

コラゲナーゼ表面処理を行った微細加工軟骨の性状が 軟骨再生に及ぼす影響

末 吉 遊

近畿大学医学部形成外科学教室

Effect of collagenase digestion on cubic micro-cartilage for cartilage tissue engineering

Yu Sueyoshi, M. D.

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Faculty of Medicine, Kindai University

抄 録

われわれは、耳介軟骨を微細加工して軟骨細胞および細胞外基質を含む均一サイズのマイクロ軟骨を作製し、これを細胞供給源として新規軟骨再生技術の確立を試みてきた。本研究では、細胞外基質に注目し、マイクロ軟骨にコラゲナーゼ処理を加え、有用性、至適処理時間、およびマイクロ軟骨の必要播種量について検討した。方法：イヌ耳介軟骨で一辺を約 200 μm とするマイクロ軟骨を作製した。コラゲナーゼ処理後のマイクロ軟骨の形状を、粒度分布計、透過型・走査型電子顕微鏡で観察した。さらに免疫組織染色法で、細胞接着因子であるフィブロネクチンを染色し、コラゲナーゼ処理の効果を検討した (実験 1)。次に、コラゲナーゼ処理時間の異なる 3 群 (15, 60, 120 分) を設定し、至適処理時間を検討した (実験 2)。さらに播種するマイクロ軟骨量の異なる 4 群 (8, 12.5, 25, 50%) を設定し、播種量の最適化を検討した (実験 3)。結果：コラゲナーゼ処理によりマイクロ軟骨の細胞外基質表面は分解され、細胞外基質の粗造化と軟骨細胞の表面への露出を認めた。フィブロネクチンは、コラゲナーゼ処理時間が長い程増強していた。移植後10週目の結果より、最適な軟骨再生誘導条件は、コラゲナーゼ処理時間60分、マイクロ軟骨播種量12.5%、マイクロ軟骨間距離 548 μm であることが判明した。本法を用いた耳介形状軟骨の新規再生誘導法の有用性が示唆された。

Key words : 軟骨再生, 微細加工軟骨, コラゲナーゼ処理

緒 言

組織工学 (Tissue engineering) とは、吸収性ポリマーに細胞および成長因子を組み合わせて、生体に移植可能な組織を体内で再生誘導する技術である。1997年 Cao, Vacanti らはこの基盤技術を用いて、小動物モデル (免疫不全マウス) の背部皮下で複雑に湾曲するヒト耳介形状を反映する 3 次元軟骨組織の再生誘導に成功した¹。この報告により再生誘導技術は、将来、耳介形成手術において有用な治療方法となりうる可能性が示唆された。その後、この再生誘導技術を臨床応用する目的で、(1)播種細胞の種類

および細胞密度、(2)軟骨細胞増殖や基質産生を誘導するサイトカイン、(3)3次元形状を付与する吸収性ポリマー材料の性状・力学的強度・組織親和性、などの視点から、3次元ヒト耳介形状軟骨の再生誘導に関する数多くの研究結果が報告されてきた¹⁻⁷。さらに近年の再生誘導法に関する技術開発では、これまで必須とされてきた 3 大因子 (細胞, サイトカイン, 足場) 以外に、播種細胞とポリマー材料表面との間に形成されるバイオインターフェイスや組織微小環境などの問題が注目されており、これらに深く関与する細胞外基質、特に細胞接着タンパクの解明が急務となっている。

細胞は、細胞外基質の情報を読み取るセンサー分子を表面にもつ。一方、細胞と細胞の間を埋める細胞外基質には、様々なシグナル分子や細胞接着性タンパクが組み込まれており、軟骨細胞の増殖・分化の調整に深く関与していることが広く知られている。組織中で播種細胞がアポトーシスなどの細胞死を回避し、増殖するためには、細胞表面のセンサー分子が他の細胞や細胞外基質と接着・結合して、増殖シグナルを播種細胞内に伝達する機構（細胞内シグナル伝達）が必須となる。この点に関して、近年解明が進み、軟骨細胞の増殖には、細胞外基質中のフィブロネクチンからの増殖シグナルが必須であり、増殖の調整には軟骨細胞のインテグリンが関与している機序が明らかとされている^{8,9}。

