

学 位 論 文 題 名

Feasibility of Chitosan-based Hyaluronic Acid Hybrid Biomaterial for a Novel Scaffold in Cartilage Tissue Engineering

(キトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維より作製した
新規培養基材の軟骨組織再生における有用性の検討)

学位論文内容の要旨

関節表面に存在する硝子軟骨は、自己修復能力に乏しく、一度損傷されると瘢痕や線維軟骨様組織に置換されると考えられている。それらの組織は、機械的特性などが正常軟骨とは異なり、その結果損傷関節は変形性関節症をきたすこともある。それらの治療のために自家軟骨細胞培養移植が近年試みられている。軟骨細胞を培養する際、その足場(scaffold)となる培養基材は重要な要素のひとつである。従来 scaffold としてポリ乳酸化合物、コラーゲンなどを用いた scaffold が使われてきたが、それらには細胞接着性が低い、生物学的活性が乏しい、機械的強度が不足しているなどの欠点があった。それらの欠点を補うために、近年組織再生分野でも用いられるようになってきた塩基性高分子のキトサンを繊維状に成形し、さらに生物学的活性を与えるため軟骨細胞に有益な効果が報告され、また軟骨細胞外基質の成分でもある酸性高分子のヒアルロン酸を合成し、新たな培養基材を作製した。本研究の目的はキトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維の軟骨細胞培養における有用性を *in vitro* で評価することである。

【対象と方法】ハイブリッド繊維は湿式紡糸法にて作製し、合成するヒアルロン酸の濃度によってキトサン繊維のみ（以下単独群）、キトサン繊維に 0.04%、0.07%のヒアルロン酸を合成した群（以下 HA0.04%群、HA0.07%群）の 3 群をとした。繊維よりシート状の細胞培養用の基材を作製し、軟骨細胞を 3 次元培養した。評価項目は、繊維に対する細胞接着性、細胞増殖性、基質産生能、組織学的評価、免疫組織学的評価などについて以下の方法で調査検討した。

【結果】細胞接着性は HA0.07%群で有意に高い値であった。細胞増殖性は DNA 定量で評価したが培養 1 週の時点で HA0.07%群が他の 2 群に比較し有意に高値を示した。また組織評価において、軟骨細胞は脱分化することなく球形を維持し、周囲に細胞外基質を産生しながら増殖していることが確認された。ついで、培養後 2 週の検体で I 型 II 型コラーゲン、アグリカンの mRNA 発現を半定量化し比較した。3 群すべてにおいて II 型コラーゲンの mRNA の発現を認め Normalized ratio to GAPDH(N.R.)は単独群、 1.51 ± 0.16 ；HA0.04%群、 1.59 ± 0.16 ；HA0.07%群、 1.37 ± 0.26 で各群間に有意差はなかった。

I型コラーゲンの発現はわずかであり、各群間で有意差はなかった。アグリカンは単独群では mRNA の発現を認めず、ハイブリッド群でのみ発現を認め、N.R.は HA0.04%群: 1.07 ± 0.37 、HA0.07%群: 1.59 ± 0.20 であり、統計学的に有意差を認めた ($p=0.02$)。組織学的には繊維の周囲に細胞外マトリックスと結節状に増殖した細胞が観察され、II型コラーゲン抗体を用いた免疫染色では組織が染色されるのを認めた。電顕所見においても軟骨細胞は特有の細胞形態を維持し、周囲に多量のII型コラーゲン様組織が観察された。以上の結果から、いずれの群においても良好な細胞増殖と基質産生を認めたが、高濃度でヒアルロン酸を合成した HA0.07%群で細胞接着性、細胞増殖性、アグリカンの mRNA 発現が有意に亢進していた。

【考察】キトサンはアミノ基 (NH_3^+) をもちプラスに荷電しており、細胞との接着に有利である。また、ヒアルロン酸などの酸性高分子（マイナス荷電）とはポリイオンコンプレックスを形成し、化学的に安定した状態となる。それ以外にも、成形が容易であること、生体親和性に優れること、生体吸収性であることなど scaffold material として必要な要素に富んでいる。

我々の研究結果より、キトサンから作成した繊維状の material は、優れた細胞接着性を有し、そこにヒアルロン酸を合成することにより、細胞接着性、細胞増殖性、基質産生能が亢進するなど有益な効果が得られた。ヒアルロン酸は軟骨における主要なグリコサミノグリカンであり、軟骨細胞にはそのレセプターである CD44 が表面蛋白として存在することが知られている。これらのことより、培養基材にヒアルロン酸を加えることは軟骨組織の環境を模倣するという点からも理にかなっており、結果的に有効であった。またハイブリッド繊維から作成した scaffold 上で三次元培養を行うことにより、軟骨細胞は脱分化することなく軟骨細胞としての形質を維持し、周囲に多量の細胞外基質を産生していた。その細胞外基質は硝子軟骨に特有のII型コラーゲンで構成されていた。さらに、本 material は繊維状であることから様々な形に成形が可能で、関節表面などの機械的な負荷がかかる部分に移植する際にも、骨膜などで覆うことなく欠損部に固着することも可能である。この点は、従来のスポンジ状、ゲル状の material には無い優れた点であり、さらには靱帯、腱組織の再生などにも応用が可能であると考えている。

