

# 微細加工装置により作製したマイクロ軟骨を細胞供給源とする新規軟骨再生誘導法の開発

西 脇 仁

近畿大学医学部形成外科学教室

Novel method to induce chondrio-regeneration using fine-cut, block-shaped microcartilage *in vivo*

Hitoshi Nishiwaki

Department of Plastic Surgery at Kindai University Faculty of Medicine

## 抄 録

軟骨組織の再生修復能は極めて低く、かつ軟骨欠損部への軟骨片移植の臨床成績はいまだ不良である。近年では幹細胞を用いた軟骨再生誘導法が開発され臨床応用されつつある。しかし幹細胞を単離する従来法にも手技上のコストや手技に伴う細胞障害等の諸問題が存在している。また以前の研究結果より、幹細胞を含む軟骨細胞塊を用いた軟骨再生が可能であることが分かっている。そこで本研究では従来の方法を発展させ、より実際的な新規軟骨再生誘導法の開発を試みた。まず軟骨を低侵襲的に微細加工する装置を作製し、再生誘導に適したマイクロ軟骨サイズの検討を行った。その結果、細胞利用率が最も高いマイクロ軟骨の至適サイズは、100~400  $\mu\text{m}$  前後であると推測された。次に塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor/bFGF) 徐放化システムを軟骨移植に併用し、本サイトカインが移植後軟骨片に及ぼす影響を評価した。その結果、自家軟骨移植時に bFGF 徐放化システムを併用することで、SOX5 活性化を伴う軟骨細胞増殖が促進されることが示された。さらにマイクロ軟骨を吸収性足場材料に接着させ、マイクロ軟骨・足場材料・bFGF 徐放化システムを組み合わせた移植を行い、細胞培養行程を介さない新規軟骨組織再生誘導を試みた。その結果、bFGF 徐放化システムによる bFGF 拡散の程度はマイクロ軟骨のサイズに依存し、比較的小型の100  $\mu\text{m}$  群において SOX5 発現亢進を介した軟骨再生が最も効率よく行われることが示唆された。以上の結果より、微細加工装置により作製したマイクロ軟骨にサイトカインを併用することで軟骨組織の分化増殖を促しうることが示され、培養行程を介さない新規軟骨再生誘導法の可能性が示唆された。

**Key words :** 軟骨再生, 微細加工, bFGF, サイトカイン徐放化システム, SOX5

## 緒 言

軟骨組織は部位により形態・機能が異なり、組織学的に硝子軟骨 (関節軟骨・鼻翼軟骨・肋軟骨等)、弾性軟骨 (耳介軟骨・喉頭蓋軟骨等)、線維軟骨 (椎間円板・関節半月) の3種類に分類される。いずれの軟骨組織も自己再生能は低く、先天性・外傷性・加齢性・炎症性などの原因を問わず、不可逆的な変形をきたした軟骨組織の自然回復は困難である。そ

のため、軟骨再建を必要とする先天性・後天性疾患 (鼻変形, 小耳症, 眼瞼欠損, 関節症等) に対しては軟骨移植術が従来行われてきた。この際のドナー軟骨採取部位としては関節軟骨・耳介軟骨・肋軟骨などが選択されるが、移植軟骨片による3次元形状の再現と長期形状維持に関する臨床成績は好ましくない。また、これら移植軟骨採取プロセスにともなう問題も多数指摘されている。例えば、関節軟骨や耳介軟骨では採取量が極めて制限され、一方で肋軟骨

採取では操作中の気胸発生や採取後の胸郭変形・疼痛などが生じうる。これらの諸問題を解決しうる新たな軟骨移植術の開発が急務と考えられている。

近年、軟骨移植術に関する基盤技術として、成熟軟骨細胞を細胞供給源とした軟骨再生誘導法が開発され、臨床応用されつつある<sup>1,2</sup>。しかし現状では細胞回収率および細胞接着率の低いことが問題である。例えば、従来の酵素処理法による成熟軟骨細胞の細胞回収率は約11.9%と極めて低く、また足場材料に細胞播種する場合の細胞接着率はわずか25.1%である<sup>3</sup>。この低い細胞利用率(=細胞回収率×細胞接着率)を改善するため、近年の再生医療では臨床用細胞培養施設 (cell processing center/CPC) を用いた生体外での培養・増殖が行われる。しかしながらCPC施設の設置・利用は細胞療法コストアップの最大要因であり、また生体外設備で行われる操作であるため、微生物汚染や細胞の取り違えといったリスクが常に介在している。

幹細胞を用いた軟骨再生誘導の技術開発も同時に進行している<sup>4</sup>。これまでの幹細胞に関する研究から、幹細胞の分化増殖には適切な組織内微小環境、特に適切なサイトカイン環境が必要であることが分かっている<sup>5</sup>。したがって、幹細胞を含む最小単位の軟骨細胞塊を均一サイズの大量微細組織(以下マイクロ軟骨と略す)に分離加工して新たな幹細胞供給源とし、さらにサイトカイン併用により分化増殖を促すことで、培養行程を介さない軟骨組織の再生誘導が可能になると推測される。

そこで本研究では、上記マイクロ軟骨を用いた新規軟骨再生技術の確立を試みた。まず実験1では、軟骨を低侵襲的に微細加工する装置を作製し、加工したマイクロ軟骨に含まれる軟骨細胞数および細胞活性の評価などから、再生誘導に適したマイクロ軟骨サイズの検討を行った。次に実験2では、塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor/bFGF)徐放化システムを自家軟骨移植に併用し、本サイトカインが移植後軟骨片に及ぼす影響を評価した。さらに実験3では、マイクロ軟骨を吸収性足場材料に接着させ、マイクロ軟骨・足場材料・bFGF徐放化システムを組み合わせた自家移植を行い、細胞培養行程を介さない新規軟骨組織再生誘導を試みた。

## 方 法

### 実験動物および耳介軟骨採取

本研究で行った動物実験はすべて近畿大学医学部動物実験委員会規定に基づいて実施された。本研究ではビーグル犬(6~8週齢、雌、浜口動物、兵庫)

を用い、後述の実験1では24頭、実験2では9頭、実験3では15頭、計48頭を使用した。飼育は個別ゲージ(室温23°C、湿度50%、12時間明暗サイクル)で行った。飼育繁殖固形飼料CD55α(日本クレア株式会社、東京)を1日1回約300g与え、飲料用水は制限なく与えた。

