

博士論文

生体軟骨組織細断装置を用いた新規再生軟骨作製法の開発

青木 絵里香

目次

1. 要旨	2
2. 序文	2
3. 方法	
生体軟骨組織細断装置による軟骨小片の作製	7
軟骨小片の培養	7
凝集化による大きさの評価	8
タイムラプス撮影	8
移植による軟骨小片由来再生軟骨の有用性評価	9
組織学的評価	9
力学的評価	12
統計学的評価	12
4. 結果	
単純培養：細切後の軟骨小片の凝集の必要条件	14
凝集体形成の時期	14
複合培養：軟骨基質を形成する条件	17
凝集体形成における細胞動態解析	19
凝集体移植時の軟骨再生能についての検討	19
間質細胞の特性	23
5. 考察	27
6. 結論	35
7. 謝辞	36
8. 引用文献	37

要旨

現在の再生軟骨作製法では、酵素処理による細胞障害、単層培養による脱分化、生分解性足場に対する生体反応などの課題がある。これらを解決するため、耳介軟骨を軟骨小片に細断し、in vitro で凝集させ、基質産生を促す最適な条件を検討した。さらに、凝集体をマウスに移植し、基質形成を評価した。結果、10%FBS含有培地での非接着培養により凝集体が形成され、その後、IGF 添加培地で培養すると、間質に軟骨基質が産生された。In vivo では、移植した凝集体の間質部分は軟骨基質で満たされていた。これらの結果から、軟骨小片の凝集体は、酵素処理、平面培養、足場素材が不要な再生軟骨作製に利用できる可能性が示された。

序文

軟骨は、身体のさまざまな部位に見られる半剛性で弾性のある無血管結合組織である。その発生においては、軟骨幹細胞が増殖し、細胞間の相互作用により、細胞凝集が起こる。軟骨前駆細胞は紡錘形の線維芽細胞様細胞から円形の軟骨細胞に形態が変化する。更に増殖が起こり、分化成熟することにより軟骨組織が構築される。

外耳、鼻尖と鼻中隔では、軟骨が顔の輪郭を維持し、組織の弾性を保持してい

る。口唇口蓋裂、小耳症などの先天性疾患、外傷、悪性腫瘍などによって引き起こされる後天的な審美的、機能的障害には、3次元構造および機械的強度を備えた移植体を使用した再建手術が適応となる場合がある。

鼻背の増強に使用される非吸収性人工材料として、ゴアテックス¹またはシリコン²が用いられるが、異物反応、周囲組織の石灰化、位置異常と変位、穿孔および露出などを引き起こす可能性がある。これらの問題を回避するために、自家組織として耳介軟骨、鼻中隔軟骨および肋軟骨がしばしば用いられる。肋軟骨は、鼻形成術³または小耳症治療のために使用される⁴が、採取時に胸膜を損傷するリスク、胸部変形や疼痛、もともとの湾曲した形状に戻ろうとすることによる経時的変形などの問題点がある。耳介および鼻中隔軟骨には、使用可能な量に制限があり、形態修正に十分な量の組織が採取された場合、耳介または鼻が変形するリスクがある。

再生医療は、細胞、足場、成長因子、またはその組み合わせにより組織または臓器を再生する技術である。当研究室においては、口唇口蓋裂に対する鼻変形に対して使用可能なインプラント型再生軟骨を開発している⁵。インプラント型再生軟骨の作製においては、自己耳介軟骨を採取し、軟骨細胞を酵素処理によって単離し、拡大培養した後に、三次元構造と機械的強度を付与するためポリ L 乳酸 (poly-L-lactic acid: PLLA) 足場素材に投与する。インプラント型再生軟骨の長

期的な形状の維持と安全性は臨床研究⁶によって確認されたが、軟骨再生の程度については非侵襲的な評価法が確立されておらず、正確な評価が難しい。同様の再生軟骨を移植した動物実験においては、一様な軟骨ではなく島状の軟骨が形成される例がしばしば見られている。この原因として、再生軟骨の製造方法におけるいくつかの問題点が考えられる。まず、軟骨細胞は単層拡大培養することにより脱分化し、移植後に再分化するため、治療効果が不確実となることが挙げられる⁷。次に、コラゲナーゼ酵素処理による細胞障害が考えられる⁸。また、生体分解性足場素材に対する生体反応は、軟骨の形成に負の影響を与える⁹。生体反応を防止するため、足場を用いない再生組織も開発されているが¹⁰、移植時負荷に耐えうる機械的特性を備えた再生組織はまだ実現されていない。

