

## 学位論文題名

## In vivo effects of isolated implantation of salmon-derived crosslinked atelocollagen sponge into an osteochondral defect

(鮭由来アテロコラーゲンスポンジの充填が関節骨軟骨欠損に与えるin vivo効果)

## 学位論文内容の要旨

## 【背景と目的】

整形外科領域において、関節軟骨の磨耗や損傷は関節痛を惹起し、広範囲の損傷は変形性関節症の原因となる。関節(硝子)軟骨は自己修復能に乏しく、再生することはない。したがって関節軟骨欠損に対する現在の先端治療戦略として、正常な軟骨を病変部に移植する骨軟骨移植術や、軟骨細胞あるいは幹細胞移植を用いた組織工学的再生軟骨移植がおこなわれている。後者の戦略には scaffold が重要な役割を果たしており、アテロコラーゲンは代表的な scaffold である。アテロコラーゲンは優れた対細胞特性、低い抗原性、高い生体内分解性を有し、有用な医療材料である。しかし、その由来は牛や豚などの家畜の骨や皮膚であり、BSE、手足口病などの人獣共通感染症のリスクを含む点が、大きな問題として認識されている。そこで近年、ヒトへの伝染性疾患がないとされる魚類由来アテロコラーゲンがその代用として注目されている。我々の研究グループは、鮭皮由来アテロコラーゲン分子間に架橋を施す独自の技術を開発し、19℃であった変性温度を 47℃まで上げることに成功した。それにより、変性するために不可能とされていたヒトへの応用が原理的に可能となった。

我々は、これまでに報告した in vitro の研究を基礎として、以下の仮説を立てた。(1) 架橋を施した鮭皮由来アテロコラーゲンスポンジ(以下 CS)の家兎膝関節骨軟骨欠損部への充填は、豚由来 CS 充填との比較において、関節に有害な効果を与えない。(2) 鮭皮由来架橋 CS の充填は充填後 12 週で in vivo 軟骨再生を促進する。

本研究の目的は、これらの仮説を検証し、鮭皮由来架橋 CS の in vivo 軟骨再生における scaffold としての基礎的特性を評価することである。

## 【材料と方法】

## 1. 材料

鮭皮アテロコラーゲンは、ペプシン処理によってテロペプチドを除去し、抗原性を低下させた天然シロサケ皮由来のコラーゲンである。以下の方法でコラーゲン分子間に架橋を施した。凍結乾燥した鮭皮由来アテロコラーゲンに 0.5% HCl (pH 3) 100ml を加え、鮭皮由来アテロコラーゲン溶解液を作製するために 4℃で一晩混濁した。次に、鮭皮由来アテロコラーゲン溶解液 1ml を組織培養のためプレートに移し(アサヒテクノグラス 東京 日本)、その後、-70℃で 12 時間凍結した。凍結したプレートは 24 時間凍結乾燥機に入れ(FDU-830 東京理化学器械 東京 日本)、得られた通気性のある鮭皮アテロコラーゲンを、架橋剤である 1% EDC (1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)-carbodiimide, hydrochloride) 存在下、4M NaCl 溶解液に浸し(ドジンド 東京 日本)、24 時間 4℃でコラーゲン線維を再形成させ、線維化と架橋を同時に引き起こした。鮭皮由来架橋コラーゲン材料は水で洗浄した後、再び凍結乾燥することにより、鮭コラーゲンスポンジが作製された。架橋豚 CS は、豚コラーゲン(新田ゼラチン 大阪 日本)を購入し、上記と同様の方法で作製した。鮭皮由来架橋 CS、豚由来架橋 CS、豚由来非架橋 CS の 3 タイプのスポンジから、直径 4.5mm、高さ 3mm の円筒状ブロックを作製した。