侵襲的な実験動物操作はすべて全身麻酔下に行った。まず12時間以上の絶食後、キシラジン(セラクター®, 0.15 ml/kg, バイエルメディカル株式会社、東京)の殿部筋肉注射にて導入を行い、次にペントバルビタール(ソムノペンチル®, 0.4 ml/kg, 共立製薬株式会社、東京)を経静脈投与して全身麻酔を行った。麻酔深度は睫毛反射消失を指標として維持し、適宜ペントバルビタールを追加投与した。耳介切断後、耳介から皮膚・皮下組織・筋肉・軟骨膜を除去して耳介軟骨を採取した。

### 実験1: 微細加工装置の開発とマイクロ軟骨の作製

軟骨組織を微細に切断して再生医療用マイクロ軟骨を製造するため、微細加工装置を独自に作製した(図1)。この装置は(1)軟骨組織を固定するステージユニット、(2)ステージ上の軟骨を切断して第1方向の切断面(X平面切断)を形成する第1切断ユニット、(3)第2および第3方向の切断面(YZ平面切断)を形成する第2切断ユニットを備え、各方向の切断面はそれぞれの切断面と正確に直交している。前述の手技で採取した10 mm×10 mmのイヌ耳介軟骨片を微細加工装置のステージユニットにダーマボンドを用いて固定し、カッターの刃を第1方向(X軸方向)、第2方向(Y軸方向)、および第3方向(Z軸方向)へそれぞれ移動させて軟骨組織の細切切断を行った。切断完了時に細切されたマイクロ軟骨はサンプル受けバスケットに回収した。

フローサイトメトリーによるマイクロ軟骨に含まれ

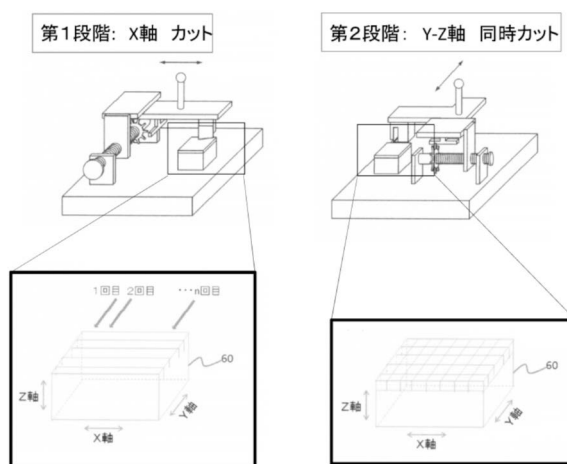


図1 組織微細加工装置の概要。

生軟骨細胞数および細胞活性の評価

各サイズのマイクロ軟骨に含まれる生軟骨細胞数の評価にはフローサイトメトリー法を用いた(図2)。まずマイクロ軟骨の懸濁液を0.3%コラゲナーゼ(Worthington, Lakewood, NJ)により37°C, 16時間の酵素処理した。次にポアサイズ70 μmのストレーナーでろ過し, 10%仔牛胎児血清(Sigmlia-Aldrich, St. Louis, MO)を含むDMEM培養液(Gibco, Grand Island, NY)で酵素反応を停止した。PBSによる遠心分離・洗浄を3回行い, 細胞ペレットを10 ml PBSに懸濁した。そのうち1 mlを再度遠心分離して細胞ペレットとし, 0.5%ヨウ化プロピジウム(Propidium Iodide/PI) 1 mlにより15分間染色した。次にAttune アコースティックフローサイトメーター(Life Technologies, Waltham, MA)を用いて500 μl中の総細胞数およびPI陰性細胞数を計測し, 各値を20倍して生軟骨細胞数および細胞活性(生軟骨細胞数の割合)として求めた。

実験2:自家軟骨片の移植

実験2(図3)では, 採取した耳介軟骨からデル

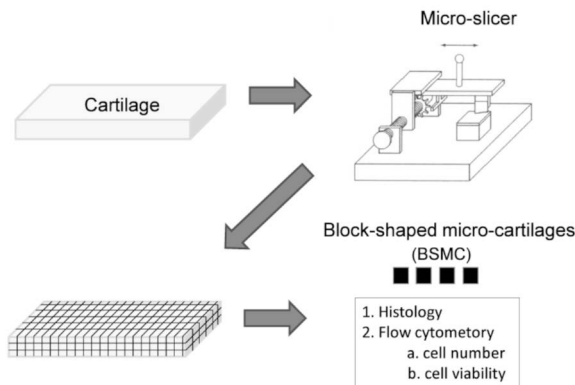


図2 実験1概要。組織微細加工装置によりマイクロ軟骨の作製。

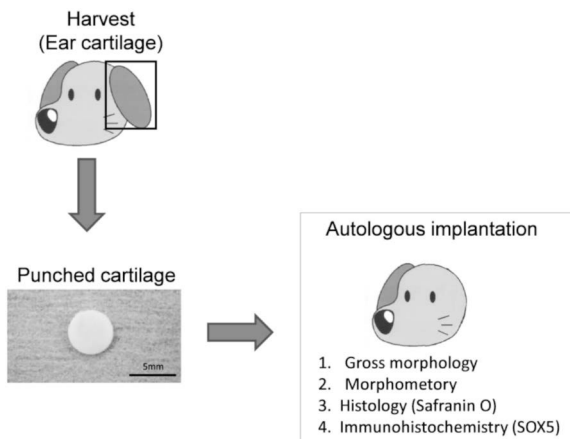


図3 実験2概要。bFGF徐放化システムが移植後軟骨片に及ぼす影響の評価。

マパンチを用いて円型軟骨(直径5 mm)の自家軟骨片を作製した。実験群は, bFGF徐放群および対象群の2群を設定した。bFGF徐放群には, 自家軟骨の表裏面にbFGF含有ゼラチン微粒子を塗布した(後述)。対象群には, bFGFを含まないゼラチン微粒子を塗布した。また軟骨片移植は以下のように実施した。まず全身麻酔下にイヌの頭部から後頸部にかけて広範囲に剃毛し, 頭頂部に約5 cmの切開を加え, 骨膜上レベルにて頭皮を剝離した。次に浅深側頭筋膜を確認し, 両筋膜の間に移植床を作成し, 事前に準備した軟骨片を自家移植した。閉創は5-0合成糸(シグマ, 東京)にて行った。

