

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670780

研究課題名(和文) 幹細胞ニッチに着目した軟骨膜片移植による長期形態維持性耳介軟骨再生法の開発

研究課題名(英文) Development of the method which focus its attention on a stem-cell niche, for regenerating long-term form-retaining auricular cartilage by the piece transplantation of a perichondrium

研究代表者

小室 明人 (KOMURO, AKITO)

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号：80387365

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)：耳介軟骨再生の課題である長期形態維持性を改善するため、近年軟骨膜に存在することが判明した組織幹細胞とその保持機構に着目した。家兎耳介の研究を計画したが、先に自らの家兎肋軟骨膜研究で、軟骨新生の前に軟骨膜内に血管新生が生じることが明らかになり、肋軟骨モデルで、血管新生阻害剤を持続投与し、血管新生の阻害と軟骨新生との関連について調べた。血管新生阻害剤により、軟骨膜内の新生血管数が減少し、その後の新生軟骨量も有意に抑制された。軟骨膜血管新生と新生軟骨の増殖・分化に相関を認めたことから、軟骨膜内での血管新生が軟骨膜前駆細胞/組織幹の保持機構に作用し、軟骨新生に対するトリガーになることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We planned the study using the rabbit auricular cartilage paying our attention to stem cells and its maintenance mechanism to improve the long-term form maintainability that have been a problem of the auricular cartilage reproduction. But in own study for the rabbit rib perichondrium, it was found earlier that neovascularization occurred in a perichondrium before chondrogenesis. So we examined an association between angiogenetic inhibition and the chondrogenesis in this model. By administration of neovascularization inhibitor, the neovascularity in the perichondrium decreased and significantly the quantity of subsequent chondrogenesis was inhibited. Because the growth and differentiation of the perichondrium cells thought to be the stem cells origin showed a correlation of the chondrogenesis, the neovascularization acted for the maintenance mechanism of the perichondrium stem/progenitor cells. It was suggested that the neovascularization in the perichondrium triggered the chondrogenesis.

研究分野：形成外科

キーワード：軟骨膜組織幹細胞・前駆細胞 幹細胞ニッチ 血管新生

## 1. 研究開始当初の背景

耳介軟骨再生医療において再生軟骨の長期形態維持性の確保は重要課題である。近年、軟骨膜細胞の中に間葉系幹細胞・軟骨前駆細胞が存在することが報告され、軟骨膜は軟骨再生医療の有望な材料として期待される。自己複製能と多分化能を持つこれら幹細胞の軟骨膜中での静止・活性化の機構を解明し、ニッチ因子による動態制御が可能になれば、臨床応用に向けた意義は大きい。

当初、耳介軟骨膜の組織幹細胞、幹細胞ニッチに関連する分子機構の解明のため、家兎耳介を用いた研究を計画した。しかし本研究に先立ち家兎肋軟骨膜を用いた自らの *in vivo* の研究で、軟骨膜細胞の増殖前に、軟骨膜内に血管新生が生じることが明らかになったため、肋軟骨膜モデルを用い、軟骨膜幹細胞の静止・活性化の動態制御機構のニッチ因子としての血管新生について研究した。

## 2. 研究の目的

自らの家兎肋軟骨膜を用いた *in vivo* の研究によって、処置後1週間以内の早期では軟骨膜細胞の増殖にあわせて、軟骨膜最外層から内側に向かって血管新生が生じ、2週以降で増殖した軟骨膜内層が、軟骨へ分化することが明らかになった。このことから血管新生が、軟骨膜幹細胞への増殖・分化のトリガーになっていることが想定された。

血管新生が増殖・分化へのトリガーであるなら、平時には軟骨膜幹細胞を静止状態に保持している低酸素ニッチが存在するのではないかという仮説を立てた。この仮説を確認するため、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) に対するモノクローナル抗体の局所投与を行い、血管新生の阻害と、その後の軟骨新生の抑制について検討を行った。

## 3. 研究の方法

日本雄性白色家兎 (体重 3.0 - 3.6Kg) 5羽の両側第7,8肋軟骨,計20本を使用した。軟骨を約2cm摘出した後、温存した軟骨膜を筒状に縫合した。血管新生阻害剤としてベバシズマブ (抗 VEGF ヒトモノクローナル抗体: アバスチン®, 25 mg/ml, 中外製薬) を 0.1ml 局所散布した後、皮下に埋入した浸透圧ポンプ (alzet®model 2ML2, DURECT Corporation) によって 5  $\mu$ l / h で3日間局所に徐放した。対照は生理食塩水 (以下 NS) を使用した。再建術後4日 (各4本) と、14日に (各6本) 組織を採取した。

浸透圧ポンプ



### < 評価方法 >

#### ・軟骨膜の新生血管数の半定量解析

ベバシズマブの血管新生抑制作用を検討するため、再建後4日で中央部横断最大断面の温存軟骨膜内の抗 CD31 抗体陽性血管を、ベバシズマブ群と対照群について薬剤が直接作用する体表側と薬剤の影響が乏しい胸腔側について検討した。最も血管密度の高い4視野 (対物レンズ 20倍, 中間レンズ 10倍) で計測し、新生血管数/視野の平均値を算出した。

