

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861712

研究課題名(和文) 移植軟骨を軟骨膜様細胞へ分化・誘導させる新規因子の探索

研究課題名(英文) Histological Study of Costal Cartilage after Transplantation and Reasons for Avoidance of Postoperative Absorption and Retain Cartilage Structure in Animal model

研究代表者

力丸 由起子(西由起子)(Rikimaru - Nishi, Yukiko)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：90368960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨膜を欠く移植軟骨の経時的変化を明らかにした。野生型とGFP蛍光ラットの2種類を用いて膜除去移植群と膜付着群の2つを作成し、組織解析を行った。膜除去群では、移植4週後に移植軟骨周囲に本来の軟骨膜に似た層構造の再生が確認された。8週後では、野生型由来GFP陰性移植軟骨の表層部分がRecipientのGFPラット由来GFP陽性細胞の軟骨に置換された。一方、膜付着群ではGFP陽性細胞で置換されなかった。軟骨をその細胞の供給源である軟骨膜を除去した状態で移植しても、周囲の軟部組織より軟骨に分化可能な細胞が供給され、新たに軟骨細胞が形成され続けることでその形態を維持し続けていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The sections of costal cartilage was harvested from 10-week-old wild rats and transplanted to dorsal region of 10-week-old green fluorescent protein (GFP) transgenic rat. These were subcutaneously harvested from GFP rats at 4-weekes and 8- weeks. This experiment was carried out in 2 randomized groups, with the perichondrium removed from the transplanted cartilage in one group, and with intact perichondrium transplanted. The GFP-positive chondrocytes in 8 weeks later in the group of the perichondrium removed. The GFP-positive chondrocytes was not replaced in the group of perichondrium intact. This result showed cartilage was reproduced from membrane-like tissue regenerated around cartilage after removing the perichondrium; continuously generating new chondrocytes.

研究分野：形成外科

キーワード：軟骨移植 軟骨膜除去 GFP transgenic rat FIB/SEM tomography 間葉系幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

近年、自己修復能に乏しい軟骨組織が摩耗減少もしくは欠損した病態に対する修復方法は、手術侵襲の大きな自己軟骨組織移植から、より侵襲の小さな培養軟骨移植や自己間葉系幹細胞移植へと大きくシフトしつつある。これらの新しい手法は基礎的研究が進行中であるが、多くの研究では、軟骨細胞の培養移植方法もしくは幹細胞から軟骨細胞への分化増殖方法に主眼がおかれていることが多い。しかし、実際に移植の段階で臨床的に問題となるのは、次の2点である。移植された軟骨組織が移植床でその形態と機能を維持し得るかどうかが。具体的には、移植軟骨はその形式(自家、培養)を問わず、既存周囲軟骨との癒合が起こりにくい。また、移植後その組織量が漸減していくこと、及び移植軟骨そのものが変性することが問題である。いったん生着した軟骨組織が、移植部位で自ら軟骨組織を新生し、物理的的刺激等に抗して、その形態および組織量を維持し得るかが問題である。しかしながら、これらについては、現在までにほとんど解明されていない。

## 2. 研究の目的

形成外科領域では、古くから臨床で軟骨移植を行っているが、経験的に、いったん皮下に移植された軟骨膜を欠く軟骨組織(硝子軟骨もしくは弾性軟骨)は、その性質を変えず軟骨組織として組織量を維持しつつ半永久的に存在していることが知られている。しかしこの機序は未だ不明である。本研究では、ほぼ全身の細胞でGFPの緑色蛍光が観察されるGFP transgenic ラットと同系統の野生型ラットを用いて、異所性軟骨形成モデルの実験系を構築し、軟骨細胞の組織内への定着条件と組織内での軟骨新生条件を解明し、軟骨の再生医療学的治療法の確立に貢献することを研究目的としている。

