

## 論文の内容の要旨

### 論文題目 軟骨再生のための塩基性線維芽細胞増殖因子 (b-FGF)の徐放化至適量に関する基礎的研究

氏名 大谷 祐之

#### 【背景・目的】

細胞・足場・成長因子により組織・臓器を再生させる Tissue Engineering の概念から発展した技術においては、様々な再生の方法が開発されている。我々は、小児の気道再生の研究を行っている。気道の機能で最も重要なことは、空気を出し入れする為の内腔の開存である。そこで気道のフレームとなる気管軟骨の再生研究を中心に行っている。我々は、組織工学的な軟骨再生を行うために必要な細胞数は、 $10\sim 50\times 10^6$  cells/cm<sup>3</sup>であることを確認した。小児では、再生気管が成長する必要があるので、基材が生体内で分解されるポリグリコール酸(PGA)メッシュ、ポリ乳酸(PLLA)、ポリ乳酸とカプロクトンの重合体、コラーゲンスポンジ、ゼラチンスポンジを用いて軟骨再生を実証してきた。また、肉芽形成促進作用、血管新生作用、そして軟骨細胞の増殖作用を有するとされる塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor, b-FGF)の徐放性製剤が、軟骨再生に有用であることを報告した。この徐放化は、等電点5のゼラチン担体へb-FGFを静電的に安定吸着させ、ゼラチンの吸収分解に伴って徐放させる技術である。

しかし b-FGF の徐放量に関しては、まだ一定の見解が示されていない。そこで本研究では、生分解性かつ力学強度を付与した  $\beta$ -TCP(beta-tricalcium phosphate)含有のゼラチンスポンジを用いて軟骨再生が可能であるか検討すること、この足場材料で軟骨再生に有用な b-FGF の徐放化至適量を検討すること、軟骨組織の再生過程について組織学的に検討することを目的とした。

#### 【方 法】

近交系 C57BL/6J マウス(3 週齢)の耳介軟骨を摘出し細切後、コラゲナーゼ type II による酵素処理を行い、弾性軟骨細胞を単離、培養を開始した。単層細胞培養中に一度継代を行い、全体で約 11 日間にて第 1 継代細胞を回収した。足場(スカフォールド)はゼラチンスポンジと 25% $\beta$ -TCP の複合体を用いた。徐放化する b-FGF の投与量は 0,10,100,500,1000,2000  $\mu$ g/cm<sup>3</sup> とし、足場に含浸させた。播種細胞密度  $10\times 10^6$  cells/cm<sup>3</sup> で足場に播種させ、同系マウスの背部皮下に移植した。2,4,6 週後に移植片を摘出し、形態学的・組織学的・生化学的解析を行った。さらに軟骨が再生される過程における、組織内の細胞数の増殖、炎症性細胞の遊走について検討した。

## 【結 果】

### 形態・重量

摘出した再生組織の形態学的観察、重量測定を行った。再生組織の大きさは、移植4週以降に徐放性 b-FGF 500  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  以上の群で、もとの足場よりも大きくなる傾向にあった。b-FGF 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  以上の群で移植片は、2週の淡赤黄色から4週以降乳白色調の硬い組織となったが、b-FGF 0, 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  はもとの足場の大きさよりも小さく、淡黄色で薄い組織のままであった。

再生組織の重量は、2,4,6週とも、徐放性 b-FGF 用量依存性に増加している傾向であった。b-FGF 0  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  の対照群と比較し、b-FGF 1000と2000  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  の群は、いずれの週でも有意差を認めた。どの投与群においても経時的な重量の変化には、有意差は認められなかった。

### 組織学的所見

トリジンブルー／サフラニンO染色において、移植2週後に b-FGF 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  以上の群で、移植片の表層付近のごく一部で染色される部分を認めた。移植4週後には、b-FGF 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  以上の群で、染色される領域が再生組織の中央部にも観察された。b-FGF 2000  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  群では移植2週に、組織の中央部分に液体貯留による構造を欠く領域が形成されていた。蛍光免疫染色では、移植6週後、再生組織の外側表面が1型コラーゲンにて染色されていた。再生組織内には、軟骨の特異マーカーである2型コラーゲンで染色される領域が観察された。

