

学位論文題名

Development of mature cartilage constructs using novel three-dimensional porous scaffolds for enhanced repair of osteochondral defects

(キトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維を用いて作製した成熟軟骨様組織の家兎膝関節骨軟骨欠損修復への応用)

学位論文内容の要旨

関節軟骨は自己修復能力に乏しく、特に広範囲欠損においては硝子軟骨での修復は期待できない。これまでの drilling や microfracture といった方法では繊維軟骨での修復しか得られないのに対し、組織工学的手法を用いた関節軟骨欠損に対する治療は関節軟骨本来の硝子軟骨での修復が期待される方法である。しかし最近の prospective な臨床研究において、従来の方法と比べその臨床成績は変わらないという報告も散見される。

Tissue engineering の triad として、細胞や成長因子とともに細胞の足場となる scaffold の重要性が唱えられている。特に軟骨再生に用いる scaffold にはその力学的強度と軟骨細胞の形質を保持する生物学的特性も要求される。軟骨再生に用いる scaffold に関する報告は数多くあるが、この 2 点を満たす scaffold は少ない。我々は scaffold に着目し、共同研究者の山根らは天然高分子の一つであるキトサンに、関節軟骨の主要な構成体の一つであり、様々な生理機能を有するヒアルロン酸を導入した繊維から独自の 3 次元 scaffold を開発した。繊維を直交する様に編み込み 1 枚のシートを作製し、さらにそのシートを 6 枚重ねることで作製した 3 次元 scaffold は軟骨細胞の接着性や増殖性、軟骨性プロテオグリカンであるアグリカンの産生に優れていた。

この scaffold の臨床応用を考慮すると、炎症反応や分解過程での力学的強度減少を抑えることが重要であると考えた。scaffold の volume を抑えながらも十分な力学的強度を持つ成熟軟骨様組織を作製することがその鍵となると考えた。本研究の目的は、1) キトサンヒアルロン酸ハイブリッド繊維から volume を抑えた scaffold を作成すること、2) in vitro で作製した軟骨様組織を生化学的・組織学的・力学的に評価すること、3) この成熟軟骨様組織を家兎の骨軟骨欠損部に移植し、再生組織を評価することである。

軟骨形成に適した  $400\mu\text{m}$  の pore size をもつシートと繊維から 2 種類の scaffold を作製した。一つは 2 層のシートとその内部を充填している繊維からなる Cushion 状の  $8\text{mm}$  四方の scaffold である。もう一方は 1 枚のシートを円筒状に丸め内部を繊維で充填した直径  $6\text{mm}$ 、高さ  $10\text{mm}$  の Cylinder 状の scaffold である。これらの scaffold は繊維の volume を最小限にしながらも動的培養環境に耐えうる力学的強度を保っている。8 週齢の日本白色家兎より酵素処理により単離した軟骨細胞を 1 基材あたり Cushion 状の scaffold には  $3 \times 10^5$  個、Cylinder 状の scaffold には  $7 \times 10^5$  個播種し 1 週間静置培養した。無重力環境を

模倣したバイオリクターに移しさらに4ないし7週培養した。これらの scaffold から作製された軟骨様組織の生化学的評価として、培養後5週および8週の軟骨様組織の湿重量、DNA量、蛋白量をそれぞれ測定し、組織学的評価として培養後8週の軟骨様組織のHEならびにサフラニンO染色を、免疫組織化学的評価として抗I、II、X型コラーゲン染色を、力学的評価として弾性係数を求めた。

動物モデルとして、約20週齢の日本白色家兎21羽42膝を使用した。関節切開し大腿骨滑車部に電動ドリルを用いて直径5mm、深さ2mmの骨軟骨欠損を作成した。7羽は特に処置せず欠損放置群とした。生体外で8週培養した2種類の scaffold からできた軟骨様組織を欠損部の大きさに合わせてトリミングし、同部位にプレスフィットに移植した各7羽を移植群とした。術後12週で屠殺し、片方を肉眼的・組織学的評価に、もう片方を力学的評価に使用した。Wayneらの評価法を使用し再生組織の肉眼的・組織学的評価を行い、さらに再生組織の免疫組織化学的評価として抗I、II、X型コラーゲン染色を、力学的評価として弾性係数を求めた。

いずれの scaffold も湿重量、DNA量、蛋白量、弾性係数のいずれも培養期間5週から8週にかけて有意に増加したが、8週のCushion状の scaffold の弾性係数がCylinder状の scaffold に比べ優位に増加していた以外には両群間には有意差が見られなかった。組織学的にはいずれの scaffold も全体に均一な軟骨様組織が分布し、サフラニンO染色で異染性を示し、II型コラーゲン優位の基質の産生からも、良好な軟骨様組織の構築が示唆された。

肉眼所見のスコアは両移植群と欠損放置群の間に有意差はなかったが、組織学所見のスコアは両移植群が欠損放置群に比べ有意に高値であった。また、移植群の再生組織の弾性係数は正常関節軟骨とほぼ同等であった。代表的な組織学所見として、欠損放置群の再生組織表面は不整で一部に軟骨様組織も認めるもほとんどが繊維軟骨であり、サフラニンO染色でも異染性を示さなかった。一方移植群では表面はほぼ平滑で、再生組織の大部分を硝子軟骨様組織が占め、サフラニンO染色でも隣接する正常軟骨と同等の異染性を示した。免疫染色でも、移植群の再生組織は抗I型コラーゲン抗体に陰性、抗II型コラーゲン抗体に強陽性な硝子軟骨様組織であった。