bFGF徐放化システムの作製

本システムを構築するにあたり, まずbFGF担体となるゼラチン微粒子を以下のように作製した<sup>6</sup>。最初に10%ゼラチン水溶液0.2 ml(等電点5, 牛骨ゼラチン, 新田ゼラチン株式会社, 大阪)をオリーブオイル5 mlに加え, 40°Cで1時間静置した。攪拌後4°Cで冷蔵して粒子化し, さらにゼラチン周囲に付着したオリーブオイルをアセトン1.5 mlにて洗浄した。得られた溶液を4°C, 5,000 rpmで5分間遠心分離し, 再度4°Cのアセトンにて3回洗浄した。その後4°C冷蔵庫内にて1週間乾燥させ, 沈殿物であるゼラチン粒子を得た。次にゼラチン粒子の架橋を行うため, ゼラチン粒子1 mgに対し0.1%ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートを1 ml, 25%グルタルアルデヒドを5 μl加え, 4°Cにて24時間攪拌した。次にゼラチン粒子懸濁液を5,000 rpmで5分間遠心分離し, 沈査ゼラチン粒子にグリシン溶液を加えてさらに1時間常温で攪拌した。その後蒸留水を用いた遠心分離による洗浄を3回行った。得られたゼラチン粒子に超純水を加え, ポアサイズ70 μmおよび30 μmのストレーナーを用いて粒子径を均一化した。直径30~70 μmのゼラチン粒子を回収し, 液体窒素で凍結させた。凍結真空乾燥したゼラチン微粒子(直径約10 μm)をエチレンオキサイドガスにより滅菌した。ゼラチンにbFGFを含浸させるため, bFGF 100 μm(トラフェルミン, 科研製薬, 東京)をCa<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>不含有リン酸緩衝液60 μl(Dulbecco's phosphate-buffered saline/PBS, Gibco)に溶解し, ゼラチン微粒子10 mgを加えて4°Cで24時間静置した。

移植自家軟骨片の形状変化の評価

上記自家軟骨片は移植後5週後に摘出した。摘出移植片より周囲に付着した結合組織を除去し, ノギスにて直径を計測後, 下記組織学的評価に供した。厚さは得られた組織切片像より計測した。また摘出移植片の体積はこれら面積と厚さの積より求めた。

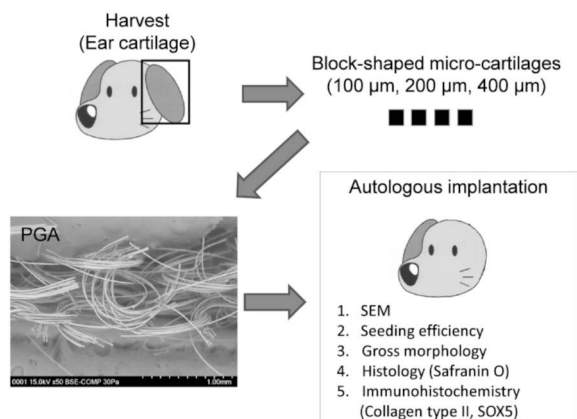


図4 実験3概要。マイクロ軟骨・足場材料・bFGF徐放化システム併用による軟骨組織再生の評価。

### 実験3：マイクロ軟骨・PGA複合体の移植

実験3(図4)では、微細加工装置を用いて耳介軟骨片(5mm×5mm)より立方体形状マイクロ軟骨(100μm, 200μm, 400μmの3群)を作製し、これをPGA不織布(ネオパール®, 10mm×10mm×厚さ0.15mm, グンゼ, 京都)に接着させた。マイクロ軟骨の接着時にはPGA不織布の浸透体積許容量を考慮し、各サイズのマイクロ軟骨をPBS 50μlに懸濁し、マイクロピペットを用いてPGA不織布上に均等に播種した。マイクロ軟骨とPGA不織布との接着状態の観察には走査型電子顕微鏡(S-900, 日立製作所)を用いた。また、PGA不織布播種前後のマイクロ軟骨の一部はフローサイトメトリーを用いた接着率評価系に供し(後述)、作製したマイクロ軟骨・PGA複合体は前述のbFGF徐放化システムと組み合わせて実験2と同様の方法で自家移植した。

#### マイクロ軟骨のPGA不織布への接着率

マイクロ軟骨のPGA不織布への接着率の評価をするため、マイクロ軟骨をPGA不織布へ接着した後の残存マイクロ軟骨数の計測を以下のようにおこなった。まずマイクロ軟骨の接着後に室温で1時間静置し、PGA不織布を5ml PBSで緩やかに洗浄した。洗浄液を回収し、これらを残存マイクロ軟骨とした。マイクロ軟骨数の測定は、回収された全マイクロ軟骨の1/10をPBSに懸濁し、そのうち500μl中のマイクロ軟骨粒子数を前述のフローサイトメーターを用いて計測した。得られた値を20倍して各検体の総マイクロ軟骨数とし、接着前・接着後のマイクロ軟骨数の割合を算出した。

#### 組織学的評価

移植後5週目に移植片の採取を行った。肉眼的観察および形状計測(直径および厚さ)を行った後、

採取標本を10%ホルマリン固定した。次いでパラフィンブロックを作製し、ミトクローム(LEICA SM2000R)にて厚さ3μmに薄切した。組織学的評価では、軟骨の一般的性状を調べるためにトルイジンブルー染色を行った。また、軟骨マーカーのひとつである酸性プロテオグリカンを染色するためにサフランin O染色を施行した<sup>6</sup>。