酵素処理や平面培養を行わない方法として、肋軟骨を破砕した diced cartilage の小耳症や頭蓋冠の治療への応用が、1943年に Peer によって最初に発表された。軟骨は吸収されず、凝集塊として融合し、軟骨小片の間は結合組織により満たされていた¹¹。しかし、この方法では軟骨小片は三次元形状が付与されていない状態で移植されている。また、他家移植の製品として、DeNovo[®] NT Natural Tissue Graft が海外で認可されている。粒子化された小児ヒト関節軟骨で、フィブリンにより粒子状組織片を病変部に固定する方法で使用される。これまでに、足首の関節軟骨の修復において有効性が示されている¹²。しかし、同種他家移植である

ため、拒絶反応や未知の感染症のリスクがある。また、移植片を欠損部に充填するものであり、鼻や耳介などに移植するために必要な、3次元形状を持った軟骨をあらかじめ作製して移植するものではない。

軟骨小片に足場材料を併用して軟骨再生能を検証した報告も存在する。Y Lu 等はポリマー足場に投与されたヒト関節軟骨小片が SCID マウスの関節軟骨の欠損を修復したことを報告している¹³。さらに、西脇らは、生体軟骨組織細断装置を用いて軟骨小片を作製し、足場材料・basic fibroblast growth factor 徐放化システムと組み合わせて移植を行い、軟骨が形成されることを示した。このことから、酵素処理や細胞培養行程を介さない新規軟骨組織再生誘導法としてマイクロ軟骨が有用であるとしている¹⁴。しかし、これらの方法で併用した足場材料は免疫反応をもたらす可能性がある。

そこで、本研究では、細胞障害を生じうる酵素処理、脱分化が伴う平面培養、免疫反応を生じうる足場に依存した三次元形状付与方法を抜本的に改善する、革新的な再生軟骨作製法を実現するため、軟骨小片を用いたスカフォールドフリー再生軟骨の作製法について検討した。具体的には、生体軟骨組織細断装置を用いて細断した軟骨組織の器官培養において、凝集塊形成および軟骨基質産生に最適な培地、ディッシュ（接着、非接着）、培養期間について検討した。さらに得られた凝集体をヌードマウスの皮下に移植し、生体内での基質形成を確認し

た。

方法

実験の概要を図 1 に示す。

1. 生体軟骨組織細断装置による軟骨小片の作製

永田小耳症形成外科クリニック（埼玉県戸田市）にて手術を受ける小耳症患者由来の耳介軟骨組織を、インフォームドコンセントを取得した上で採取した（東京大学医学部倫理委員会承認#622）。軟骨組織を東京大学医学部附属病院セルバンキング&プロセッシングセンターに搬入し、軟骨膜を剥離後、清潔エリア内に設置した生体軟骨組織細断装置（（有）シバタシステムサービス社、京都府宇治市）を用いて一辺 200 μm のキューブ型の軟骨小片を作製した。

2. 軟骨小片の培養

作製した軟骨小片 1000 個を Falcon[®] 6-well Clear Flat Bottom TC-treated Multiwell Cell Culture Plate (CORNING、米国)および Ultra-Low Attachment Surface 6-well Plate (CORNING)で培養した。培地は基礎培地 (DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham)、100 ユニット/mL ペニシリンおよび 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシン、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アムホテリシン B (いずれも Sigma-Aldrich、米国)) (以下 DMEM)、基礎培地に 10% fetal bovine serum (10 %FBS (GIBCO#10270-16))を添加したもの (以下 10%FBS 培地)、基礎培地に insulin-like growth factor-1 (IGF-1: Somazon[®] 10