## 3. 研究の方法

新生する軟骨細胞の起源を組織学的に解明するために、次の2つの実験モデルを作成した。

実験モデル GFP transgenic ラット(donor)より採取した肋軟骨組織を同系統の野生型ラット(recipient)の背部皮下に移植する。

実験モデル 野生型ラット(donor)より採取した肋軟骨組織を同系統 GFP transgenic ラット(recipient)の背部皮下に移植する。

この際、採取した軟骨は、(a)軟骨膜を完全に除去した群(b)軟骨膜を付着させたままの2群を作成した。

上述した2つのモデルより得られた軟骨組織とその周囲組織を構成している細胞群を経時的に観察し、組織がGFP陽性(GFP transgenic ラット由来)あるいはGFP陰性(野生型ラット由来)として区別されることによって、移植後に新たに形成された軟骨の組織学的な起源を解析する。次いで軟骨形成に関与する細胞の機能および系譜について解明を試みた。

実際の手法は以下の通りである。

a) 組織・細胞の採取及び移植：ジエチルエーテル吸入後、移植前の軟骨組織(標本固定用)及び異種移植に用いる軟骨組織を10週齢野生型およびGFP transgenic ラットから採取した。

b) 組織の摘出及び標識細胞移植系における組織・細胞の形態観察：採取した軟骨組織は、深麻酔下に生理的状態の他の個体の背部皮下に移植し、移植された動物は一定期間の飼育後、血管灌流固定により組織を摘出し、組織・細胞の形態的解析を行なった。

c) 実験終了時期(エンドポイント)：

いずれも移植後4週から8週までに順次試料を採取し、実験を終了した。

d) 採取した軟骨およびその周囲組織の組織学的解析：GFPラベルされた細胞と

組織における分布パターンと細胞学的特徴、さらに周囲組織・細胞との関連について、光学顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いて光顕レベルの観察を行なった。また、次世代新機軸走査型電子顕微鏡 FIB/SEM を用いて新生軟骨とその周囲組織の構造を細胞レベルで解析し、移植軟骨周囲の線維芽細胞様細胞の形態的特徴と軟骨新生との関連性について検討を行った。

#### 4. 研究成果

- 1)当初、軟骨膜を欠く移植軟骨組織から軟骨膜が再構築されると予想していたが、実際には移植床由来の組織から移植軟骨周囲に軟骨膜様組織が再構築された。
- 2)軟骨膜を付着させて移植を行った群では、移植床から軟骨実質内への細胞の移動はなかった。
- 3)移植軟骨は移植8週後経過しても軟骨基質に collagen type2 を保持しており、軟骨膜を書いて移植されても軟骨基質の変性は起こっていなかった。
- 4)軟骨膜を除去した軟骨を移植した群では、移植4週後に経時的に移植軟骨周囲に recipient 由来の線維芽細胞様細胞が集簇した。
- 5)さらに、移植8週後には、移植軟骨実質内に recipient 由来細胞が出現した。これらの細胞は免疫組織化学染色にて、軟骨基質特有の collagen type2 が存在していたことから、軟骨細胞であることが確認された。
- 6)FIB/SEM を用いた3次的に微細構造解析にて、軟骨膜様組織と移植軟骨の移行部が本来の軟骨膜組織の細胞構築と類似していた。

このことから、軟骨膜を欠いて移植された軟骨の周囲には、移植後に recipient 由来の軟骨膜様組織が形成され、ここから軟骨新生に必要な将来軟骨細胞になりうる細胞も供給されていることが解明された。この成果を

現在英文誌に投稿中である。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

1)力丸 英明, 力丸 由起子, 太田 啓介, 中村 桂一郎, 清川 兼輔:ラットを用いた移植軟骨の経時的变化に関する組織学的研究-移植軟骨はなぜ術後吸収を生じないのか-第23回日本形成外科学会 基礎学術集会2014.10.9-10 長野県松本市(キッセイ文化ホール)

2)右田 尚, 力丸 由起子, 力丸 英明, 太田 啓介, 清川 兼輔, 中村 桂一郎:移植軟骨の組織学的研究日本解剖学会第70回九州支部学術集会 2014.10.25 福岡県北九州市(産業医科大学 ラマツイーニホール)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

力丸（西）由起子（Rikimaru-Nishi Yukiko）

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：90368960

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

### (4)研究協力者

( )