軟骨組織内II型コラーゲンおよび軟骨細胞における転写因子として重要なSOX5の発現および局在について評価するため、以下の方法で免疫組織染色を行った。まず組織切片を脱パラフィン処理した。次に1x Target Retrieval Solution(DAKO, 京都)に浸漬し、マイクロ波発生装置を用いて100°C, 5分間の加温を3回繰り返して抗原の賦活化を行った<sup>1</sup>。抗原賦活化した切片を1xリン酸緩衝液(8.1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>・12H<sub>2</sub>O, 136mM NaCl, 2.68mM KCl, 1.47mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4)で洗浄後、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含有メタノール溶液で内因性ペルオキシダーゼを不活化した。続いてブロッキング液(1%ウシ血清由来アルブミン, 600mM NaCl, 50mM Tris-HCl)に30分間浸漬し、Biotin Blocking System(DAKO)を用いて内因性ビオチンおよびアビジンを不活化した。上記リン酸緩衝液で洗浄後、4μg/mlのウサギ抗イヌSOX5 IgG抗体(Aviva Systems Biology, San Diego, CA)、マウス抗イヌII型コラーゲン IgG抗体(第一ファインケミカル株式会社, 富山)、あるいは正常ウサギ IgG(DAKO; 陰性コントロール)で4°Cにて一晩反応させた。1次抗体反応後に1xリン酸緩衝液で洗浄し、抗ウサギ IgG抗体(Vector Laboratories, Burlingame, CA)で2次抗体反応した。再び1xリン酸緩衝液で洗浄した後、Vectastain ABC/HRP kit(Vector Laboratories)を用いてペルオキシダーゼ標識し、ジアミノベンジジン溶液で酵素反応により発色させた。

#### 統計学的解析

統計学的有意差は、2グループ間比較に対してはStudent t検定、3グループ以上に対しては一元配置分散分析(one-way analysis of variance/one-way ANOVA)およびHolm後検定で判定した。データ解析処理にはR Environment(R Project)を用い、 $P < 0.05$ で有意差ありと判定した。

## 結 果

実験1：微細加工装置を用いて作製したマイクロ軟骨の性状評価

独自に開発した微細加工装置を用いて軟骨を立方体形状に微細加工した。その結果、1辺を100μm, 200μm, 400μmとする3種類のマイクロ軟骨が作

製された(図5)。次に各サイズのマイクロ軟骨に含まれる生軟骨細胞数をフローサイトメトリー法にて評価した(図6A)。その結果、コラゲナーゼによる酵素処理後の生軟骨細胞数は、100 μm 群では $5.6 \times 10^3/\text{mm}^3$ 、200 μm 群では $5.7 \times 10^3/\text{mm}^3$ 、400 μm 群では $5.3 \times 10^3/\text{mm}^3$ であり、200 μm 群に最高値を持つ一峰性曲線を示した。この結果から、軟骨組織を酵素処理して細胞を単離する際には、軟骨組織をマイクロ軟骨に微細加工して細胞回収率を高めることが可能であることが判明した。また100 μm 未満および1,000 μm 以上の微細加工では、生軟骨細胞数は減少した。

さらにそれぞれのマイクロ軟骨における細胞活性(生軟骨細胞の占める割合)を算出した(図6B)。その結果、マイクロ軟骨のサイズが100 μm 以上の群における細胞活性は85%以上であったが、100 μm 未満の群では65%であった。以上の結果より、酵素処理による細胞回収率が最も高く、かつ微細加工による機械的細胞障害の少ないマイクロ軟骨の至適サイズは、100~400 μm 前後となることが推測された。

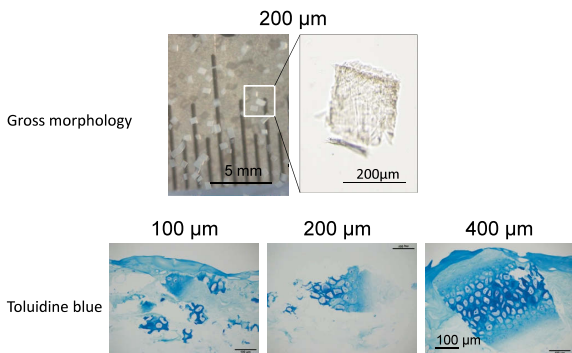


図5 組織微細加工装置により作製されたマイクロ軟骨の形状を評価した。各群 n=3。代表例のみ提示。

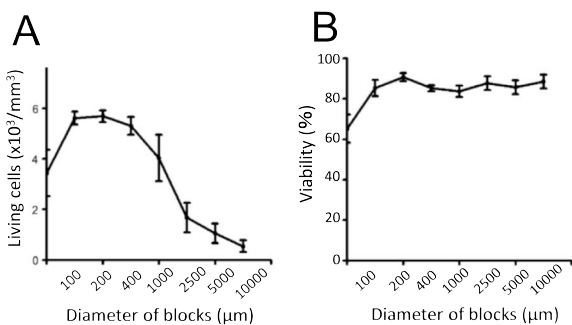


図6 フローサイトメトリー法により各サイズのマイクロ軟骨の生細胞数と細胞活性を評価した。グラフ上最左群は徒手の超微細破砕群。各群 n=3。X軸は対数軸。エラーバーは標準誤差。

実験2：bFGF徐放化システムが自家軟骨移植片に及ぼす影響について

移植した自家軟骨片に対するbFGF徐放化システムの影響を組織学的に検討した。デルマパンチを用いて作製した円型軟骨片を自家移植する際、bFGF徐放化システムを併用した群(bFGF群)と併用しない対照群の2群を比較評価した。肉眼所見では取り出したすべての移植片は白色で光沢を呈していた(図7上段)。移植後5週目における形状計測の結果、対照群に比較して、bFGF徐放群では直径比が約120%(図8)、厚さ比が約3倍(図9)、体積比が約4倍に増加していた。一方、対照群では移植前の軟骨片の直径・厚さは移植前と比し有意差はなかった。

