

論文の内容の要旨

論文題目 インプラント型再生軟骨の作製を目指した足場素材の検討

指導教員 光嶋勲 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 山岡尚世

目的

再生医療は各臓器で近年盛んに研究されているが、なかでも軟骨再生の分野は比較的臨床応用が進んでいる。現在、軟骨欠損部にゲル状の自家軟骨細胞塊を投与する治療法が、美容外科あるいはスポーツ外傷外科などにおいて、すでに臨床応用されている。しかし、適応できる疾患は限られており、主要な軟骨疾患である小耳症、口唇口蓋裂、変形性関節症などの治療に軟骨再生医療を適応するためには、力学的強度を有し、三次元形態を呈するインプラント型の再生軟骨を開発する必要がある。

一方、インプラント型再生軟骨を作製するためには、播種する細胞の機能を高め、かつ組織全体の肉眼形状を支持できる、臨床に応用可能な足場素材システムを構築することが要件である。現在まで、軟骨再生医療においては2種類の足場素材を使用する試みが行われてきた。第1はハイドロゲル型の足場素材である。ハイドロゲル型足場素材は、細胞との混和が可能であり、軟骨細胞に特有な三次元環境を提供できる点で、利点がある。しかし、ハイドロゲル自体は力学的強度を欠くため、ハイドロゲル

に三次元的な形状を付与することは困難である。もうひとつは多孔体型足場素材である。多孔体型の足場は、再生組織への力学的強度や形状の付与においては優れているが、気孔のサイズが小さくなるほど、細胞懸濁液の足場内への浸潤が困難になり、反対に、気孔サイズが大きくなると、軟骨細胞は気孔内壁に付着するのみで理想的な三次元環境を成さないなどの欠点がある。

本研究では、臨床に応用可能なインプラント型再生軟骨用足場素材システムを構築することを目的として、まず、軟骨細胞に三次元環境を提供できるハイドロゲル型足場素材について、現在、または近い将来に臨床的に利用可能な材料を比較検討し、さらに、ハイドロゲルを用いたペレット型再生軟骨に三次元形状を付与する目的で多孔体型足場素材との併用を試み、その有用性とハイドロゲルと併用する多孔体足場素材の条件を検討した。

方法

ヒト耳介軟骨より単離した軟骨細胞を実験に供した。ハイドロゲル型の足場素材は、それぞれ、動物、植物、合成ペプチド由来のものとして、アテロペプチドコラーゲン、アルジネート、PuraMatrix™を選択し、ペレット型再生軟骨(2×10^5 細胞/ $20 \mu\text{l}$ 0.5%ゲル)を作製した。対照としてはハイドロゲルを用いずに、同数の軟骨細胞を凝集させたものを用いた。ペレット型再生軟骨は基礎培地(DMEM/F12)あるいはそれに、BMP-2およびinsulinを添加した培地で培養し、それぞれの特性を、分子生物学的、生化学的、組織学的に評価した。さらに、ペレット型再生軟骨の形状保持のために多孔体型足場素材を併用した。多孔体には、骨接合具の原料であるポリ乳酸(PLLA)を多孔化したもの(孔径約 $500 \mu\text{m}$)、現在医療用材料として供給されているコラーゲンスポンジ(孔径約 $100 \mu\text{m}$)、乳酸カプロラクトン共重合体(P(LA/CL)) 50:50 多孔体(孔径約 $50 \mu\text{m}$)、乳酸カプロラクトン共重合体(P(LA/CL)) 75:25 多孔体(孔径約 $50 \mu\text{m}$)を用いた。多孔体に、軟骨細胞(10^6 細胞)とアテロペプチドコラーゲン($100 \mu\text{l}$)あるいは同体積の基礎培地(DMEM)の混和物を投与し、インプラント型再生軟骨を作製した。作製したインプラント型再生軟骨の *in vitro* での形態変化を評価するとともに、マウスの背部皮下に移植し、*in vivo* での形状変化、生化学的、組織学的特性を評価した。

