

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659831

研究課題名(和文) 生体吸収性ハイドロゲル粒子混合細胞集合体を用いた三次元培養による軟骨再生法

研究課題名(英文) Preparation of chondrocyte aggregates with gelatin microspheres to promote cartilage regeneration.

研究代表者

河合 勝也 (Kawai, Katsuya)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90273458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨再生を促進させる新しい三次元培養法として、ハイドロゲル粒子を混合した軟骨細胞集合体の作製を試みた。in vitro実験において、ハイドロゲル粒子混合細胞集合体ではハイドロゲルを含有しない細胞単独集合体に比べ、軟骨細胞生存活性およびグリコサミノグリカン生産量の向上を認め、軟骨分化を促進させることが確認できた。さらにin vivoの動物移植実験においても、ハイドロゲル粒子混合細胞集合体移植群では有意に軟骨組織の形成を認めた。以上の結果から、ハイドロゲル粒子混合細胞集合体は軟骨再生に有用な三次元培養法であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study developed a novel 3D culture procedure; chondrocyte aggregates with gelatin microspheres to promote cartilage regeneration. The viability of chondrocytes and the sulfated glycosaminoglycan production of chondrocytes in an aggregate with microspheres were significantly higher compared with that of aggregate without microspheres. This result indicated that chondrocyte aggregates with microspheres enhanced chondrogenic differentiation in vitro. Moreover, in vivo implantation study, the area of regenerated cartilaginous tissue in the group of chondrocyte aggregates with microspheres was larger than that of chondrocyte aggregates without microspheres. In conclusion, this novel procedure may allow for the development of cartilage regeneration.

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

軟骨の再生において、さまざまな軟骨細胞移植法が試みられているが、*in vitro*での軟骨細胞の増殖や分化能の維持が困難であること、さらに移植した軟骨細胞から形成される軟骨基質が乏しいことが問題となっている。またこれらの問題点を解決し、軟骨形態を維持する目的でさまざまな生体材料が足場として使用されているが、足場材料に対する過剰な組織反応や材料の存在による細胞間相互作用の抑制がかえって軟骨再生の妨げとなることがある。そこで近年、足場を用いない細胞単独での軟骨再生が試みられている (Kaneshiro N. et al: *Biochem Biophys Res Commun* 349:723-731,2006)。一方、細胞を三次元的に集合させることで細胞間相互作用が増強し、その生理機能が高まることが報告されているが、軟骨細胞においては、細胞を高密度で培養することで同様にその生理機能が向上することが報告されているものの、積極的に細胞集合体を作ることによって軟骨再生を促進する試みについての報告はない。また細胞集合体の問題点として、内部での低酸素や低栄養による細胞の生存活性の低下があり、適切な足場が必要であると考えられる。われわれは、水分を保持する物性から酸素や栄養の高い透過性をもつ生体吸収性ハイドロゲル粒子 (Tabata Y. et al: *Adv Dru Del Rev* 31:287-301,1998) を用いて、骨髄由来幹細胞(MSC)の細胞集合体を作製し、細胞集合体中の MSC の生存活性を向上させることができた (Tabata Y. et al: *Acta biomaterialia* 7:2797-2803,2011)。

そこで本研究では、軟骨細胞とハイドロゲル粒子の細胞集合体を作製し、軟骨細胞の生存活性と機能表現を高めることで、より効率のよい軟骨再生を試みる。

2. 研究の目的

(1) 軟骨の再生において、培養に伴う軟骨細胞の機能低下が1つ目の大きな問題点である。軟骨細胞を高密度で培養することで、細胞間相互作用が高まり、高い軟骨形成能が維持されることが報告されている (Alstair MM. et al: *Tissue Eng.* 4:415-428,1998)。そこで、他分野で同様に細胞間相互作用から細胞の生理機能を向上させるという点で注目されている細胞集合体を新たに軟骨細胞に応用することで、軟骨再生の促進を試みる。しかしながら細胞集合体には、細胞集合体内部の細胞が集合体周辺の細胞に比べ、栄養や酸素の交換率が低いため、その生存活性が低下するという問題点がある。そこでわれわれはこの点に解決するために、水分を保持する物性から酸素や栄養の高い透過性をもつ生体吸収性ハイドロゲル粒子を用いて集合体内部の細胞環境を調整し、集合体内部の細胞の生存活性を向上させ、軟骨細胞の機能を高く維持し、さらに効率よく軟骨再生することを試みる。

(2) 軟骨再生の2つ目の問題点として、移植した軟骨細胞から形成される軟骨基質が乏しく、また再生軟骨の長期維持が困難であることがあげられる。この点において、細胞集合体での移植は、細胞に対する足場の比率を減少させ、足場に対する過剰な組織反応に伴う再生軟骨の破壊を抑制し、さらに *in vitro* で形成された細胞外基質、細胞因子等の細胞環境を保持したまま移植できることでよりよい軟骨再生が期待できる。細胞集合体移植による *in vivo* での軟骨基質形成の向上と形成軟骨の長期維持を試みる。

