

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462292

研究課題名(和文) 超音波刺激法によるscaffold-free再生軟骨作成と再生医療

研究課題名(英文) Low-Intensity Pulsed Ultrasound Promoted Matrix Synthesis of Scaffold-free Cartilage Produced in High Density Static Semi-open Culture System

研究代表者

松末 吉隆 (Matsusue, Yoshitaka)

滋賀医科大学・医学部・副学長

研究者番号：30209548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：高い細胞濃度で軟骨細胞を培養すると凝集して組織となった。2.0×10⁷cells/cm²グループのみ自然な関節軟骨に似たプレート状の組織となった。このグループは他の2つのグループより型コラーゲンとアグリカンが高く発現していた。興味深いのは、このグループでのみ超音波によりアグリカンの発現が有意に亢進していることがわかった。この研究では単層培養の軟骨細胞からscaffold-freeの軟骨様組織を作成することができる新たな培養システムを作成した。生体に移植したところ、有効な軟骨間接着を形成した。超音波刺激は、基質合成を高めることにより、良好な移植軟骨を作成する有効な手段となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The chondrocytes cultured at high cell densities in the 2.0 × 10⁷cells/cm² group only became concentrated and formed plate-like construct similar to native articular cartilage by macroscopic and histological assessments. Statistical analysis on the matrix gene expression demonstrated that the levels of type II collagen and aggrecan mRNA of the 2.0 × 10⁷cells/cm² group were significantly higher than the other 2 cell-density groups. Interestingly, the LIPUS application only lead to a statistically significant enhancement of aggrecan gene expression in the 2.0 × 10⁷ cells/cm² group. The current study presents a semi-open static culture system that facilitates production of the scaffold-free constructs from the monolayer-cultured chondrocytes. It suggests that LIPUS application enhances matrix production in the construct, and its combination with the scaffold-free construct might become a feasible tool for production of implantable constructs of better quality.

研究分野：整形外科学

キーワード：再生医学 軟骨細胞 整形外科

1. 研究開始当初の背景

わが国における人口の高齢化は他の先進諸外国に例を見ない速度で進行しており、健全な長寿社会の確立はあまねく国民の希望するところです。関節の軟骨は一旦、損傷されると修復されません。傷んだ関節は金属の人工関節で置き換えることができるようになっただけで、人工関節は義歯のように修理や入れ替えの対象となります。人工関節を用いず、自らの軟骨での修復が望まれますが、傷んだ軟骨を治す方法は未だ確立されていません。

近年、単層培養で増殖させた軟骨細胞を用いて関節軟骨を再生する試みが報告され、非常に注目されました。しかし、その後の追試で培養軟骨をそのまま移植しただけでは、良質の軟骨再生は困難であることが判明しました。そこで自家軟骨細胞をコラーゲン器質内で包埋し、軟骨類似器官を作成し、軟骨欠損部に移植するという手法が開発されました。一部で臨床試験もされていますが、この方法には決定的な問題があります。自家軟骨細胞の採取は正常軟骨組織を犠牲にしなくてはならず量的な限界があるためです。自家軟骨細胞数を増加させようとして単層培養すると細胞数は増えますが、細胞は脱分化を起こしてしまい、最も大切な軟骨器質産生能を失います。

そこで人工の軟骨基質 - Scaffold (足場とも言います) - で軟骨細胞を包埋し、これを移植する 3次元培養軟骨移植が試みられました。しかし、人工的 scaffold にはレシピエントとなる関節に異物反応を起こさないこと、自家新生軟骨により損傷が修復された後には吸収され消退することなどが求められますが、これらの諸条件を全て満たすような理想的な人工 scaffold の確立には至っておりません。

2. 研究の目的

採取した軟骨細胞自身に自らが包埋されるほどの十分な軟骨基質を産生させることに成功すれば、人工 scaffold を用いないので、人工的 scaffold の問題は一気に解決されます。我々は scaffold - free

construct の作成を目標に下記の研究を予定しています。

軟骨細胞は高濃度濃縮培養すると自ら軟骨基質を作成することは、以前からよく知られています。しかし、これには大量の軟骨細胞を必要とします。

3. 研究の方法

具体的には採取した軟骨細胞は一旦、 1.0×10^6 cells/dish で単層培養により 2~3 週間培養増殖させた後に合成半透膜上に高濃度で細胞を播種して高濃度培養する。この scaffold を必要としない我々の培養系では、その条件を変えることにより軟骨類似器官の厚さ、硬さなどの形態を調節可能であるという利点を持っている。この利点を生かし、軟骨分層欠損への充填に理想的な形態 (円筒形) と硬度をもつ軟骨類似器官形成のための至適条件を検討した。具体的な軟骨細胞の濃度としては、1.0、2.0、および 4.0×10^7 cells/cm² で調べた。

本研究の最終目標は、移植医療に耐えうる再生軟骨を作成することにある。scaffold-free 再生軟骨 construct による関節軟骨部分欠損修復の評価にはウサギ膝関節軟骨部分欠損モデルを用いる予定である。実験用ウサギ膝関節軟骨に直径 4mm の軟骨部分欠損を作成する。各週齢 5 匹ずつを予定している。ここに、scaffold-free 再生軟骨 construct を移植し、軟骨修復能についての評価を行う。具体的には、軟骨類似器官移植後 2 週、4 週、および 8 週での評価をした。