mg for Injection、Orphan Pacific、東京都港区) 1 µg/mL を添加したもの (以下 IGF-1 培地)のいずれかを各 5 mL/well で加え、37°C、5% CO₂ 下で培養した。培地交換は週 2 回、2.5 mL とした。培養 8 週、12 週間後に回収し、組織学的評価を行った。軟骨小片による凝集塊の形成過程を詳細に検討するため、軟骨小片が集合し、凝集塊が形成されるまでの培養初期 (0-5 週間)の軟骨小片を週に 1 回電動倒立型顕微鏡 (Leica,DMi8)を用いて観察した。また凝集の様子を、12 週まで週に 1 回デジタルカメラで記録した。肉眼的に軟骨小片をカウントし、30 以下になったタイミングを凝集とした。更に、凝集化初期に形成された軟骨小片の間質の軟骨基質産生を促す条件を検討するため、以下の通りに培養を行った。10%FBS 培地で 8 週間 (8w/-)または 12 週間 (12w/-)、10%FBS 培地で 5 週間培養し、その後 IGF-1 培地で 3 週間または 7 週間 (それぞれ 5w/3w および 5w/7w)、または 10%FBS 培地で 7 週間、その後 IGF-1 培地で 5 週間 (7w/5w) 培養した。

3. 凝集化による大きさの評価

非接触光学式 3 次元スキャナ ATOS III Triple Scan ((株)丸紅情報システムズ、東京都新宿区)を用いて、12w/-、5w/7w のサンプルの大きさを測定し (n = 3)、拡大率を算出した。

4. タイムラプス撮影

10%FBS 培地で 3 週間培養後のサンプルを使用し、KEYENCE (BZ-X700)で 3 日間タイムラプス撮影を行った。撮影は、15 分間隔で、位相差顕微鏡モードの 10 倍で撮影した。

5. 移植による軟骨小片由来再生軟骨の有用性評価

動物実験については東京大学大学院医学系研究科・医学部動物実験委員会の承認を受けている (#P14-104, #P15-019)。2 項の方法で作製した軟骨小片由来再生軟骨をヌードマウス (BALB/cAJcl-nu/nu, 6 週齢、雄)の背部皮下に移植し、再生軟骨の強度の維持について評価した(n = 3)。2%イソフルラン (AbbVie、米国)で吸入麻酔を行い、背部をメスにて皮膚切開した。剥離剪刀で皮下組織を剥離して、スパーテルを用いて培養後の軟骨凝集体、あるいは細切直後の軟骨小片を挿入した。皮膚の切開部分は 5-0 ナイロンで 1 針縫合し、閉創した。移植 8 週間後に安楽死させて再生軟骨組織を摘出し、組織学的評価、力学強度計測を行った。

6. 組織学的評価

ヒト iPS 細胞(HPS0002)を、TRA1-60, SSEA -3 のポジティブコントロールとして使用した。hiPS 細胞をフィーダー細胞上で増殖培地 (DMEM F12 Gluta Max (GIBCO)、100 UNIT/ml ペニシリン/100 μ g/ml ストレプトマイシン (Sigma)、20 % (vol/vol) knockout serum replacement (KSR; GIBCO)、1 %

(vol/vol) nonessential amino acids (NEAA; Gibco)、55 μ M 2- mercaptoethanol (Sigma)、10 ng/ml FGF-2 (KAKEN)) にて培養した。hiPS 細胞のフィーダー細胞として予め、マウス胚性線維芽細胞 (MEF) を妊娠 14.5 日目の ICR マウス (日本クレア) から採取し、マイトマイシン C (Sigma) にて処理した。継代の際は CTK 溶液とセルスクレーパーにて hiPS 細胞を剥離し、フィーダー細胞上あるいは、フィーダーフリー培養用ディッシュ上に播種した。培地交換は毎日とし、継代は 7 日に 2 回行った。

以下、耳介組織は小耳症患者から摘出された耳介軟骨を使用している。Bio Coat™ Collagen I-coated Culture Slides 4well 354630 (Corning®) で 3 週間培養を行なった。

(軟骨器官培養)

耳介軟骨から軟骨膜を剥離し、一辺 1 cm にトリミングした軟骨片を作製し培養した。培地は 500 μ l、10% FBS (前述)、培地交換は週 2 回半量とした。

(軟骨小片接着培養)