次に組織学的評価を行った。サフランin O染色では、bFGF徐放群において、軟骨片の肥厚およびサフランin O濃染像が観察された(図7中段)。また移植

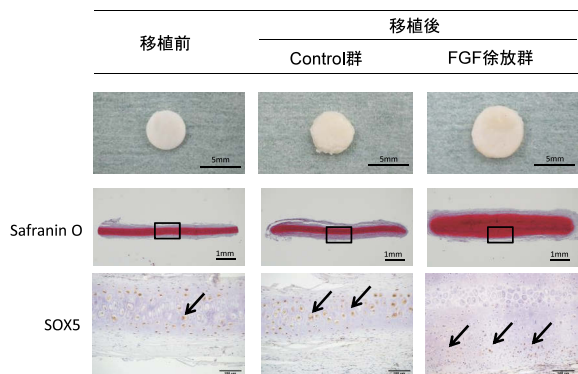


図7 bFGF徐放システムが自家移植された円型軟骨に及ぼす影響を組織学的に評価した。各群 n=6。代表例のみ提示。

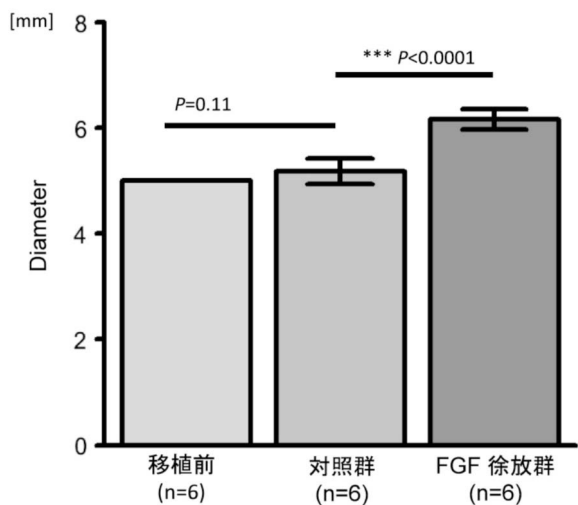


図8 bFGF徐放システムが自家移植された円型軟骨に及ぼす影響のうち、直径の変化を評価した。各群 n=6。エラーバーは標準誤差。

片辺縁部には著明な細胞密度増加像が認められた。本結果より、bFGF 徐放群では増殖に関わる細胞内イベントが惹起されていることが推測されたため、未分化間葉系細胞から軟骨細胞への分化を制御する転写因子 SOX5 の免疫染色を行った<sup>7</sup>。その結果、bFGF 徐放群の軟骨片の辺縁部に SOX5 陽性細胞が数多く観察された。一方、コントロール群では SOX5 陽性反応細胞は軟骨片の中央部に少数散在するのみであった（下段）。

以上の結果より、自家軟骨移植時に bFGF 徐放化システムを併用することで、SOX5 活性化を伴う軟骨細胞増殖が促進される可能性が示唆された。

実験 3：マイクロ軟骨を細胞供給源とする軟骨の再生誘導

各サイズのマイクロ軟骨を PGA 不織布へ接着させ、マイクロ軟骨が PGA 不織布へ接着する状態を

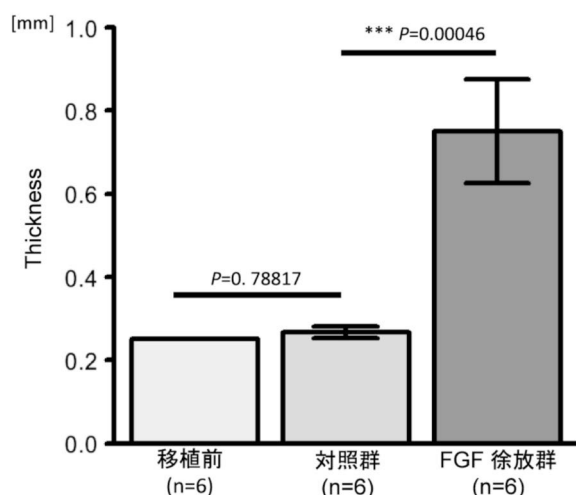


図9 bFGF 徐放システムが自家移植された円型軟骨に及ぼす影響のうち、厚さの変化を評価した。各群 n=6。エラーバーは標準誤差。

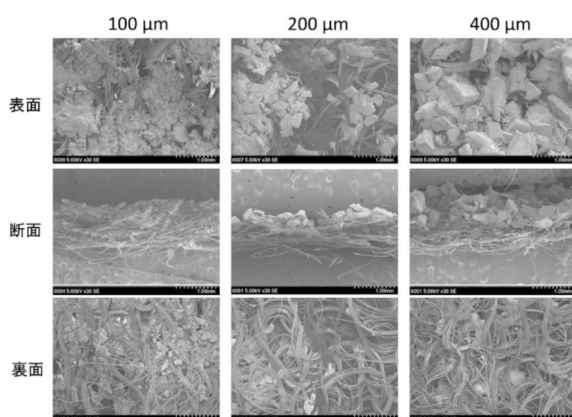


図10 マイクロ軟骨が PGA 不織布へ接着する状態を走査型電子顕微鏡にて評価した。各群 n=3。

走査電顕にて観察した(図10)。その結果、100 μm 群において播種したマイクロ軟骨は PGA 不織布の内部から深層部に接着し、一部は裏面を通過していた(左)。200 μm 群ではマイクロ軟骨は主に PGA 不織布の上層部に接着し(中央)、400 μm 群ではマイクロ軟骨は PGA 不織布上に集積していた(右)。また、マイクロ軟骨のサイズが400 μm 以上である場合は、PGA 不織布の内部にマイクロ軟骨を接着させることは困難であることが判明した。PGA 不織布に残存するマイクロ軟骨数をマイクロ軟骨の接着率として求めたところ、マイクロ軟骨の PGA 不織布への接着率は100, 200, 400 μm のいずれの群においても95%以上であった(図11)。さらに実験1(図6)よりこれらのマイクロ軟骨における細胞生存率は85%以上であったことから、細胞利用率80%以上(=細胞生存率85%×細胞播種効率95%)と判明した。これらの結果より、PGA 不織布の内部に良好に接着しうるマイクロ軟骨の至適サイズは100~200 μm であることが示唆された。

次にマイクロ軟骨を足場材料および bFGF 徐放化システムと組み合わせて自家移植し、細胞培養を介さない軟骨組織の再生誘導を試みた。移植後5週目に摘出した標本の肉眼所見では、マイクロ軟骨のサイズが小さいほど表面の凹凸は少なく平滑で、軟骨組織に特徴的な白色色調や均一な光沢が観察された(図12上段)。また PGA 不織布の形状およびサイズはすべての群において維持されていた。組織学的評価として、前述のサフラニンO染色を行った(図