3. 研究の方法

(1) ゼラチン粒子をもちいた軟骨細胞集合体の作製と *in vitro* 軟骨形成能の評価

細胞集合体の作成

酸性ゼラチン(重量平均分子量:100,000 等電点:5,0)を用いて様々なサイズのハイドロゲル粒子を作製する (Kawai K. et al: *Biomaterials* 21:489-499,2000)。またウサギ耳介軟骨より軟骨細胞を単離し培養する (Togo T. et al: *Lab Invest.* 86:445-457,2006)。

96well U底プレートに1%ポリビニルアルコール(PVA)水溶液を用いてPVAコーティングを行う。PVAコーティングしたプレートに軟骨細胞を播種し、同時にハイドロゲル粒子を加えて、静置培養することで軟骨細胞集合体を作製する。

細胞集合体に含まれる細胞の生存活性の検討

細胞集合体中の生細胞数を経時的に測定することで、細胞集合体中の細胞の生存活性を評価する。

細胞集合体の軟骨分化能の検討

経時的に、細胞集合体から形成される軟骨の量と質を評価する。病理組織(一般・免疫染色)による形態の評価・軟骨基質の確認、ジメチルメチレンブルー法によるグリコサミノグリカンの定量、RT-PCRによる遺伝子発現の定量(アグリカン、型コラーゲン、sox9など)などを行う。

(2) 細胞集合体を用いた *in vivo* 移植実験

軟骨細胞単独からなる細胞集合体群とハイドロゲル粒子混合細胞集合体群をヌードマウス皮下に移植する。1ヵ月後に組織を採取し、病理組織、RT-PCRなどを行い、両群での軟骨形成能を比較し、ハイドロゲル粒子混合細胞集合体の *in vivo* での有効性を評価する。さらに免疫不全モデルでの有効性を確認した後に、ウサギ皮下に移植実験を行い、自家移植における有効性を確認する。

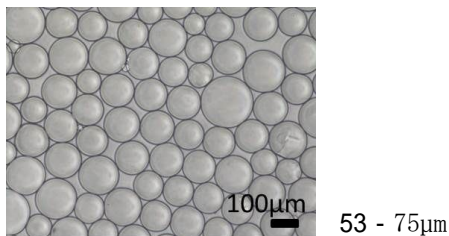
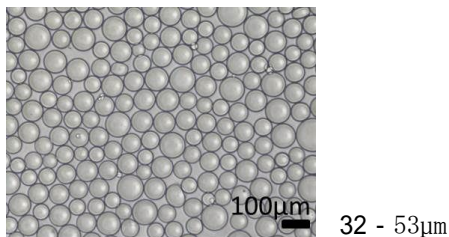
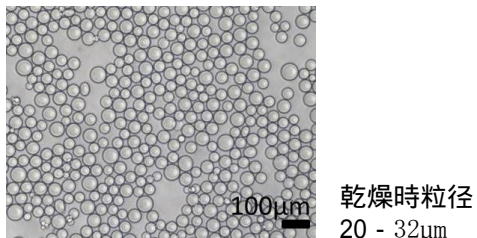
4. 研究成果

(1) ハイドロゲル粒子混合細胞集合体の作成

・乾燥時粒径20-32、32-53、53-75 μ mの比較的均一なハイドロゲル粒子を作成すること

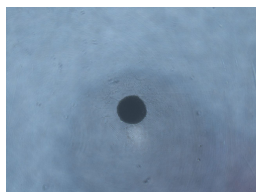
ができた。それぞれの膨潤時粒径は乾燥時粒径の約2倍であった。

【ゼラチン粒子膨潤時の顕微鏡写真】

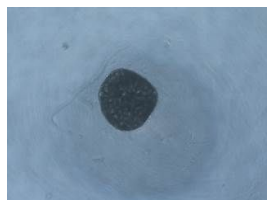


・10000 個の軟骨細胞に対して上記で作成したハイドロゲル粒子 (MS) を 0、1000、10000 個混合させてハイドロゲル粒子混合細胞集合体を作成した。多い粒子数や大きな粒子サイズでは細胞集合体を作成することができず、軟骨細胞数に対する適切な粒子比が存在することがわかった。

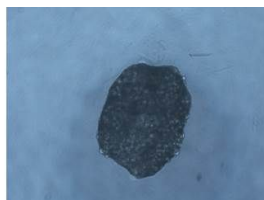
【細胞集合体の培養 14 日目の顕微鏡写真】



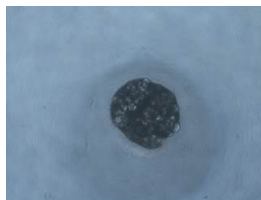
MS なし
集合体形成 (+)