前述の方法で作製した一辺 200 μ m 軟骨小片 100 個を培養した。培地は 500 μ l、10% FBS (前述)、培地交換は週 2 回半量とした。

(単離軟骨細胞)

すでに報告されている方法¹⁵で単離、凍結された軟骨細胞を接着培養した。

各組織を4%パラフォルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋後、ミクロトーム (Leica, RM2265)で4 μm に薄切した。Toluidine blue (TB)、hematoxylin and eosin (HE)染色の他、免疫化学染色として、periostin、proliferating cell nuclear antigen (PCNA)、matrix metalloproteinase-13 (MMP-13)、TRA-1-60、stage-specific embryonic antigen 3 (SSEA-3)に対する染色を行った。使用した抗体の型番と濃度は以下の通りである。Periostin (ab14041: Abcam、米国)は1:750、PCNA (ab92552: Abcam)は1:500、SSEA-3 (bs-3575R: Bioss、米国)は1:100、negative コントロールとして normal rabbit IgG (ab172730: Abcam)1:200、これらに対応する二次抗体はビオチン標識抗ウサギ IgG (code 426011: ニチレイバイオサイエンス、東京都中央区)を使用し、ジアミノベンジジンで染め出しを行なった。TRA-1-60 (ab16288: Abcam)は1:500、negative コントロールとして希釈液 (1%ウシ血清アルブミン)、二次抗体は Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP) (ab205719: Abcam) 1:1000 を使用した。

組織切片を用いて、生体内での基質産生を Image J¹⁶ による画像解析で評価した。評価項目は新生基質の割合と拡大率とした。新生基質の割合は、新生基質面積/回収組織の軟骨部分面積 $\times 100$ で算出した。拡大率は回収組織全体の面積/元の軟骨基質の計算上の面積 (組織切片に含まれる軟骨小片の個数 $\times 40,000 \mu\text{m}^2$) で算出した。

7. 力学的評価

山岡らの報告¹⁷を参考にし、Venustron Alpha version 5.4J ((株)メディカル・エイジェント、京都府京都市)を使用した。1 サンプルについて位置を変えながら5回、0.3mm押し込み時のヤング率 (MPa) を測定し、その平均値を算出した。

8. 統計学的評価

統計学的有意差は、2 群間比較に対しては Student t 検定、3 群に対しては一元配置分散分析 (one-way analysis of variance/one-way ANOVA) および Tukey-Kramer test で判定した。解析処理には Mac 統計解析 Ver.3.0 (株式会社エスミ、東京都中野区) を用い、* : p 値 < 0.05、** : p 値 < 0.01 で有意差ありと判定した。