軟骨の再生誘導では、播種細胞と細胞接着タンパクの結合が再生軟骨組織の性状に大きく影響する。そのため、細胞外基質成分を細胞供給源に含ませるという選択は、組織内微小環境を維持する上で極めて有効と考えられる。そこで、我々は、細胞外基質を含む最小単位の軟骨細胞塊を均一サイズの微細軟骨組織（以下マイクロ軟骨と略す）に分離加工して新たな細胞供給源とし、さらにサイトカインの併用により増殖・分化を加速することで、培養行程を介さない新規軟骨再生技術の確立を試みた。まず、(1)軟骨を低侵襲的に立方体形状に微細加工する装置を作製してマイクロ軟骨を作製し、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を行った。その結果、マイクロ軟骨内の細胞活性は90%以上であり、再生誘導に適したサイズは、一辺を約200 μm とするマイクロ軟骨であることを明らかとした。次に、(2)マイクロ軟骨を吸収性ポリマー材料に接着させ、マイクロ軟骨・吸収性ポリマー複合体にサイトカイン（塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF: basic fibroblast growth factor）にゼラチン微粒子を用いた徐放システム（DDS: Drug Delivery System）: bFGF-DDS）を組み合わせて自家移植を行い、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。その結果、サイトカインによるマイクロ軟骨の量的拡大が観察された。また、この量的拡大の機序として、SOX5の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が示唆された¹⁰。一方、外因性に添加したbFGFは、細胞外基質に取り囲まれた軟骨細胞には到達しないことが報告されている¹¹。そこでコラゲナーゼ表面処理により軟骨基質を部分的に分解すれば、bFGFがマイクロ軟骨内部に到達することが容易となり、軟骨細胞が増殖し、かつ、マイクロ軟骨表層に露出した細胞接着タンパクは増殖した軟骨細胞と結合する結果、軟骨再生が促進さ

れる機序が予測される。

そこで本研究では、マイクロ軟骨を用いた軟骨再生を促進する目的で、コラゲナーゼによる表面処理を加え、マイクロ軟骨表層の細胞外基質を酵素分解させた。実験では、マイクロ軟骨の表面性状の変化が自家移植後の軟骨再生誘導に及ぼす影響を明らかとすることを目的として、コラゲナーゼ表面処理によるマイクロ軟骨の形態変化（実験1）、軟骨再生におけるコラゲナーゼ表面処理の有用性と至適コラゲナーゼ処理時間（実験2）、およびマイクロ軟骨播種量の最適化（実験3）について検討した。

材料および方法

実験動物

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（承認番号 KAME-26-001）。本研究ではビーグル犬（12-24週齢、雌、浜口動物、兵庫）を用い、後述の実験1では4頭、実験2では12頭、実験3では12頭、計28頭を使用した。飼育は個別ケージ（室温23 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度50%、12時間明暗サイクル）で行った。飼育繁殖固形飼料 CD55 α （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）の臀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基部の軟骨を採取した。

実験1：コラゲナーゼ表面処理によるマイクロ軟骨の形態変化

出発原料であるイヌ耳介軟骨（サイズ：1 cm \times 1 cm \times 300 μm 、重量：85 mg）を微細加工装置にて微細加工し、1辺を200 μm とするマイクロ軟骨を作製した。次に0.3%コラゲナーゼ（Worthington, Lakewood, NJ）を用いて37 $^{\circ}\text{C}$ 下で振盪拡散させ、マイクロ軟骨の表面処理を行った。実験群として、コラゲナーゼ処理時間の異なる4群（0, 15, 60, 120分間）を設定した。その後、10%牛仔胎児血清（Sigma Aldrich, St. Louis, MO）を含むダルベッコ改変イーグル培地（Gibco, Grand Island, NY）にて酵素反応を停止させ、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）による遠心分離・洗浄を3回行った。レーザー回折／

散乱式粒度分布計 (Laser scattering particle size distribution analyzer, LS13320XR, Beckman Coulter, Inc. CA) を用いて、作製したマイクロ軟骨の粒度分布を測定した。またマイクロ軟骨の形態学的検索を行うため、表面性状を走査電顕、断面形態を光顕および透過電顕を用いて検討した (図 1)。さらに細胞接着因子であるフィブロネクチン発現について免疫組織染色法を用いて検討した。