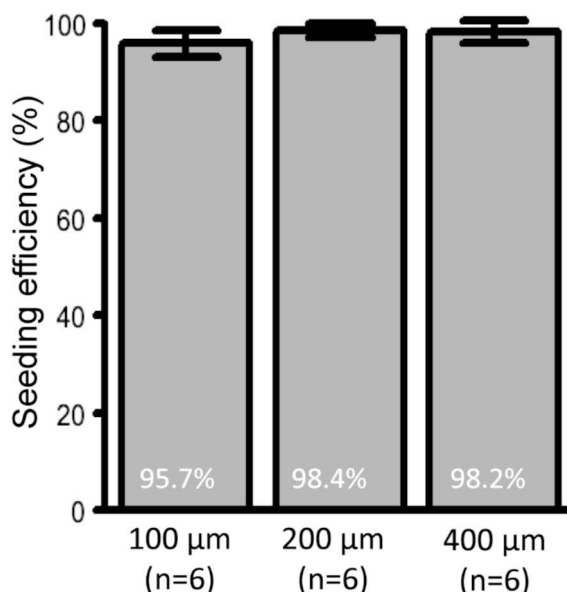


図11 PGA 不織布に接着するマイクロ軟骨の頻度を評価した。各群 n=6。エラーバーは標準誤差。

12下段). 100 μm 群では, 隣接するマイクロ軟骨の細胞外基質は互いに融合し, PGA 不織布内部に薄く均一に分布していた (左). 一方, 200 μm (中央) および400 μm (右) の群では, 細胞外基質の融合像は観察されず, 個々のマイクロ軟骨が PGA 不織布内部もしくは上部に単独に分布していた. 足場材料である PGA 不織布は, マイクロ軟骨のサイズが大きくなるにしたがって厚くなる傾向を示した.

再生軟骨を免疫組織学的に評価するため, II型コラーゲン (図13) および SOX5 の免疫組織染色を行った (図14). 100 μm 群では, II型コラーゲン陽性の細胞外基質が隣接するマイクロ軟骨間を架橋して

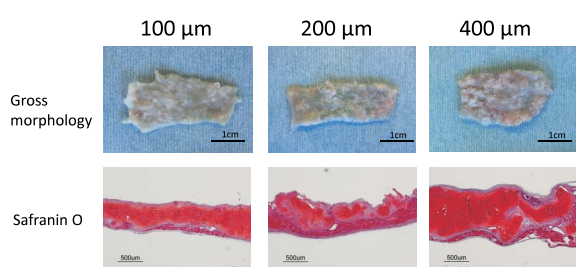


図12 マイクロ軟骨・足場材料・bFGF 徐放化システム併用による軟骨組織再生を組織学的に評価した. 各群 n=3. 代表例のみ提示.

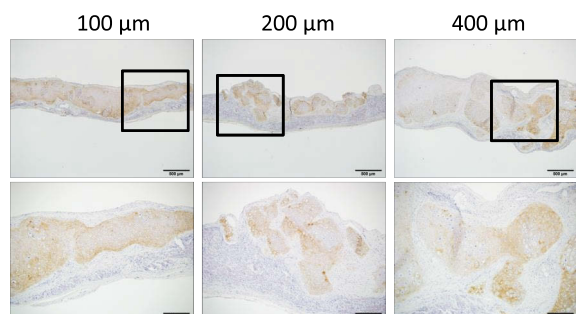


図13 マイクロ軟骨・足場材料・bFGF 徐放化システム併用による軟骨組織再生にともなう II型コラーゲン発現を評価した. 各群 n=3. 代表例のみ提示.

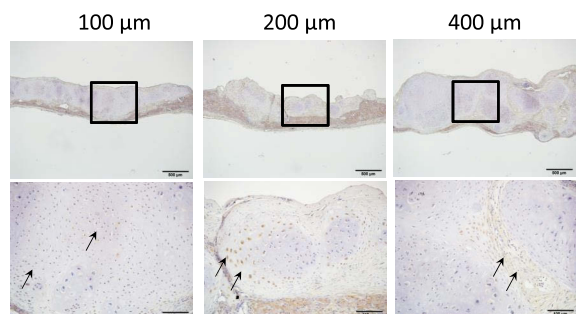


図14 マイクロ軟骨・足場材料・bFGF 徐放化システム併用による軟骨組織再生にともなう SOX5 発現を評価した. 各群 n=3. 代表例のみ提示.

いる像が観察された (左). 一方, 200 μm (中央) および400 μm (右) の群では, 上記のようなII型コラーゲン陽性部位の連続性は観察されず, マイクロ軟骨は PGA 不織布内部もしくは上部に独立して散在していた. またII型コラーゲン陽性領域はサフランin O 陽性領域と一致していた. 細胞増殖にかかわる転写因子 SOX5 の分布については, 100 μm 群では再生軟骨全体に SOX5 陽性細胞が多数観察された (図14左). 一方200 μm 群では, SOX5 陽性細胞は各マイクロ軟骨の周辺部に限局して観察された (中央). また400 μm 群では, マイクロ軟骨内部に発現する SOX5 は認められず, SOX5 陽性細胞のほとんどはマイクロ軟骨とマイクロ軟骨の境界領域に発現していた (右).

以上の結果より, bFGF 徐放化システムによる bFGF 拡散の程度は, マイクロ軟骨のサイズに依存し, 比較的小型の100 μm 群において SOX5 発現亢進を介した軟骨再生が最も効率よく行われていると考えられた.

## 考 察

成人の正常な外耳は外耳孔から外後方に突出し, 複雑な3次元形状を有する軟骨に支えられている. また先天的耳介形成不全である小耳症では, 外耳が部分的もしくは全体的に欠損している. 本疾患の治療で本来の耳介形態を再現するためには, 約6cmの耳介長と複雑な3次元形状を有する軟骨フレームが必要となる. そこでこのフレーム形成を工夫した種々の耳介再建術式がこれまでに考案されてきた. 1954年, Peer らは自家軟骨を手術用メスにて細切加工し, これを耳介形状の鋳型に詰め込んだ後に腹部皮下に移植し, 3次元構造をもった軟骨組織を再生誘導する“diced cartilage graft”法を提唱した<sup>8</sup>. 続いて1959年, Tanzer らは3本の肋軟骨を採取し, 耳輪・対輪・フレームベースから構成される肋軟骨耳介フレームを作成, これを側頭部の皮下ポケットに移植する自家肋軟骨移植法を開発した<sup>9</sup>. 本術式は, 初回手術である自家肋軟骨移植, 二次手術である耳介挙上と皮膚移植, 三次手術である耳珠形成術の3段階から構成される. 本手法の問題点としては, (1)複数回の大掛りな手術を要する, (2)肋軟骨採取による侵襲が大きい, (3) 耳介フレームを覆うための皮膚量が不足するため正常耳介の形態が再現しにくい, (4)移植軟骨が吸収される, などが指摘されている. さらに1966年, Cronin らは自家肋軟骨の代わりに耳介形状シリコンフレームを導入した耳介形成術を報告した<sup>10</sup>. この方法では, シリコンによる異物感染・異物反応が問題となった. 近年では2005年, Lu