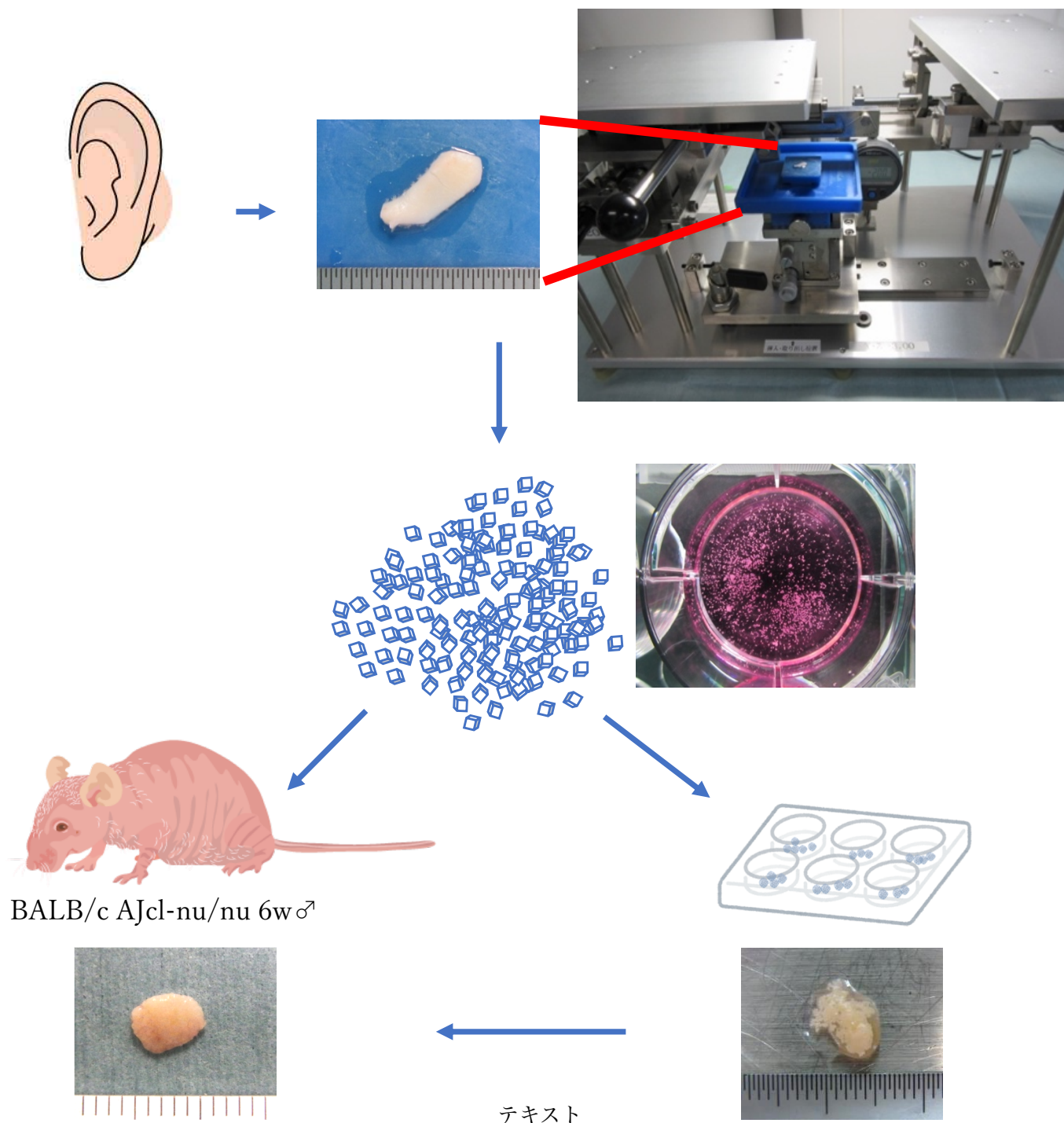


図1 実験概要

軟骨膜を剥離後、生体軟骨組織細断を用いて一辺200 μmのキューブ型の軟骨小片を作製した。作製した軟骨小片を培養し、得られた凝集体について組織学的評価、体積の測定を行なった。さらに、この凝集体を、ヌードマウスの背部皮下に移植し、8週間後に再生軟骨組織を摘出し、組織学的評価、力学強度計測を行った。

結果

1 単純培養：細切後の軟骨小片の凝集の必要条件

最初に、生体軟骨組織細断装置を用いて軟骨小片を作製し、凝集体を形成する培養条件を検討した。

Tissue culture plate で培養を行うと、10%FBS 培地で培養した群（10%FBS 群）のみ約 4 週後に細胞の遊走と、dish 底面への小片および細胞の接着が認められた。DMEM、IGF-1 培地で培養した群（それぞれ DMEM 群、IGF-1 群）では細胞の遊走は認められなかった。一方、Ultra-low attachment plate で培養を行うと、10%FBS 群では約 5～6 週で軟骨小片同士が三次元的に集合、凝集し、軟骨小片の凝集体外層に膜様組織が形成された。DMEM 群、IGF-1 群では凝集は起こらなかった。（図 2, 3）

2 凝集体形成の時期

凝集体を形成する時期を更に詳細に検討するため、Ultra-low attachment plate で 10%FBS 群（n = 30）、DMEM 群（n = 4）、IGF-1 群（n = 4）での培養経過を週に 1 回、デジタルカメラで撮影し、肉眼的に、凝集が起こるタイミングをグラフ化した。図 3 に代表例を示す。10%FBS 群ではほとんどが 6 週以内に凝集した。

1 つは凝集が起こらなかった。DMEM 群、IGF 群では凝集が起こらなかった。8 週以降変化は認められなかった。（図 3）