

学 位 論 文 題 名

新しい高機能ゲルを用いた軟骨自然再生誘導法の開発

～家兎および羊を用いた基礎的研究～

学位論文内容の要旨

【背景と目的】これまでの医学においては、関節軟骨(硝子軟骨)組織が *in vivo* で自然再生することはないと考えられてきた。したがって、限局した関節軟骨欠損に対しては自家骨軟骨移植術や培養自家軟骨細胞移植術などが行われている。しかしながら、これらの治療法には長期耐久性、採取部位の障害、大きな手術侵襲などの欠点が存在する。関節軟骨は本当に自然再生しないのであろうか? この常識に対する疑問に正面から取り組んだ研究は、これまでまったくなかった。我々は外傷性骨軟骨欠損部基底部に理想的な性質を持つ材料を埋植することにより、血餅中の間葉系細胞を線維軟骨細胞ではなく硝子軟骨細胞に分化させることが出来る可能性があると考えた。そして我々の研究グループが独自に開発した Bioactive な生体材料、PAMPS/PDMAAm ダブルネットワーク (DN) ハイドロゲルに着目した。これまでの研究で、兎の膝蓋大腿関節大腿骨滑車部に作成した広範囲骨軟骨欠損の基底部に、深さ 1-3mm の欠損が残るように PAMPS/PDMAAm DN ゲルを埋め込むと、術後 4 週でこの欠損部に硝子軟骨が *in vivo* で自然再生することが解かっている。しかし、これまでの研究で使用したモデルにおける骨軟骨欠損の部位は、臨床における主たる病変部位である、大腿脛骨関節における大腿骨顆部とは異なっている。この部位の硝子軟骨自然再生を PAMPS/PDMAAm DN ゲル埋植によって誘導できるのか、また出来るならばどの程度の深さの埋植が最も有効なのか、などに関する研究は、これまで行われていない。さらに家兎を用いた研究における PAMPS/PDMAAm DN ゲル埋植による硝子軟骨自然再生誘導効果が、人間に近い大動物モデルにおいても同様に得られるか? という問題に対する解答も得られていない。

そこで企画された本研究の第一の目的は、家兎大腿脛骨関節の大腿骨顆部における広範囲骨軟骨欠損に対する PAMPS/PDMAAm DN ゲルを用いた硝子軟骨自然再生誘導効果を明らかにすることであり、第二の目的は、上述の PAMPS/PDMAAm DN ゲルによる硝子軟骨自然再生誘導効果は、人間に近い羊モデルにおいても家兎モデルと同様に認められるか否かを明らかにすることである。

【材料と方法】(1) PAMPS/PDMAAm DN ゲルの合成 PAMPS/PDMAAm DN ゲルの合成は、2 段階のラジカル重合により行った。硫酸基を有する PAMPS が架橋結合されたポリマーネットワークと、中性の PDMAAm が架橋結合されたポリマーネットワークを重合させることにより作成した。平衡状態での PAMPS/PDMAAm DN ゲルの含水量は 94.0wt%、初期弾性率は 0.2MPa、破断応力は 3.1 MPa、であった。作成した PAMPS/PDMAAm DN ゲルから以下の実験における骨軟骨欠損に適した円柱プラグを作成した。

(2) 研究 1: 家兎大腿脛骨関節大腿骨顆部に作製した広範囲骨軟骨欠損に対する PAMPS/PDMAAm DN ゲルを用いた硝子軟骨自然再生誘導効果の解明 実験動物には、雌ニュージーランド白色家兎 25 羽を用いた。25 羽のうち 21 羽を 3 つのグループ (Group I~III)

に分け、各グループ7羽での検討を行った。右膝には大腿骨内顆荷重部中央に関節面に垂直に直径2.4mmの骨軟骨欠損を作成した。予め作成していた直径2.7mmのDNゲルを、関節軟骨表面から移植したDNゲル表面まで、深さ1.5mm(Group I)、2.5mm(Group II)、3.5mm(Group III)の間隙ができるように移植した。左膝は右膝と同じ深さの骨軟骨欠損を作成後に特別な処置を一切行わないコントロール群とした。術後4週で安楽死させ、21羽全てを組織学的および免疫組織学的評価に供した。さらにこの結果に基づき、残り4羽を用いて、各グループの中で最も良好な軟骨再生が得られたGroup IIの欠損部に再生した組織を採取し、リアルタイムPCRで評価することとした。右膝はGroup IIと同様の処置を施し、左膝は右膝と同じ深さの骨軟骨欠損を作成後に特別な処置を一切行わないコントロール群とした。術後4週で安楽死させ、再生組織の細胞におけるII型コラーゲン、アグリカン、Sox9 mRNAの発現に関してリアルタイムPCRで定量化した。