マイクロ軟骨の粒度分布: マイクロ軟骨を PBS 溶液に懸濁した。その後、レーザー回折/散乱式粒度分布計を用いて散乱光強度の角度分布から、マイクロ軟骨の平均径 (マイクロ軟骨の平均径) およびモード径 (最頻値を示すマイクロ軟骨の平均径) を算出した。

走査型電子顕微鏡: 各群のマイクロ軟骨を、2.5% グルタルアルデヒド液 (緩衝液: 0.1 M リン酸緩衝液, pH 7.4) にて前固定した。緩衝液にて洗浄 (10分, 6回), 1% 四酸化オスミウム (4°C, 60分) にて後固定を行った。次に緩衝液にて洗浄 (10分, 6回) を行った。さらに50%, 70%, 80% エタノール処理 (4°C, 60分), 90%, 95%, 99.5% エタノール処理 (4°C, 15分) し, 99.5% エチルアルコール処理 (15分, 3回) して脱水した。その後、t-ブチルアルコールで浸漬 (20分, 3回) を行い, 試料を凍結させ, 凍結乾燥装置にて凍結乾燥を行った。作成した試料を載台し, 白金-パラジウムを 5 nm コー

ティングして導電処理を行い, 走査型電子顕微鏡 (SU-3500, 日立製作所, 東京) を用いてマイクロ軟骨の表面性状を観察した。

光顕・透過電顕: 走査電顕の試料作製と同様に, 前固定, 後固定, 脱水を行った。その後 QY-1, エポキシ樹脂にて置換を行った。試料を樹脂包埋 (50°C 1日間, 60°C 2日間) した後, ミクロトームにて 1.5 μm に薄切し, toluidine blue 染色を行った。切除範囲を決定した後, ミクロトームにて 70 μm に薄切し, その後 3% ウラン水溶液, 佐藤鉛にて染色して透過型電子顕微鏡 (HT7700, 日立製作所, 東京) を用いて観察した。

免疫組織染色 (immunohistochemical staining, IHC): イヌ耳介軟骨を微細加工装置にて微細加工し, 0.3% コラゲナーゼ溶液で, マイクロ軟骨の表面処理を行った。酵素反応を停止させ, 10% 中性緩衝ホルマリンで固定した。試料をパラフィン包埋した後, ミトクロームにて 3 μm に薄切した。組織切片を脱パラフィン処理した後, 抗原賦活として, クエン酸緩衝液 (pH 6, DAKO, 東京) での Microwave 処理 (70°C, 50分) を行った。抗原賦活化した切片をトリスヒドロキシメチルアミノメタン緩衝液 (TBS, pH 7.4, DAKO, 東京) で洗浄後, 3% 過酸化水素で内因性ペルオキシダーゼを Cat Anti-Fibronectin (ab2413, 200倍希釈, abcam, Cambridge, MA) を使用し, 室温で60分反応させた。TBS で洗浄後, HRP