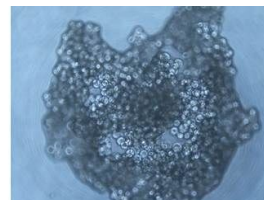
MS (20 - 32μm)
1000 個
集合体形成 (+)



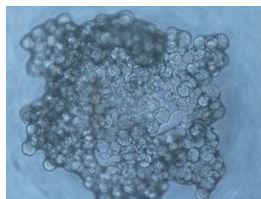
10000 個
(+)



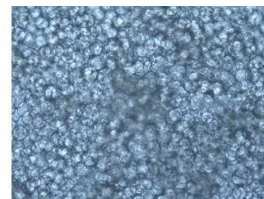
MS (32 - 53μm)
1000 個
集合体形成 (+)



10000 個
(±)



MS (53 - 75μm)
1000 個
集合体形成 (±)

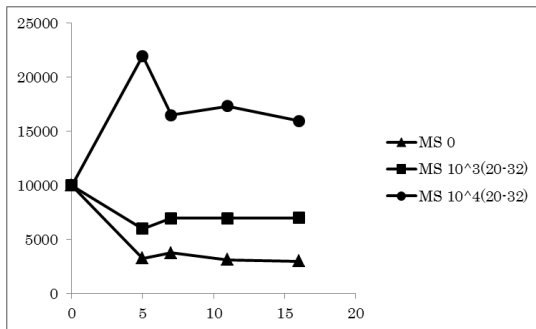


10000 個
(-)

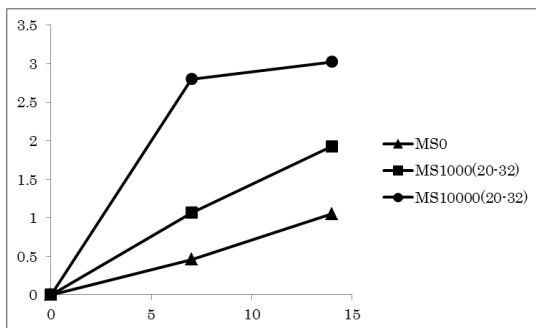
(1) - 細胞集合体における細胞の生存活性及び軟骨分化能

・集合体あたりの生細胞数およびグリコサミノグリカン生産量を測定した。ハイドロゲル粒子を含まない集合体 (MS0) に比べ、ハイドロゲル粒子混合集合体 (MS10³: 1000 個、MS10⁴: 10000 個) では生細胞数の増加および維持が可能であった。また、グリコサミノグリカンの定量においてもハイドロゲル粒子混合集合体群で有意に生産量の増加を認めた。(下図参照)

【集合体あたりの生細胞数】



【集合体あたりのグリコサミノグリカン生産量 (μg)】

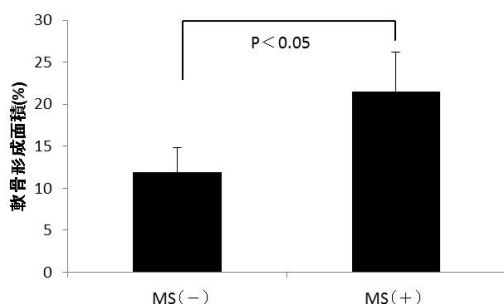


(2) 細胞集合体の in vivo 移植実験

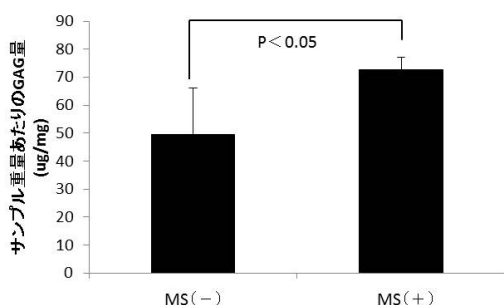
・ハイドロゲル粒子を含まない細胞集合体と

ハイドロゲル粒子混合細胞集合体をヌードマウス皮下に移植したものを1カ月後に採取し、サンプルあたりの再生した軟骨形成面積および軟骨形成重量を測定した。移植の際に集合体あたりの軟骨生細胞数は同じとした。軟骨形成面積および重量ともにハイドロゲル粒子混合集合体で有意に高かった。(下図参照)

【軟骨形成面積】



【軟骨形成重量】



以上の結果から、ハイドロゲル粒子混合細胞集合体は軟骨再生を有意に促進し、軟骨再生において有用な新しい培養方法と考えられる。今後、ハイドロゲル粒子の混合比などさらに詳細な条件検討を行い、より軟骨再生が促進される条件を検討する予定である。また再生された軟骨の質についても評価する予定である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計1件)

中村陽子 河合勝也 内藤素子 鈴木茂彦、
第13回 日本再生医療学会、2014年3月4日～2014年3月6日

6. 研究組織

研究代表者

河合 勝也 (KAWAI, Katsuya)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：90273458