(3) 研究2: 羊モデルにおけるPAMPS/PDMAAm DNゲルを用いた硝子軟骨自然再生誘導効果の解明 実験動物には、雌成熟羊サフォーク種17頭を用いた。17頭のうち15頭を3つのグループ(Group I~III)に分け、各グループ5頭での検討を行った。右膝のドリルを用いて、大腿骨滑車部中央および大腿骨内顆荷重部中央に関節面に垂直に直径6.0mmの骨軟骨欠損をそれぞれ作成した。予め作成していた直径6.5mmのDNゲルを、関節軟骨表面から移植したDNゲル表面まで深さ2.0mm(Group I)、3.0mm(Group II)、4.0mm(Group III)の間隙ができるように移植した。左膝は骨軟骨欠損を作成後に特別な処置を一切行わないコントロール群とした。全ての羊は術後12週で安楽死させ、組織学的および免疫組織学的評価に供した。さらにこの結果に基づき、残り2頭を用いて、各グループの中で最も良好な軟骨再生が得られたGroup IIの欠損部に再生した組織をリアルタイムPCRで評価することとした。右膝はGroup IIと同様の処置を施し、左膝は右膝と同じ深さの骨軟骨欠損を作成後に特別な処置を一切行わないコントロール群とした。術後12週で安楽死させ、再生組織の細胞におけるII型コラーゲン、アグリカン、Sox9 mRNAの発現に関してリアルタイムPCRで定量化した。

【結果】研究1 肉眼的にはGroup IIにおいて骨軟骨欠損部に良好な再生組織が確認された。組織学的にもGroup IIではサフラニン-Oで染色される軟骨組織が確認された。その他の群では肉眼的、組織学的に硝子軟骨の再生は不良であった。Wayneらによる評価法ではGroup IIが他の群に比べて有意に高値を示した。リアルタイムPCRによるII型コラーゲン、アグリカン、Sox9 mRNAのそれぞれ相対的発現量はGroup IIがコントロール群と比較して有意に高値であった。

研究2 肉眼的にはGroup IIにおいて骨軟骨欠損部に良好な再生組織が確認された。組織学的にもGroup IIではサフラニン-Oで染色される軟骨組織が確認された。その他の群では肉眼的、組織学的に硝子軟骨の再生は不良であった。Wayneらによる評価法ではGroup IIが他の群に比べて有意に高値を示した。リアルタイムPCRによるII型コラーゲン、アグリカン、Sox9 mRNAのそれぞれ相対的発現量はGroup IIがコントロール群と比較して高値となる傾向にあった。

【考察】本研究の結果、家兎モデルにおいて大腿骨顆部の骨軟骨欠損部にDNゲルを埋植する事により硝子軟骨自然再生が誘導された。この結果、DNゲルによる硝子軟骨自然再生誘導効果は、非荷重部だけではなく荷重部でも有効であることを示唆した。またDNゲルの埋植深さが硝子軟骨自然再生誘導効果に影響を及ぼすことを示唆した。これは大動物である羊でも同様であることがわかった。今後は再生された硝子軟骨の長期耐久性や、DNゲル埋植による軟骨自然再生誘導効果の総合的なメカニズムの解明が急務である。

【結論】家兎モデルの大腿骨顆部及び、大動物である羊の大腿骨滑車部や大腿骨顆部にDNゲルを埋植する事により硝子軟骨自然再生が誘導された。DNゲルを骨軟骨欠損部に埋植することによる関節軟骨自然再生戦略が、軟骨再生治療のための次世代戦略として有用である可能性を示唆した。