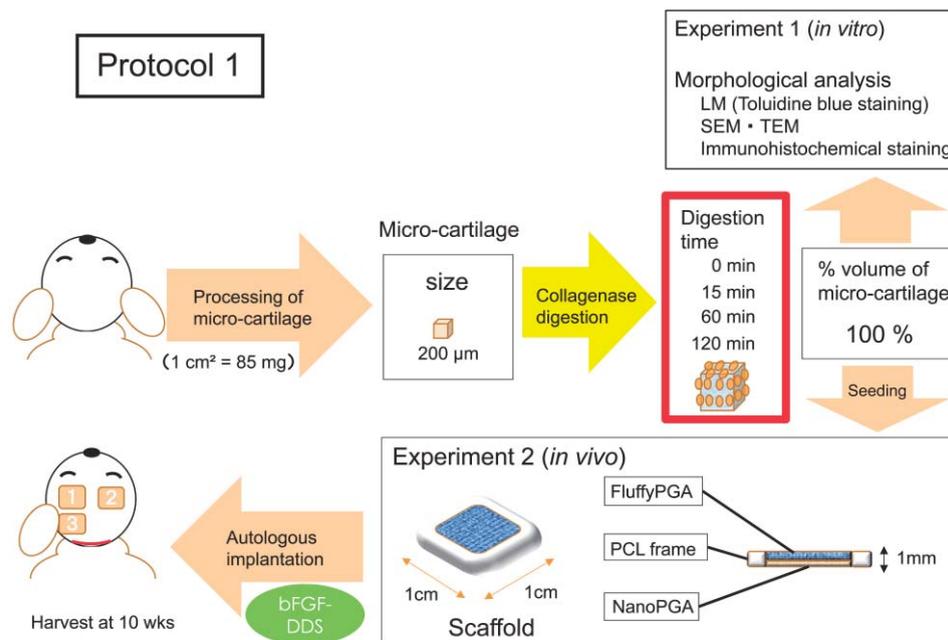


図 1 実験 1 (コラゲナーゼ表面処理によるマイクロ軟骨の形態変化) および実験 2 (軟骨再生におけるコラゲナーゼ処理の有用性と至適コラゲナーゼ処理時間) のプロトコル。実験 1: 播種前のマイクロ軟骨の評価。実験 2: 播種後10週目の再生軟骨組織の評価。

標識ポリマー試薬 (DAKO, 東京) を室温で30分反応させ, TBS 洗浄後, DAB (ニチレイバイオサイエンス, 東京) にて発色させた。

実験 2 : 軟骨再生におけるコラゲナーゼ処理の有用性と至適コラゲナーゼ処理時間

複合型吸収性ポリマーと同面積の耳介軟骨片 (10 mm×10 mm) を採取した。実験 1 と同様に, 微細加工装置を用いてマイクロ軟骨 (200 μm) を作製し, コラゲナーゼ表面処理時間の異なる 4 群を設定した。このマイクロ軟骨を複合型吸収性ポリマーに播種した。播種時には, PGA (Polyglycolic acid) 不織布の浸透許容量を考慮してマイクロ軟骨を PBS 200 μl 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を行った。マイクロ軟骨を播種した複合型足場の皮下移植操作は, 以下の手順で行った。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, 後頸部に約 5 cm の切開を加え, 浅深側頭筋膜上で剥離した。次に浅筋膜と深筋膜の間に移植床を作製し, 事前に準備したマイクロ軟骨・複合型吸収性ポリマー複合体を自家移植した。自家移植時には, 複合体の表裏面に bFGF-DDS を同時投与した。閉創は 5-0 合成糸 (シグマ, 東京) にて行った。移植後 10 週目に組織採取し, 組織学的検討を行った (図 1)。

複合型吸収性ポリマー (PGA-nanoPGA-PCL) の作製: PGA 紡糸をニードルパンチ法にて不織布化し, 繊維径 20 μm の不織布 (10 mm×10 mm, 厚さ 0.15 mm, 体積密度 0.23 g/cm³, 空隙率 84.4%) を作製した。次にメルトブロー法 (熔融 PGA を多細孔より押し出して繊維形状とし, さらに熱風により延伸交絡) を用いて, 繊維径 1.2 μm のポリグリコライドからなる nanoPGA 不織布 (10 mm×10 mm, 厚さ 0.08 mm, 体積密度 0.10-0.14 g/cm³, 空隙率 90.5-93.4%) を作製した。また PCL フレームの作成は以下の手順で行った。ポリマー溶液 (5% 1,4-ジオキサン体積密度 0.10-0.14 g/cm³, 空隙率 90.5-93.4%) を穏やかに注入し, -40°C で 1 時間静置した。次にポリマーを型より取り出し, 40 Pa, -40°C, 12 時間の条件下に凍結乾燥処理した (TF10-80TA, 宝製作所, Tokyo, Japan)。最後に真空乾燥 (60°C, 12 時間) にてモノマーおよび溶媒除去を行い, 棒状 PCL (40 mm×10 mm, 厚さ 1 mm) を作製した。上記の操作で作製した nanoPGA を PGA 不織布の底面に重ねた後に, PCL フレームを用いて 2 つの不織布を囲い込み, 熱架橋にて結合させて複合型吸収性ポリマーを作製した。作製した複合型吸収性ポリマーは, エチレンオキサイドにてガス滅菌した。

bFGF 徐放システム (bFGF-DDS) 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¹²。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, 5000 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 5000 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。次に, ゼラチン微粒子に bFGF を含浸させるため, bFGF 100 μg (トラフェルミン, 科研製薬, 東京) を Ca²⁺, Mg²⁺ 不含リン酸緩衝液 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。