らが大型動物(ヤギ)を用いた実験を行い, Peer らと同様に手術用メスを用いて細切した軟骨を生分解性高分子(PGA/PLLA および PGA/PCL)による人工フレームと組み合わせて移植した。しかし本手法は再生軟骨の強度が保てず臨床応用に至らなかった<sup>11</sup>。そこで本研究では, Peer らと Lu らが発案した自家軟骨移植による軟骨再生法<sup>8,11</sup>をさらに発展させ, 低侵襲的に微細加工したマイクロ軟骨, bFGF 徐放化システム, および足場材料(PGA 不織布)を併用した軟骨組織の再生誘導を試みた。特にマイクロ軟骨に関する実験では, マイクロ軟骨サイズの最適化を試みた(図6, 図10-11)。また軟骨組織再生の指標として軟骨細胞増殖にかかわる転写因子 SOX5 の発現量を評価した(図14)。本研究結果から, 微細加工装置を用いて作製したマイクロ軟骨を細胞供給源とする軟骨再生誘導法は新たな耳介再建術として今後臨床応用される可能性が高いと考えられる。

従来の軟骨細胞単離法は, 軟骨組織を2~3mmの大きさに手術用メスで細切した後にコラゲナーゼ処理していた。Vacanti らは本法により得られるヒト耳介軟骨細胞数は最大  $4 \times 10^3/\text{mm}^3$  であったと報告している<sup>3</sup>。ただしこの報告では生軟骨細胞数の総数および頻度は明らかにされていない。一方, 微細加工装置を導入した後にコラゲナーゼ処理をして得られたイヌ耳介軟骨の生軟骨細胞数は, マイクロ軟骨サイズを2.5mmに微細加工した場合は約  $1 \times 10^3/\text{mm}^3$  であり, 100~400  $\mu\text{m}$  に微細加工した場合は  $5.3 \sim 5.7 \times 10^3/\text{mm}^3$  であった(図6A)。すなわち, 当然のことながら単位体積中から得られる最大総細胞数は従来の結果とほぼ同等ではあるが, 微細加工することで生軟骨細胞の収量は約5倍に増加しうることが判明した。一方, マイクロ軟骨のサイズが100  $\mu\text{m}$  未満となる場合, 微細加工により増加する切断面において細胞障害が生じ, 生軟骨細胞数および細胞活性が減少することが示唆された(図6A)。さらに1,000  $\mu\text{m}$  以上では, 生軟骨細胞の頻度は高く維持されていたものの, コラゲナーゼ処理によって得られる生軟骨細胞数は著明に減少しており, 総表面積の減少に伴うコラゲナーゼ処理効率低下と考えられた。これらの結果より, コラゲナーゼ処理による細胞採取効率を高める際にも微細加工装置は有用であり, 本装置により軟骨組織から効率的かつ低侵襲的に軟骨細胞を単離しうることが明らかとなった。

本研究により, マイクロ軟骨を用いた軟骨の再生誘導には, マイクロ軟骨の大きさおよび形状が重要であることが明らかとなった(図10-11)。すなわち, 移植するマイクロ軟骨のサイズが大きい場合, 組織

内部への栄養拡散は移植後に低下し, 移植軟骨の生着は不良となる。一方, マイクロ軟骨のサイズが小さい場合, 断面で切削され障害される細胞数が増加する。このためマイクロ軟骨の至適サイズは, 周囲からの栄養拡散が良好でありかつ微細加工による細胞障害の影響が少ない大きさとなる。さらに足場材料となるPGA不織布への接着性の良否も軟骨の再生誘導に重要な要素である。以上の視点から, 各サイズのマイクロ軟骨に含まれる細胞数および性状(図6), PGA不織布への接着性(図10-11), 移植5週目の再生軟骨組織(図12-14)を検証したところ, マイクロ軟骨の至適サイズは100  $\mu\text{m}$  と考えられた。これらの結果をふまえ, 今後さらなる条件の最適化を検証していく。

bFGF は種々の細胞に対して細胞増殖能の促進作用や血管新生作用を有し<sup>12</sup>, 軟骨細胞の増殖においては軟骨細胞の最終分化に伴うX型コラーゲン合成を阻害する作用がある<sup>13</sup>。以前の研究により, FGF 単回投与では *in vivo* 環境下における薬理効果が不十分であることが分かっている<sup>14</sup>。そこで近年ゼラチン粒子を用いた徐放化システムが開発され, bFGF を長期間安定的に供給することが可能となった<sup>15</sup>。一方, 細胞外基質に取り囲まれた軟骨細胞には FGF は到達しないことが報告されている<sup>16</sup>。そこで今回の研究では, ゼラチン微粒子を用いた bFGF 徐放化システムを移植軟骨片に塗布し, bFGF が移植軟骨片内部に存在する軟骨細胞に及ぼす影響について検討した(図7-9)。その結果, bFGF 徐放群では移植軟骨片が肥大化し, 再生軟骨の体積が約4倍に増大しうることが明らかとなった。すなわち bFGF 徐放化システム併用により, bFGF による生理的組織修復機構が効率的に働き, マイクロ軟骨内に存在する幹細胞の増殖がより促進される可能性が示唆される。ただし bFGF 徐放化システムの長期成績については未だ不明であり, これは今後の課題である。

近年, 間葉系幹細胞から軟骨細胞に至る分化制御において, SOX 系転写因子が重要な働きをしていることが明らかとなった<sup>7</sup>。中でも SOX5 および SOX6 は, あらかじめ SOX9 により分化誘導された間葉系細胞の凝集および軟骨細胞へのさらなる分化を促進し, 前軟骨芽細胞より軟骨芽細胞への分化を決定づける重要な役割を担っている<sup>17</sup>。本研究では, 移植後5週目の bFGF 徐放群における SOX5 陽性細胞の分布は, 組織学的に著しい細胞増殖像を示す移植軟骨片の辺縁領域に一致して認められた(図7)。また3種類の異なるサイズ(100  $\mu\text{m}$ , 200  $\mu\text{m}$ , 400  $\mu\text{m}$ )を有するマイクロ軟骨を用いた実験では, 特に100  $\mu\text{m}$  群においてマイクロ軟骨間の細胞外基質融合像