## 2. 家兎膝関節骨軟骨欠損 CS 充填モデルの作製

実験動物として日本白色家兎 32 羽 (体重  $3.9 \pm 0.5$  kg) を使用した。手術は無菌下、および静脈麻酔下 (ペントバルビタール 25mg/kg) に行った。各動物の両膝蓋大腿関節の大腿骨側にドリルを用いて直径 4.3mm、深さ 3mm の骨軟骨欠損を作製し、各動物の両膝計 64 膝を無作為に 4 群 (各群 n=16) に分け、I 群では鮭皮由来架橋 CS を欠損部に充填した。II 群では豚由来架橋 CS を欠損部に充填した。III 群では豚由来非架橋 CS を欠損部に充填した。IV 群では欠損部に何も充填しなかった。術後は膝の固定を行わず、ゲージ内 (310×550×320mm) で活動制限を設けず飼育した。術後 4 週および 12 週で 16 羽ずつ屠殺し、各群 8 膝のうち 6 膝を肉眼的・組織学的評価に 2 膝を RT-PCR 評価に供した。

### 3. 肉眼的・組織学的評価

大腿骨顆部の再生組織部分を肉眼的・組織学的 (HE 染色、Safranin-O 染色、II 型コラーゲン免疫染色) に評価し、Wayne らの報告した評価スケールを用いて定量化した。

### 4. RT-PCR 評価

欠損部に再生した組織を採取し、リアルタイム PCR によって II 型コラーゲン、aggrecan、SOX9 の発現を定量的に評価した。RNA 抽出は RNeasy mini kit (Qiagen 社製) を使用して行い、RT-PCR は、SYBR Premix Ex Taq™ II (Takara Bio) および Thermal Cycler Dice TP800 (Takara Bio) を使用して行った。これらの結果は、Thermal Cycler Dice のソフトウェアを使用して評価し、GAPDH プライマーをデータの標準化に使用した。

### 5. 統計解析評価

各群間の比較には ANOVA を使い、post hoc multiple 比較には Fischer' PLSD test を用いた。有意水準は 5% とした。

## 【結果】

### 1. 肉眼的評価

いずれの膝においても、炎症・病的所見は認めなかった。術後 4 週では、各群とも欠損部は白色の線維性組織で満たされていた。術後 12 週では、I および II 群の欠損部は白色不透明な弾力のある組織で満たされており、III および IV 群の欠損部は赤色斑状の再生組織を認めた。Wayne score に関しては、12 週において I 群が IV 群より有意に高値であった ( $p=0.0051$ ) が、II 群、III 群は IV 群と比較して有意差は認めなかった。

### 2. 組織学的評価

4 週では、いずれの群においても欠損部は線維性組織で満たされていたが、I 群では少量の Proteoglycan を認めた。12 週では、I 群および II 群で Proteoglycan に富む組織を認め、そこでは II 型コラーゲンの発現も認めた。しかし、その組織の厚さは正常関節軟骨のおよそ半分程度であった。III 群および IV 群の欠損部は線維性および骨組織で満たされており、II 型コラーゲンの発現はほとんど認めなかった。Wayne score に関しては、12 週において I 群は III および IV 群より有意に高値 ( $p=0.0196$ ) であり、また II 群は IV 群より有意に高値 ( $p=0.0021$ ) であった。III 群と IV 群の間に有意差は認めなかった。

### 3. RT-PCR

リアルタイム PCR 分析において、有意差は認めなかったが、II 型コラーゲン、aggrecan、SOX9 の発現は、I 群および II 群が他群に比べて高い傾向が認められた。

## 【考察】

本研究は、家兎膝関節骨軟骨欠損部への鮭皮由来架橋 CS の充填が、豚由来架橋 CS および非架橋 CS の充填と同様に膝関節に免疫学的な有害な効果を与えないこと、および鮭皮由来架橋 CS の充填は、豚由来 CS と同様に 12 週で骨軟骨欠損部における硝子軟骨再生を促進することを明らかにした。

## 【結論】

鮭由来架橋コラーゲンは人獣共通感染症のリスクの回避、良好な軟骨再生誘導能、高い生体吸収性、および経済的生産性等の見地において有望な組織工学的軟骨再生用 Scaffold である。

# 学位論文審査の要旨

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

## 学位論文題名

### In vivo effects of isolated implantation of salmon-derived crosslinked atelocollagen sponge into an osteochondral defect

(鮭由来アテロコラーゲンスポンジの充填が関節骨軟骨欠損に与えるin vivo効果)

