

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 青木 絵里香

研究背景

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り、顔面領域では、輪郭を維持し、顔の動きを柔軟にしている。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審美的、機能的障害には、インプラントを使用した再建手術が適応となる場合がある。鼻背の増強には様々な非吸収性人工材料が用いられるが、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、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。当研究室で開発したインプラント型再生軟骨の作製においては、自己耳介軟骨から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 乳酸足場素材に投与する。しかし、軟骨細胞の単層拡大培養による脱分化や、コラゲナーゼ酵素処理による細胞障害、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。足場を用いない再生組織も開発されているが、移植時から組織成熟までの間に加わる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も報告されているが、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。生体軟骨組織細断装置を用いて軟骨小片を作製し、これを足場材料・basic fibroblast growth factor 徐放化システムと組み合わせて移植することで、軟骨が形成されることを示した報告もあるが、足場材料である PGA メッシュが免疫反応をもたらす可能性がある。

目的

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。

方法

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同意取得の上で譲り受け、軟骨膜を剥離後、生体軟骨組織細断装置を用いて一辺 200 μm のキューブ型の軟骨小片に細切した。

In vitro

1. 軟骨小片の培養

作製した軟骨小片 1000 個を Standard Culture Plate および Ultra-Low Attachment Plate で培養した。培地は DMEM/F12、10%FBS 培地、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。培養 8 週、12 週間後に回収し、組織学的評価を行った。また、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、12 週まで週に 1 回デジタルカメラで記録した。更に、凝集体における軟骨基質産生を促す条件を検討するため、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。

2. 大きさの評価

凝集化による大きさの変化を、非接触光学式 3 次元スキャナ ATOS III Triple Scan を用いて測定し、拡大率を算出した。

3. 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。

4. 組織学的評価

各組織を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋後、TB、HE 染色の他、免疫化学染色として、periostin、PCNA、MMP-13、TRA-1-60、SSEA-3 に対する染色を行った。

In vivo

1. 移植による軟骨小片由来再生軟骨の有用性評価

前述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の背部皮下に移植し、8 週間後に再生軟骨組織を摘出し、解析した。

2. Image J による画像解析

組織切片を用いて、生体内での基質産生を評価した。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 $\times 100$ 、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。

3. 力学的評価

Venustron Alpha version 5.4J で、0.3mm 押し込み時のヤング率 (MPa) を測定した。

結果

In vitro

1. 単純培養：細切後の軟骨小片の凝集の必要条件

Ultra-Low Attachment Plate で培養を行なった 10%FBS 群でのみ、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。Standard Culture Plate では全ての群で凝集は起こらなかった。

2. 複合培養：軟骨基質を形成する条件

凝集が起こった時点で、IGF-1 培地で培養し、分化誘導を行った。組織切片を作製して、HE 染色および TB 染色で基質形成を評価した。7w/5w で最も良好な基質産生が見られた。

3. 体積の評価

培養後の凝集体の大きさは 5w/7w では $18.53 \text{ mm}^3 \pm 4.064 \text{ mm}^3$ 、12w/-では $15.69 \text{ mm}^3 \pm 1.796 \text{ mm}^3$ であり、培養条件による差は認められなかった ($p = 0.55$) が、いずれのサンプルも培養開始前の軟骨小片と比較して体積は増大していた。

4. 凝集体形成における細胞動態解析

培地中に浮遊している細胞が、軟骨小片同士の間徐々に集積していく様子が観察された。

5. 間質細胞の特性

7w/5w では periostin も PCNA も陽性であった。7w/-においては periostin 陰性で、間質に存在する細胞は少ないが、基質辺縁に存在する細胞で MMP-13 は陽性であった。細切直後では全て陰性であった。TRA-1-60、SSEA-3 に対する免疫染色では、5w/7w,12w/-では陽性細胞が見られたが、native cartilage, および diced cartilage 由来の軟骨細胞では陰性であった。

In vivo

1. 凝集体移植時の軟骨再生能についての検討

非接着培養を行なって得られた凝集体および細切直後の軟骨小片をヌードマウスの背部皮下に移植し、8週後に回収して組織学的評価を行なった。7w/5w を移植したもの(7w/5w/8w) が、最も良好な基質産生を示しており、in vitro の組織所見とも一致していた。

2. ImageJ を用いた解析の結果、新生基質の割合、拡大率共に、7w/5w/8w において、他の培養条件と比較して、有意に高値となった。($p = 0.000$)

3. 力学強度は 7w/5w/8w では 12w/-/8w ($p = 0.000$)、直後/8w ($p = 0.000$)、5w/7w/8w ($p = 0.000$)と比較して有意に高値となった。

考察

軟骨を器官培養すると、軟骨小腔から細胞が遊走することが報告されている。今回の検討では、非接着条件で軟骨小片を 10%FBS 培地で培養した際には、凝集した軟骨小片の間質に細胞が観察された。タイムラプス観察では、培地中に浮遊している細胞が軟骨小片間に集積している像が見られたことから、軟骨小片から遊走し、培地中に放出された細胞が集積して、間質を形成したことが考えられる。

また、今回の検討では、10%FBS 培地のみで凝集体が得られたが、これは 10%FBS を含む培地で軟骨細胞を培養すると大きな凝集体が得られるとした先行文献と一致する。一方、IGF-1 は細胞増殖、軟骨組織形成、軟骨分化を促進する働きがあることなどが報告されているが、今回の検討でも IGF-1 培地で培養を行うことで、間質の細胞増殖および基質産生が認められた。興味深

い事に、7w/5w では、5w/7w よりも軟骨基質形成が良好であった。培地の切り替えのタイミングにおける、2 週間の差がこのよう差異を生じる理由の解明についてさらなる検討を行うことで、培養条件の最適化につながる所見が得られる可能性がある。

さらに、これらの条件で培養した凝集体について、移植後の軟骨再生能を検討した。先行研究においては、移植前の軟骨細胞三次元培養に用いる培地として、分化培地を用いた場合に移植後の軟骨再生が良好であるとする報告がある一方で、増殖培地を用いた方が良好な再生軟骨が得られたとする報告もある。本研究では、増殖培地から IGF-1 を含んだ分化培地に切り替える複合培養を行うことで、移植後に良好な軟骨組織形成が得られた。

細切直後の軟骨小片、10%FBS 培地で 7 週培養した軟骨小片由来凝集体と、さらに 5 週 IGF-1 培地で培養した凝集体の組織切片の比較では、PCNA 陽性細胞は間質に見られ、軟骨小片から遊走した細胞が 12 週後も良好に増殖していることを示した。IGF-1 培地での培養後に見られた periostin は、コラーゲン組織の高次構造化を促進して、再生組織の成熟に寄与した可能性がある。タンパク分解酵素である MMP-13 は、IGF-1 により発現が低下するという報告がある一方、逆に発現が上昇するという報告もある。本研究において、MMP-13 は増殖培地による培養後には僅かな細胞で陽性であったが、さらに IGF-1 培地による培養で陽性細胞が増加した。基質からの細胞遊走にはタンパク分解酵素の関与が考えられるが、細胞の遊走は凝集体形成時 7 週までに既に生じており、この過程における基質分解には他のタンパク分解酵素の関与が示唆される結果となった。

軟骨細胞を平面培養すると脱分化が生じるが、3 次元培養では軟骨基質形成能が維持されるとの報告が複数ある。移植後の軟骨再生には、軟骨幹・前駆細胞が大きく貢献すると考えられていることから、幹細胞マーカーとして知られている TRA-1-60, SSEA3 の発現を検討した。本研究において、細切直後の軟骨小片由来細胞を平面培養すると TRA-1-60 および SSEA-3 は陰性であったが、非接着 plate で三次元培養すると、IGF-1 刺激の有無にかかわらず間質細胞は TRA-1-60, SSEA-3 陽性となった。これらの結果は、軟骨小片の凝集体を三次元培養することで生じた間質細胞は幹細胞特性を有することを示唆した。

結論

生体軟骨組織細断装置を用いて作製した軟骨小片自体をコラゲナーゼ処理することなく細胞の供給源として軟骨基質ごと培養し、凝集させることで、脱分化させることなく、少量の軟骨から大きな再生軟骨を作製できる可能性が示唆された。