今回の研究では繊維状のキトサンを三次元構造に成形し軟骨細胞培養をすることによって、良好な細胞増殖と細胞外マトリックス産生が観察された。さらに、ヒアルロン酸を繊維に加えハイブリッド化することによって、軟骨細胞培養に対しより有益な効果があることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安 田 和 則

副 査 教 授 清 水 宏

副 査 教 授 三 浪 明 男

学 位 論 文 題 名

Feasibility of Chitosan-based Hyaluronic Acid Hybrid Biomaterial for a Novel Scaffold in Cartilage Tissue Engineering

(キトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維より作製した
新規培養基材の軟骨組織再生における有用性の検討)

関節表面に存在する硝子軟骨は、自己修復能力に乏しく、一度損傷されると瘢痕や線維軟骨様組織に置換されると考えられている。それらの組織は、機械的特性などが正常軟骨とは異なり、その結果損傷関節は変形性関節症をきたすこともある。それらの治療のために自家軟骨細胞培養移植が近年試みられている。軟骨細胞を培養する際、その足場(scaffold)となる培養基材は重要な要素のひとつである。従来 scaffold としてポリ乳酸化合物、コラーゲンなどを用いた scaffold が使われてきたが、それらには細胞接着性が低い、生物学的活性が乏しい、機械的強度が不足しているなどの欠点があった。本研究では、それらの欠点を補うために、近年組織再生分野でも用いられるようになってきた塩基性高分子のキトサンを繊維状に成形し、さらに軟骨細胞外基質の成分でもある酸性高分子のヒアルロン酸を合成した新たな培養基材を作製し軟骨細胞培養における有用性を *in vitro* で評価した。ハイブリッド繊維は合成するヒアルロン酸の濃度によってキトサン繊維のみ（以下単独群）、キトサン繊維に 0.04%、0.07%のヒアルロン酸を合成した群（以下 HA0.04%群、HA0.07%群）の3群をとした。繊維よりシート状の細胞培養用の基材を作製し、軟骨細胞を3次元培養した。いずれの scaffold においても軟骨組織再生が確認されたが、3群の比較検討において細胞接着性は HA0.07%群で有意に高く、細胞増殖性は HA0.07%群が他の2群に比較し有意に高値を示した。また組織評価において、軟骨細胞は脱分化することなく球形を維持し、周囲に細胞外基質を産生しながら増殖していることが確認された。ついで、I型II型コラーゲン、アグリカンの mRNA の発現を RT-PCR により比較したところ、3群すべてにおいてII型コラーゲンの発現を認め各群間に有意差はなかった。I型コラーゲンの発現はわずかであり、各群間で有意差はなかった。アグリカンは単独群では mRNA の発現を認めず、ハイブリッド群でのみ発現を認め、N.R.は HA0.04%群：1.07±0.37、HA0.07%群：1.59±0.20 であり、統計学的に有意差を認めた ($p=0.02$)。組織学的

には繊維の周囲に細胞外マトリックスと結節状に増殖した細胞が観察され、Ⅱ型コラーゲン抗体を用いた免疫染色では組織が染色されるのを認めた。電顕所見においても軟骨細胞は特有の細胞形態を維持し、周囲に多量のⅡ型コラーゲン様組織が観察された。以上の結果から、いずれの群においても良好な細胞増殖と基質産生を認めたが、高濃度でヒアルロン酸を合成した HA0.07%群で細胞接着性、細胞増殖性、アグリカンの mRNA 発現が有意に亢進していた。

今回の研究結果より、繊維状のキトサンを三次元構造に成形し軟骨細胞培養をすることによって、良好な細胞増殖と細胞外マトリックス産生が観察された。さらに、ヒアルロン酸を繊維に加えハイブリッド化することによって、軟骨細胞培養に対しより有益な効果があることが示唆された。

審査にあたり、副査清水宏教授より、産生される細胞外基質の性質は、培養環境によるところが大きいのか、それとも細胞特性によるところが大きいのか、また、臨床応用を考えた場合どのような病態が対象となるかということについての質問があった。次いで主査安田和則教授より、合成するヒアルロン酸の濃度が高いと繊維の直径も変化するのか、キトサンにヒアルロン酸を加えたとき、細胞はどの部位に接着するのかということについての質問があった。最後に副査三浪明男教授から臨床的見地より、現在行われている自家軟骨細胞培養移植における再生部位の線維化、骨化などの問題点をどのようにしたら解消できると考えているかという質問があり、申請者はこれらの質問に対して今回行った実験の結果と過去の文献、申請者自身の今後の実験計画から適切に回答した。

この論文は、新規に作成した繊維状の scaffold を関節軟骨の再生に応用するという独創的な研究であり、軟骨損傷に対する臨床応用が期待される。今後再生する組織にあった様々な生物学的活性や形態の scaffold を作ることが可能であるなど将来の発展性もあると考えられる。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院博士課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。