### タンパク定量

グリコサミノグリカン(GAG) 定量では、移植4週以降、b-FGF 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  以上徐放した群で、b-FGF 非投与群に比べ、有意に高値であった。また、b-FGF 10  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  以上投与すると11週齢マウスの耳介軟骨と同等あるいはそれ以上の GAG 量となった。2型コラーゲン定量では、移植6週後、b-FGF 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  以上の投与群は、非投与群より有意に高く、11週齢マウス耳介軟骨よりも高値を呈した。

### DNA 定量

再生組織 1mg あたりの DNA 量は、移植2週後、徐放性 b-FGF 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  以上の群で、非投与群に比べ、有意に高値であった。移植4,6週後、再生組織 1mg あたりの DNA 量は b-FGF 非投与群が最も高く、b-FGF を徐放した群でもほぼ同等の DNA 量であった。

### F4/80 免疫組織化学的染色

マクロファージのマーカーである F4/80 免疫組織化学的染色においては、徐放性 b-FGF の増量によって、再生組織内への F4/80 染色陰性細胞数の増加を認めたが、同様に F4/80 染色陽性細胞数も増加していた。移植2,4,6週で、同様の細胞数の変化を認めた。

## 【考 察】

本研究で、マウス耳介軟骨組織の単離増殖細胞において、ゼラチン/ $\beta$ -TCP 複合体足場を用いて軟骨再生を確認した。徐放性 b-FGF 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  以上の投与によって、移植 4 週で再生軟骨が形成可能であった。このシステムにおいて、徐放性 b-FGF の量によって、再生組織内の細胞数と軟骨の基質産生量はコントロールされていた。さらに、徐放性 b-FGF 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  の投与では、もとの足場の大きさとほぼ同等の再生組織が得られ、徐放性 b-FGF 500  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  以上の投与では再生組織が足場以上に増大していた。また、徐放性 b-FGF の投与によって、再生組織内の細胞数は増加するが、マクロファージも同様に増加することが確認された。

ゼラチンスポンジの足場は、軟骨再生にとって有用であると報告されている。生体分解性であり、 $\beta$ -TCP を付与して力学的強度を強化して、足場材料として用いた。今回、マウス耳介の弾性軟骨細胞による同系移植においても同様に、25% $\beta$ -TCP 付与によるゼラチン多孔体の足場で軟骨再生が確認された。

軟骨基質産生量(GAG,2型コラーゲン)においては、移植 4 週以降、b-FGF 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  以上の徐放群で有意差を認めた。これは b-FGF 刺激による、軟骨細胞 1 細胞あたりの細胞外マトリックス産生量の増加によるものと考えられる。ゼラチンによる b-FGF 徐放システムが、効果的に軟骨細胞に作用しており、b-FGF の投与量に依存して、効果が発現していた。

磯貝らは、軟骨再生にとって徐放化させた b-FGF の投与が有用であることを、最初に報告した。本研究では、軟骨再生が確認された b-FGF 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  以上の徐放群において、移植 2 週の際に DNA 量が有意に増加していたことから、軟骨再生においては初期の 2 週間以内に軟骨細胞を増殖させることが重要である可能性がある。再生過程においては、生体内でも高密度培養環境が構築されていると考えられた。その後は、移植 4 週以降において、細胞密度は有意差がなくなることから、移植初期の細胞数の増加が最も重要であることが示唆された。

徐放性 b-FGF の投与によって、再生組織内にマクロファージのマーカーである F4/80 の免疫組織化学的染色で、陽性細胞の増加を認めた。マクロファージには、軟骨形成に抑制的な  $M_1$  マクロファージと形成に有効な  $M_2$  マクロファージがあるとされているが、今回の検討では  $M_1$  と  $M_2$  の鑑別は行っていない。少なくとも b-FGF 投与によるマクロファージの遊走数の増加は、必ずしも軟骨再生に不利には働かず、有効であったと推測される。

徐放システムを用いて設計した足場と同等の大きさの再生軟骨を得るためには、b-FGF 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  の徐放投与が適正量であると考えられた。徐放性 b-FGF の過剰投与は、再生軟骨形状のコントロールが困難となり、移植部位の目的に合わせて足場を造形し臨床に用いる上で、支障を来たす可能性がある。加えて b-FGF 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  以上の投与群間で軟骨基質産生量には有意差を認めていない。

以上より、本実験系において、b-FGF の徐放化至適量は 100  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$  が適当であると考えられた。本研究は、再生気管軟骨を用いた小児気道疾患治療の臨床応用、そして今後の再生医療の発展に寄与するものと考えられる。