#### ・新生軟骨の半定量的解析

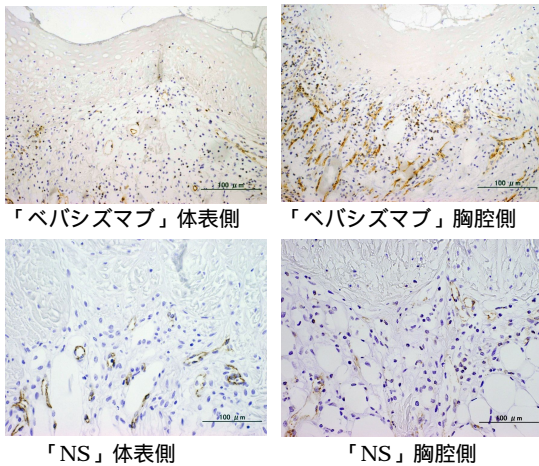
軟骨新生量について検討するために、再建後14日の軟骨膜組織の中央部横断最大断面の Safranin O 染色切片を用い、軟骨基質部分を示す赤色領域の厚さを体表側と胸腔側で3か所ずつ計測した。ベバシズマブ群と対照群でそれぞれ新生軟骨の厚さの比 (体表側 / 胸腔側) の平均値を算出した。

#### 4. 研究成果

・軟骨膜の新生血管数の半定量解析 (n=4)

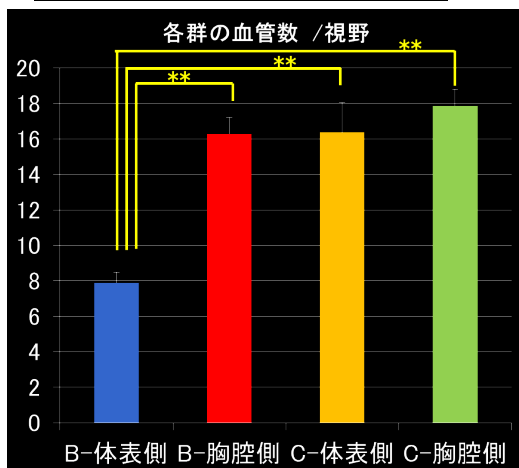
再生後4日の抗CD31抗体による免疫染色で、ペバシズマブ群の体表側では明らかに軟骨膜最外層から軟骨膜内側に向かって血管新生が少なく、ペバシズマブによって血管新生が阻害されていた。

再建術後4日(抗CD31抗体)



処置後4日の軟骨膜内の一視野あたりの平均新生血管数は、ペバシズマブ投与群体表側  $7.9 \pm 0.59$ 、胸腔側  $16.3 \pm 0.9$ 、対照群体表側  $16.4 \pm 1.68$ 、胸腔側  $17.9 \pm 0.92$  と、ペバシズマブにより軟骨膜内小血管新生・侵入は有意に抑制された ( $p < 0.01$ )。

軟骨膜内の新生血管数:再建後4日



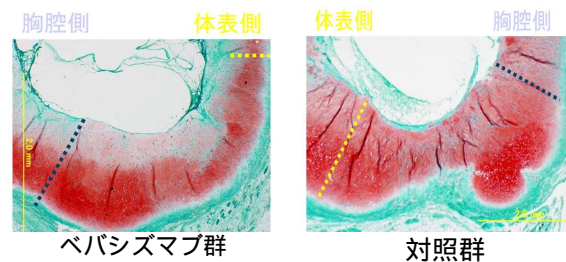
B:ペバシズマブ, C:対照(NS),

\*\*  $p < 0.01$  Kruskal-Wallis

・新生軟骨の半定量的解析 (n=6)

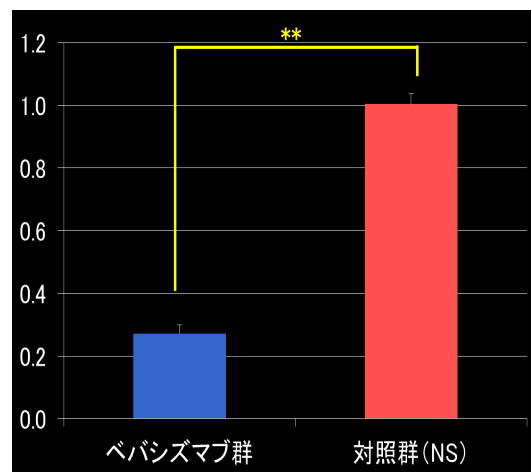
処置後14日のサフラニンO染色で、ペバシズマブ群では体表側と胸腔側では新生軟骨の厚さが異なったが、対照群では体表側と胸腔側での新生軟骨に相違を認めなかった。

再建術後14日(サフラニンO染色)



ペバシズマブ群の新生軟骨量を体表側と胸腔側での新生軟骨の厚さの比(体表側 / 胸腔側)で半定量解析すると、ペバシズマブ群は対照群と比較して有意に低く、体表側での軟骨新生が抑制されていた。

新生軟骨の厚さの比(体表側/胸腔側):  
再建後14日



\*\*  $p < 0.01$ , t検定(Welch)

以上から、軟骨膜剥離という機械的なストレスにより、局所でVEGFが産生されたこと想定され、抗VEGF抗体の局所投与により軟骨膜への血管新生が阻害され、軟骨新生が抑制されることが確認された。軟骨膜へ

の血管新生・侵入が軟骨膜間葉系組織幹細胞の増殖のトリガーであることが示され、軟骨膜組織幹細胞の増殖制御における低酸素ニッチの存在が強く示唆された。

#### 結 語

1. 家兔の軟骨膜温存・軟骨再生モデルを用いて、軟骨膜からの軟骨再生過程の早期にみられる血管新生を、ペバシズマブ(抗VEGFヒトモノクローナル抗体:アバスチン®)により阻害した。

2. 軟骨膜内への血管新生阻害により新生軟骨量の減少を認めた。

3. 血管新生抑制による低酸素ニッチが想定され、軟骨膜幹細胞・前駆細胞の静止・活発化のメカニズムに関与している可能性が示唆された。

#### 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 0 件)

〔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

小室 明人 (KOMURO, Akito )

金沢大学・附属病院・講師

研究者番号: 80387365

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: