録 2010年3月18日-19日 広島県広島市
8. **星 和人、浅輪幸世、高戸 毅、中川 匠、中村耕三、川口 浩** 脱分化に伴うヒト軟骨細胞表面マーカー変化の解析と再生医療における細胞品質管理への応用 第24回日本整形外科基礎学術集会 2009年11月6日 横浜市 日本整形外科学会雑誌 2009 83 S1193 8
9. **星 和人** 三澤 雅樹 3次元再生軟骨の構造・機能評価 第36回日本臨床バイオメカニクス学会 2009年10月17日 愛媛県松山市 第36回日本臨床バイオメカニクス学会抄録集 2009 P181 シンポジウム4 軟骨のバイオメカニクス
10. **星 和人** 軟骨再生医療の現状と展望 介護技術専門研究会 2009年9月1日 東京

[図書] (計4件)

1. **星 和人、高戸 毅** 第3章 細胞の利用 1. 成熟細胞 1) 軟骨細胞 170-174 遺伝子医学MOOK13号(全316ページ) メディカルドゥ 大阪. 2009

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: 再生軟骨の軟骨特性を評価する方法  
発明者: **星 和人、高戸 毅**、原井基博  
権利者: 富士ソフト株式会社、国立大学法人 東京大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2011-009253  
出願年月日: 2011年1月19日  
国内外の別: 国内

名称: 細胞培養用中空糸モジュールおよび細胞培養方法  
発明者: **星 和人、高戸 毅**、松山秀人、守屋俊浩、中川 栄  
権利者: 国立大学法人東京大学、野村ユニオン株式会社  
種類: 特許  
番号: 特願 2010-188831  
出願年月日: 2010年8月25日  
国内外の別: 国内

○取得状況 (計1件)

名称: 脱分化型軟骨細胞の軟骨細胞への再分化用培地発明者:  
権利者: **星 和人、鄭雄一、川口浩、中村耕三、高戸 毅**  
種類: 特許 (中国)  
番号: CN 101014699(B)  
取得年月日: 2010年5月26日  
国内外の別: 国外

[その他]

ホームページ

<http://square.umin.ac.jp/ct-e>

(1)研究代表者

星 和人 (HOSHI KAZUTO)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授  
研究者番号: 30344451

(2)研究分担者

高戸 毅 (TAKATO TSUYOSHI)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号: 90171454

森 良之 (MORI YOSHIYUKI)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 70251296

藤原 夕子 (FUJIHARA YUKO)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号: 50466744

(3)連携研究者

特になし