結果と考察

それぞれのハイドロゲル中で軟骨細胞の高密度培養を行い、ペレット型再生軟骨を作製したところ、ハイドロゲルを使用しないペレット型再生軟骨と比較して、いずれのハイドロゲルでもII型コラーゲンのmRNAの発現が増加した。さらにinsulinおよびBMP-2の刺激により軟骨細胞の基質産生を促進させたところ、アテロペプチドコラ

ーゲンでは II 型コラーゲンが、アルジネートではグリコサミノグリカンが顕著に集積した。アテロペプチドコラーゲン中の軟骨細胞では、 $\beta 1$ インテグリンの発現が増加しており、豊富な細胞基質シグナル伝達が示唆された。一方、n-カドヘリンの発現はアルジネートでは低く、個々の細胞の孤立性が保たれることにより軟骨細胞の活性が維持されている可能性が示唆された。PuraMatrix™ 中での基質合成は他と比較して少量であり、ゲル化後のヤング率も最も低く、ゲル化能および細胞と基質の支持能に改善の余地があることが示唆された。基質産生能が高く、また組織欠損補填剤としての臨床実績を考慮すると、現時点ではハイドロゲル型足場素材としては、アテロペプチドコラーゲンが第一選択と考えられた。

しかし、アテロペプチドコラーゲンを用いたペレット型再生軟骨を *in vitro* において培養すると、4週間で約 70%まで収縮し、アテロペプチドコラーゲンゲルのみでは形状保持が困難であることが明らかとなった。そのため、細胞・アテロペプチドコラーゲン混和物を PLLA 多孔体型足場に投与し、形状変化を追跡したところ、長期にわたり形状保持が良好であった。そのため、細胞・アテロペプチドコラーゲン混和物を多孔体型足場に投与することによりインプラント型再生軟骨の作製が可能であると思われた。

さらに、細胞・アテロペプチドコラーゲン混和物と併用する際の多孔体型足場素材の条件を検討するため自作の PLLA に加え、現在医療用材料として提供されているコラーゲンスポンジ、P(LA/CL) 50:50、P(LA/CL) 75:25 を使用し、インプラント型再生軟骨を作製した。コラーゲンスポンジは、細胞やアテロペプチドコラーゲンの投与の有無に関わらず、液体に浸漬しただけで 50~60%に縮小してしまい、初期形態を保つことが困難であった。一方、P(LA/CL) 50:50、P(LA/CL) 75:25 はいずれも、移植後も形状が保たれており、ほとんど収縮は見られなかった。PLLA も形状が保たれており、ほとんど収縮は見られず、むしろ、PLLA に細胞・アテロペプチドコラーゲン混合物を投与したものは約 5%微増していた。生化学的には、コラーゲンスポンジおよび PLLA によるインプラント型再生軟骨では、グリコサミノグリカンと II 型コラーゲンの顕著な蓄積が見られた。しかし、P(LA/CL) 50:50、P(LA/CL) 75:25 においては、ほとんど見られなかった。また、組織学的に検討すると、コラーゲンスポンジはサイズが保たれなかったものの、中心部までメタクロマジーが観察され、また PLLA では、他の多孔体型足場に比べ、最も豊富なメタクロマジーが観察された。一方、P(LA/CL) 50:50、P(LA/CL) 75:25 でいずれも辺縁部のみにメタクロマジーがみられ、軟骨細胞が辺縁部にとどまり、中心部まで十分に細胞が浸透していないことが示された。インプラント型再生軟骨を作製する上では、多孔体内部に粘調な細胞・アテロコラーゲン混和物を浸透させることが必須である。そのため、孔径の大きいコラーゲンスポンジや PLLA 多孔体が有利であったと思われる。培養や移植の間に受ける外力に抗するためには十

[別紙1]

分な剛性が必要であるが、剛性は逆に、細胞・アテロコラーゲン混和物の浸透を困難にさせる。そのためにも 500 μm 程度の十分に大きな孔径を有する剛体の多孔体が必要であると思われた。