が観察され、PGA 不織布内部に薄く均一に分布していた(図12左)。一方で200  $\mu\text{m}$  および400  $\mu\text{m}$  の群では、そのような細胞外基質の融合像は観察されなかった(図12中央および右)。さらに SOX5 を組織学的に評価した場合、100  $\mu\text{m}$  マイクロ軟骨では SOX5 陽性細胞は軟骨辺縁部から中央部の全体に観察された(図14左)。一方、マイクロ軟骨サイズが大きくなるに従い、SOX5 陽性細胞は軟骨辺縁部に限局していた(図14中央および右)。このことから、前述の bFGF 徐放システムによる移植軟骨の量的拡大は SOX5 活性化を介した軟骨芽細胞の増殖および細胞外基質形成の亢進によるものと考えられた。かつその作用はマイクロ軟骨サイズに示される栄養拡散の距離に相関することが示唆された。今後、前述の bFGF 徐放化システムの長期成績の確認とともに SOX5 発現パターンの推移も経時的に評価していく予定である。

再生医療は、ヒトの細胞・組織を細胞加工(分離、増殖、分化)して用いる治療法であり、これまでの医療に存在しなかった細胞培養に伴うプロセスが含まれる。このため、既存の医療技術に加えて理工学的な知識・技術など、異分野の英知を結集し融合させることが求められる新たな医療分野である。これまで軟骨の再生誘導では、まず軟骨細胞を体外で細胞培養して増殖させ、次に足場材料に播種させ、作成した細胞・足場の複合体を体内に自家移植する方法が主流であった<sup>18</sup>。この方法では複数回の手術が必要となり、細胞培養は不可欠であった。本研究では、微細に加工したマイクロ軟骨を足場材料およびサイトカイン徐放化システムと組み合わせて移植する手法を提唱した。この手法では、効率よく安全に再生誘導を促すため、限られた生体軟骨組織から微細かつサイズの揃った大量のマイクロ軟骨を低侵襲的にかつ確実に切り出す加工技術が不可欠と考えられた。そこで微細加工装置を新たに開発し、再生誘導における新しい細胞供給源としてマイクロ軟骨を利用した。本法は、(1)一度の手術で採取から移植までの全工程(組織採取、マイクロ軟骨の作製、移植)が完結できるため手術室完結型の軟骨再生が可能であること、(2)現在主流の再生医療において必須とされる CPC を用いないため、細胞培養工程のない低コストの軟骨再生が可能となること、などの特徴を有していると考えられる。今後は本装置を用いて、低侵襲かつ有効的な術式の確立を進めていく予定である。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、ご指導・ご校閲を賜りました形成外

科学教室・磯貝典孝教授ならびに細菌学教室・藤田貢准教授に深甚な謝意を捧げます。また著者に開示すべき利益相反はありません。

## 文 献

1. Enjo M, Terada S, Uehara M, Itani Y, Isogai N (2013) Usefulness of polyglycolic acid-polypropylene composite scaffolds for three-dimensional cartilage regeneration in a large-animal autograft model. *Plast Reconstr Surg* 131: 335e-342e
2. Fulco I, et al. (2014) Engineered autologous cartilage tissue for nasal reconstruction after tumour resection: an observational first-in-human trial. *Lancet* 384: 337-346
3. Rotter N, et al. (2001) Age dependence of cellular properties of human septal cartilage: implications for tissue engineering. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 127: 1248-1252
4. Augustyniak E, Trzeciak T, Richter M, Kaczmarczyk J, Suchorska W (2015) The role of growth factors in stem cell-directed chondrogenesis: a real hope for damaged cartilage regeneration. *Int Orthop* 39: 995-1003
5. Zhang J, et al. (2003) Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425: 836-841
6. Itani Y, Asamura S, Matsui M, Tabata Y, Isogai N (2014) Evaluation of nanofiber-based polyglycolic acid scaffolds for improved chondrocyte retention and in vivo bioengineered cartilage regeneration. *Plast Reconstr Surg* 133: 805e-813e
7. Lefebvre V (2010) The SoxD transcription factors—Sox5, Sox6, and Sox13—are key cell fate modulators. *Int J Biochem Cell Biol* 42: 429-432
8. Peer LA (1954) Diced cartilage grafts. *J Int Coll Surg* 22: 283-291
9. Tanzer RC (1959) Total reconstruction of the external ear. *Plast Reconstr Surg Transplant Bull* 23: 1-15
10. Cronin TD (1966) Use of a silastic frame for total and subtotal reconstruction of the external ear: preliminary report. *Plast Reconstr Surg* 37: 399-405
11. Lu Y, et al. (2006) Minced cartilage without cell culture serves as an effective intraoperative cell source for cartilage repair. *J Orthop Res* 24: 1261-1270
12. Gospodarowicz D (1974) Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature* 249: 123-127
13. Noel D, Djouad F, Jorgense C (2002) Regenerative medicine through mesenchymal stem cells for bone and cartilage repair. *Curr Opin Investig Drugs* 3: 1000-1004
14. Tabata Y, Hijikata S, Muniruzzaman M, Ikada Y (1999) Neovascularization effect of biodegradable gelatin microspheres incorporating basic fibroblast growth factor. *J Biomater Sci Polym Ed* 10: 79-94

15. Shasti M, et al. (2014) Effects of FGF-2 and OP-1 in vitro on donor source cartilage for auricular reconstruction tissue engineering. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 78 : 416-422
16. Satoh H, et al. (1998) Functional analysis of diastrophic dysplasia sulfate transporter. Its involvement in growth regulation of chondrocytes mediated by sulfated proteoglycans. *J Biol Chem* 273 : 12307-12315
17. Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrughe B (2002) The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* 16 : 2813-2828
18. Nimeskern L, van Osch GJ, Muller R, Stok KS (2014) Quantitative evaluation of mechanical properties in tissue-engineered auricular cartilage. *Tissue Eng Part B Rev* 20 : 17-27