実験用ウサギ膝関節軟骨部分欠損の修復状態について経時的に検討した。調査項目は、代表的な軟骨器質であるアグリカンと II 型コラーゲンとし、これらの経時発現量を比較した。アグリカン、II 型コラーゲンの mRNA の発現は RT-PCR 法による評価を、タンパクの発現はアグリカン、II 型コラーゲンに対する免疫組織化学染色法とトリイジン・ブルーによるメタクロマジーの発現とによって行った。

4. 研究成果

この研究では単層培養の軟骨細胞から

scaffold-free の軟骨様組織を作成することができる新たな semi-open static culture system を作成した。

生体に移植したところ有効な軟骨間接着を形成した。LIPUS はその組織における基質合成を高めて、scaffold-free の軟骨様組織と組み合わせて使うことでより良好な移植軟骨を作成する有効な手段となる可能性がある。

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 12 件)

1. Kumagai K, Toyoda F, Staunton CA, Maeda T, Okumura N, Matsuura H, Matsusue Y, Imai S, Barrett-Jolley R. Activation of a chondrocyte volume-sensitive Cl⁻ conductance prior to macroscopic cartilage lesion formation in the rabbit knee anterior cruciate ligament transection osteoarthritis model. *Osteoarthritis Cartilage*.24:1786-1794, 2016. 査読有
2. Maeda T, Toyoda F, Imai S, Tanigawa H, Kumagai K, Matsuura H, Matsusue Y. Lidocaine induces ROCK-dependent membrane blebbing and subsequent cell death in rabbit articular chondrocytes. *J Orthop Res*.34:754-762, 2016. 査読有
3. Kodama N, Takemura Y, Ueba H, Imai S, Matsusue Y. A new form of surgical treatment for patients with avascular necrosis of the talus and secondary osteoarthritis of the ankle. *Bone Joint J*.97-B:802-808, 2015. 査読有
4. Kodama N, Ishida A, Ueba H, Imai S, Matsusue Y. Florid reactive periostitis of the forearm with pronation and supination contracture. *J Orthop Sci*.20:1122-1126, 2015. 査読有
5. Kodama N, Ueba H, Takemura Y, Ishida M, Imai S, Matsusue Y. Joint arthroplasty with osteochondral grafting from the knee for posttraumatic or degenerative hand joint disorders. *J Hand Surg Am*.40:1638-1645, 2015. 査読有
6. Mori K, Imai S, Nishizawa K, Matsusue Y. Cervical myelopathy due to calcification of the posterior atlantoaxial membrane associated with generalized articular deposition of calcium pyrophosphate dehydrate: a case report and review of the literature. *J Orthop Sci*.20:1136-1141, 2015. 査読有
9. Araki S, Imai S, Ishigaki H, Mimura T, Nishizawa K, Ueba H, Kumagai K, Kubo M, Mori K, Ogasawara K, Matsusue Y. Improved quality of cartilage repair by bone marrow mesenchymal stem cells for treatment of an osteochondral defect in a cynomolgus macaque model. *Acta Orthop*.86:119-126, 2015. 査読有
10. Shioji S, Imai S, Ando K, Kumagai K, Matsusue Y. Extracellular and intracellular mechanisms of mechanotransduction in three-dimensionally embedded rat chondrocytes. *PLoS One*.9:e114327, 2014. 査読有
11. Oda K, Mori K, Imai S, Uenaka K, Matsusue Y. Comparison of repair between cartilage and osteocartilaginous defects in rabbits using similarly manipulated scaffold-free cartilage-like constructs. *J Orthop Sci*.19:637-645, 2014. 査読有
12. Kodama N, Takemura N, Ueba H, Imai S, Matsusue Y. Ultrasound-assisted closed reduction of distal radius fractures. *J Hand Surg Am*.39:1287-1294, 2014. 査読有

[学会発表](計 5 件)

1. Maeda T, Imai S, Toyoda F, Tanigawa H, Kumagai K, Matsusue Y. Lidocaine induces rock-dependent membrane blebbing and cell death in rabbit articular chondrocyte. OARSI2015 World Congress, Washington, USA, 2015.4.30 ~ 5.3.
2. Matsusue Y, Uenaka K, Kubo M. Usefulness and limitation of autogenous osteochondral plugs transplantation for steroid-induced osteonecrosis of the knee. 13th Congress of AFJO, Saint-Malo, France, 2015.6.4 ~ 6.
3. Matsusue Y, Kubo M, Uenaka K, Nakagawa Y. Joint preservation by autogenous osteochondral graft transplantation for osteonecrosis of the knee. 1st Congress of Asia-Pacific Knee, Arthroscopy and Sports Medicine Society (招待講演). 奈良市. 2014.4.14 ~ 15.
4. 前田勉、今井晋二、豊田太、熊谷康佑、森

幹土、松浦博、松末吉隆。Lidocaine はウサギ軟骨細胞に Rho-kinase 依存症の membrane blebbing を起こす。第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会。鹿児島市。2014.10.9～10。

5. 松末吉隆（招待講演）。私の膝関節外科のあゆみ。第 47 回中国・四国整形外科学会。尾道市。2014.11.8～9。

〔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

松末 吉隆 (MATSUSUE YOSHITAKA)
滋賀医科大学・医学部・副学長
研究者番号：30209548

(2) 研究分担者

今井 晋二 (IMAI SHINJI)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：90283556

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()