当初6層のシートからなっていた我々独自の scaffold を、軟骨分化に最適な形状でvolumeを抑えた scaffold へ改良した。新規の scaffold は8週間の動的培養環境に耐えうる強度を持ちながら、軟骨細胞の増殖や豊富なグリコサミノグリカンやII型コラーゲンといった軟骨基質の産生に優れ、十分な力学的強度を獲得しており、正常硝子軟骨と同等の軟骨様組織を作製可能であった。過度にストレスのかかる軟骨欠損部への移植に際し力学的強度に優れた軟骨様組織を移植することが重要という仮説は、欠損放置群に比べ移植群において骨軟骨欠損の修復を促進する結果により証明された。また、力学的強度に優れた軟骨様組織は取り扱いが容易でプレスフィットに移植することが可能であり、培養軟骨細胞移植術などの従来の治療法で必要とされる骨膜での被覆を必要としない。さらにCushion状の scaffold は広範囲の軟骨欠損への応用が考えられ、cylinder状の scaffold はmosaicplastyの代替治療としての可能性ももつなど、容易に形状を変更できることもこの scaffold の利点の一つである。

臨床応用に向けた今後の展望として、成長因子などの使用で培養期間の短縮を図ること、大動物での実験やさらに長期間の経過観察を要することが課題として考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安 田 和 則  
副 査 教 授 三 浪 明 男  
副 査 教 授 山 本 有 平

学 位 論 文 題 名

## Development of mature cartilage constructs using novel three-dimensional porous scaffolds for enhanced repair of osteochondral defects

(キトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維を用いて作製した成熟軟骨様組織の家兎膝関節骨軟骨欠損修復への応用)

天然高分子の一つであるキトサンに、関節軟骨の主要な構成体の一つであり、様々な生理機能を有するヒアルロン酸を導入した繊維から独自の3次元 scaffold を開発し、*in vitro* での有用性を報告してきた。この scaffold の臨床応用を考慮すると、炎症反応や分解過程での力学的強度減少を抑えることが重要であり、scaffold の volume を抑えながらも十分な力学的強度を持つ成熟軟骨様組織を作製することがその鍵となると考えた。本研究において、1) キトサンヒアルロン酸ハイブリッド繊維から volume を抑えた scaffold を作製し、2) *in vitro* で作製した軟骨様組織を生化学的・組織学的・力学的に評価し、3) この成熟軟骨様組織を家兎の骨軟骨欠損部に移植し、再生組織を評価した。当初6層のシートからなっていた我々独自の scaffold を、軟骨分化に最適な形状で volume を抑えた scaffold へ改良した。新規の scaffold は8週間の動的培養環境に耐えうる強度を持ちながら、軟骨細胞の増殖や豊富なグリコサミノグリカンやII型コラーゲンといった軟骨基質の産生に優れ、十分な力学的強度を獲得しており、正常硝子軟骨と同等の軟骨様組織を作製可能であった。過度にストレスのかかる軟骨欠損部への移植に際し力学的強度に優れた軟骨様組織を移植することが重要という仮説は、欠損放置群に比べ移植群において骨軟骨欠損の修復を促進する結果により証明された。また、力学的強度に優れた軟骨様組織は取り扱いが容易でプレスフィットに移植することが可能であり、培養軟骨細胞移植術などの従来の治療法で必要とされる骨膜での被覆を必要としない。さらに Cushion 状の scaffold は広範囲の軟骨欠損への応用が考えられ、cylinder 状の scaffold は mosaicplasty の代替治療としての可能性ももつなど、容易に形状を変更できることもこの scaffold の利点の一つである。臨床応用に向けた今後の展望として、成長因子などの使用で培養期間の短縮を図ること、大動物での実験やさらに長期間の経過観察を要することが課題として考えられた。

審査に当たり、山本教授から、scaffold の形状を cushion 状・cylinder 状にした理由と臨床応用とその形状の関係について、弾性係数が 2 つの scaffold で大きく違った理由について、硝子軟骨様組織作製の成功の鍵は scaffold にあったか・サイトカイン等の特別なものは使用したかについて、弾性軟骨への応用は可能かについて質問があった。安田教授からは、バイオリアクターの選択に際し無重力環境を模倣したものを選んだ理由について、他のメカニカルストレスを選択しなかった理由について、力学試験の結果で in vitro での値が in vivo で減少する原因について、力学試験の詳細について、長期経過により移植部で骨化が進行しないかについての質問があった。三浪教授からは、サイトカイン等を使用し培養期間の短縮を図る考えはないかについて、成熟様軟骨組織の移植により骨化の問題が起きる可能性があり未成熟な細胞や組織の移植を考慮するかについての質問があり、これらの質問に対し今回行った実験結果と過去の文献を引用し、適切に回答した。

この論文は、組織工学的手法を用いた軟骨再生においてマテリアルの量を減量しながらも長期の培養環境に耐える scaffold から成熟軟骨様組織ができること、移植に際しこの成熟組織が再生組織の修復に重要であることが示唆され、今後の軟骨再生において重要な情報を提供できる可能性があると考えられた。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院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。