関節軟骨欠損に対する先端治療戦略として、軟骨細胞あるいは幹細胞移植を用いた組織工学的再生軟骨移植が研究されている。アテロコラーゲンはその代表的な scaffold である。しかし、その由来は牛や豚などの家畜の骨や皮膚であり、BSE、手足口病などの人獣共通感染症のリスクが大きな問題として認識されている。そこで申請者の研究グループは、ヒトへの伝染性疾患がない魚類由来コラーゲンに注目し、独自の架橋技術を開発して 19℃であった鮭皮由来アテロコラーゲンの変性温度を 47℃まで上げることに成功し、不可能とされていたヒトへの応用を原理的に可能とした。そこで申請者は、鮭由来架橋アテロコラーゲンスポンジ (以下 CS) の in vivo 軟骨再生における scaffold としての基礎的特性を評価する研究を行った。

シロサケ皮に由来する鮭アテロコラーゲン溶解液 1ml をプレートに移し、-70℃で 12 時間凍結した後、24 時間凍結乾燥した。これを架橋剤 (1%EDC) 存在下に 4M NaCl 溶解液に浸し、24 時間 4℃でコラーゲンの線維化と架橋を同時に引き起こした。洗浄の後、再び凍結乾燥することにより鮭由来架橋 CS が作製された。豚コラーゲンでも同様の方法により、豚由来架橋 CS および豚由来非架橋 CS を作製した。これらの 3 タイプの CS から直径 4.5mm、高さ 3mm の円筒状ブロックを作製した。

実験動物として日本白色家兎 32 羽を使用した。静脈麻酔下に、各動物の両膝蓋大腿関節の大腿骨側に直径 4.3mm、深さ 3mm の骨軟骨欠損を作製し、各動物の両膝計 64 膝を無作為に 4 群 (各群 n=16) に分けた。I 群では鮭由来架橋 CS を欠損部に充填した。II 群では豚由来架橋 CS を欠損部に充填した。III 群では豚由来非架橋 CS を欠損部に充填した。IV 群では欠損部に何も充填しなかった。術後は膝の固定を行わず、ゲージ内で飼育した。術後 4 週および 12 週で 16 羽ずつ屠殺し、各群 8 膝のうち 6 膝を肉眼的・組織学的評価に 2 膝を RT-PCR 評価に供した。

いずれの膝においても、炎症・病的所見は認めなかった。12 週の組織学的評価では、I 群および II 群で Proteoglycan に富む組織を認め、そこでは豊富な II 型コラーゲンの発現も認めた。III 群および IV 群の欠損部は線維性および骨組織で満たされており、II 型コラーゲンの発現はほとんど認めなかった。Wayne score に関しては、12 週において I 群は III

およびIV群より有意に高値( $p=0.0196$ )であり、またII群はIV群より有意に高値( $p=0.0021$ )であった。III群とIV群の間に有意差は認めなかった。リアルタイムPCR分析において、有意差は認めなかったが、II型コラーゲン、aggrecan、SOX9の発現は、I群およびII群が他群に比べて高い傾向が認められた。

本研究は、家兔膝関節骨軟骨欠損部への鮭由来架橋CSの充填が、豚由来架橋CSおよび豚由来非架橋CSの充填と同様に、膝関節に免疫学的有害効果を与えないこと、および鮭由来架橋CSの充填は、豚由来架橋CSと同等以上に12週で骨軟骨欠損部における硝子軟骨再生を促進することを明らかにした。

口頭発表の後、副査の山本有平教授から、鮭由来非架橋コラーゲンスポンジの群がない理由、哺乳類、魚類以外の生物由来のコラーゲンの現状、等について質問があった。次に主査の三浪明男教授から、鮭コラーゲンの医療へ認可の現状、その安全性試験、Cell-free軟骨再生の可能性、種の差によるコラーゲンの差、等について質問があった。最後に副査の安田和則教授から鮭コラーゲンの社会経済的意義、鮭由来架橋コラーゲンスポンジを用いた今後の研究の方向性について質問があった。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、世界初の鮭由来架橋アテロコラーゲンスポンジを開発して、そのin vivo軟骨再生におけるscaffoldとしての基礎的特性を初めて明らかにした。この生体材料は人獣共通感染症のリスクの回避、良好な軟骨再生誘導能、高い生体吸収性、および社会・経済性等の見地において有望な軟骨再生用Scaffoldであり、この領域の今後の研究に貢献することが期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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。