学位論文審査の要旨

主査	教授	鐙	邦	芳	
副査	准教授	飛	驒	一	利
副査	教授	安	田	和	則
副査	准教授	遠	山	晴	一
副査	教授	三	浪	明	男

学位論文題名

新しい高機能ゲルを用いた軟骨自然再生誘導法の開発

～家兎および羊を用いた基礎的研究～

これまでの医学においては関節（硝子）軟骨が *in vivo* で自然再生することはないと考えられてきた。しかし申請者の研究指導者は、PAMPS/PDMAAm ダブルネットワーク (DN) ハイドロゲルを家兎膝蓋大腿関節の骨軟骨欠損部基底部に埋植すると、その欠損部に硝子軟骨が自然再生することを発見した。そこで申請者が行った本研究の第一の目的は、PAMPS/PDMAAm DN ゲルを用いた硝子軟骨自然再生誘導が、臨床における主たる治療対象部位である大腿脛骨関節の広範囲骨軟骨欠損においても起きるか否かを明らかにすることであり、第二の目的は、PAMPS/PDMAAm DN ゲルを用いた硝子軟骨自然再生誘導が、大動物（羊）モデルにおいても起きるか否かを明らかにすることであった。第一の実験には、雌ニュージーランド白色家兎 25 羽が用いられた。申請者は右膝の大腿骨内顆荷重部中央関節面に直径 2.4mm の骨軟骨欠損を作成し、直径 2.7mm の DN ゲルを関節軟骨表面から深さ 1.5mm、2.5mm、3.5mm の欠損が残るように移植した。左膝は右膝と同じ深さの骨軟骨欠損を作成後に特別な処置を一切行わないコントロール群とした。術後 4 週で安楽死させ、組織学的（HE 染色、サフラニン O 染色）および免疫組織学的（2 型コラーゲン）評価、リアルタイム PCR による軟骨マーカー遺伝子発現（2 型コラーゲン、アグリカン、SOX9）評価を行った。第二の実験には雌成熟羊サフォーク種 17 頭が用いられた。申請者は右膝の大腿骨滑車部中央および大腿骨内顆荷重部中央関節面に、直径 6.0mm の骨軟骨欠損をそれぞれ作成し、直径 6.5mm の DN ゲルを関節軟骨表面から深さ 2.0mm、3.0mm、4.0mm の欠損が残るように移植した。左膝は骨軟骨欠損を作成後に特別な処置を一切行わないコントロール群とした。全ての羊は術後 12 週で安楽死させ、第一の実験と同様の組織学的および免疫組織学的評価、リアルタイム PCR による評価を行った。その結果、第一の実験では 2.5mm の欠損が残るように移植した群で、いずれの評価においても硝子軟骨再生が有意に良好であった。この結果は、PAMPS/PDMAAm DN ゲルを用いた硝子軟骨自然再生誘導が、家兎大腿脛骨関節の軟骨欠損においても起き得ることを示した。第二の実験では、大腿骨滑車部及び顆部のどちらにおいても、3mm の欠損が残るように移植した群の硝子軟骨再生が、いずれの評価においても有意に良好であった。この結果は、PAMPS/PDMAAm DN ゲルを用いた硝子軟骨自然再生誘導が、大動

物（羊）モデルにおいても起き得ることを示し、また再生がゲルの埋植位置の影響を受けることを示した。本研究全体を通して、DN ゲルを骨軟骨欠損部に埋植することによる関節軟骨自然再生戦略が軟骨再生治療のための次世代戦略として有用である可能性が示された。

口頭発表の後、副査の飛驒准教授から、DN ゲル埋植深さの設定根拠、および再生された軟骨の長期予後、等について質問があった。次に副査の遠山准教授から、培養軟骨細胞移植における細胞の癌化の問題、2 型コラーゲン免疫染色の詳細、等について質問があった。次に副査の三浪教授から DN ゲルの材料特性の詳細、安全性に関する実験の詳細、等について質問があった。次に副査の安田教授から、DN ゲルの各コンポーネントゲルの安全性に関する特性と臨床応用の実態、等について質問があった。最後に主査鑑が、再生した軟骨組織の生体力学特性および摩擦特性の評価、等について質問した。いずれの質問に対しても申請者は、自己の研究結果と文献的考察に基づいて概ね妥当な回答を行った。

本研究は PAMPS/PDMAAm DN ゲルを用いた関節軟骨自然再生誘導が関節内部位および種を越えて起こり得る普遍的現象であることを明らかにし、今後の軟骨再生医療において DN ゲルを用いた関節軟骨自然再生戦略が次世代戦略として有用である可能性を示した。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者は博士(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。