組織学的検索: 移植後 10 週目に試料の採取を行い, 10% 中性緩衝ホルマリンで固定した。試料をパラフィン包埋した後, ミトクロームにて 3 μm に薄切した。組織学的評価では, 軟骨マーカーである酸性プロテオグリカンを染色するためにサフラニン O 染色を施行した。軟骨細胞の細胞接着因子であるフィブロネクチン, 転写因子として重要な SOX5, さらに細胞増殖と細胞周期のマーカーである Ki67 の発現および局在について, 免疫組織学的検索を行った。フィブロネクチンの免疫組織染色は, 前述と同様の方法にて実施した。SOX5 および Ki67 の免疫染色は, 以下の方法で行った。組織切片を脱パラフィン処理した後, 抗原賦活として, SOX5 染色用はクエン酸緩衝液 (pH 6, DAKO, 東京) での Microwave 処理 (70°C, 50 分), Ki67 染色用はクエン酸緩衝液 (pH 6, DAKO, 東京) でのオートクレーブ処理 (120°C, 5 分) を行った。抗原賦活化した切片を 1x TBS (pH 7.4) で洗浄後, 0.3% 過酸化水素で内因性ペルオキ

シダーゼを不活化した。TBS で洗浄後、一次抗体として Rabbit Anti-SOX5 (ARP33323, 100倍希釈, Aviva Systems Biology, San Diego, CA), Rabbit Anti-Ki67, (ab15580, 200倍希釈, Abcam, USA) を使用し、室温で60分反応させた。TBS で洗浄後、DAB (ニチレイバイオサイエンス, 東京) にて発色させた。

再生軟骨量の定量的解析：再生軟骨量を比較検討するため、デルマパンチ (直径 5 mm) にてイヌ耳介軟骨を採取した。採取組織は10%ホルマリン固定、パラフィン包埋、ミトクロームによる薄切 (3 μm) の後、サフラニンO染色を施した。得られた組織切片より軟骨の厚さを Image J を用いて測定した。その結果、採取したイヌ耳介軟骨の厚さは、298.8±18.0 μm であった。そこで採取軟骨の基準断面積は、複合型吸収性ポリマーの横軸長 (10 mm) を乗じた 3.0 × 10⁶ μm² とした。移植後10週目で採取した再生軟骨組織のサフラニン陽性断面積を基準断面積で除算し、100を乗じたものを再生軟骨量 (%) とした。

実験 3：マイクロ軟骨播種量の最適化

実験 3 では、実験 2 と同様に、コラゲナーゼを用いてマイクロ軟骨の表面処理を行った。その後マイクロ軟骨を PBS にて洗浄 (15分) し、複合型吸収性ポリマーに播種した。実験群として、播種するマイクロ軟骨量の異なる 4 群 (50, 25, 12.5, 8 %) を設定した。作製したマイクロ軟骨・複合型吸収性ポリマーの複合体は、前述のサイトカイン (bFGF-DDS) と組み合わせて自家移植した (図 2)。

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 Bonferroni /Dunn 法で判定を行った。各群間において、p<0.01 および p<0.05 で有意差ありと判定した。

結 果

実験 1：コラゲナーゼ表面処理によるマイクロ軟骨の形態変化

微細加工軟骨装置により微細加工されたマイクロ軟骨の粒子径が、コラゲナーゼ表面処理によりどのように変化するかについて、粒度分布計を用いて検討した。その結果、コラゲナーゼ表面処理によりマイクロ軟骨の Mode 径は低値を示し、コラゲナーゼ未処理群 (255.5±55.8 μm) に比較して、15分群 (245.5±30.5 μm) では約96%，60分群 (185.5±15.5 μm) では約73%，120分群 (136.7±17.7 μm) では約54%の粒子径減少が認められた (図 3)。コラゲナーゼ表面処理を行ったマイクロ軟骨を複合型吸収性ポリマーに播種した後、マイクロ軟骨の形態変化を観察した。肉眼所見では、処理時間に伴いマイクロ軟骨の組織量は減少する傾向が観察された (図 4)。次にトルイジンブルー染色を用いた組織学的検討では、コラゲナーゼ処理に伴いマイクロ軟骨表層の細胞外基質分解が促進され、マイクロ軟骨内部の軟骨細胞が表層に露出される傾向が認められた。特に、120分群では、細胞外基質分解が進みマイクロ

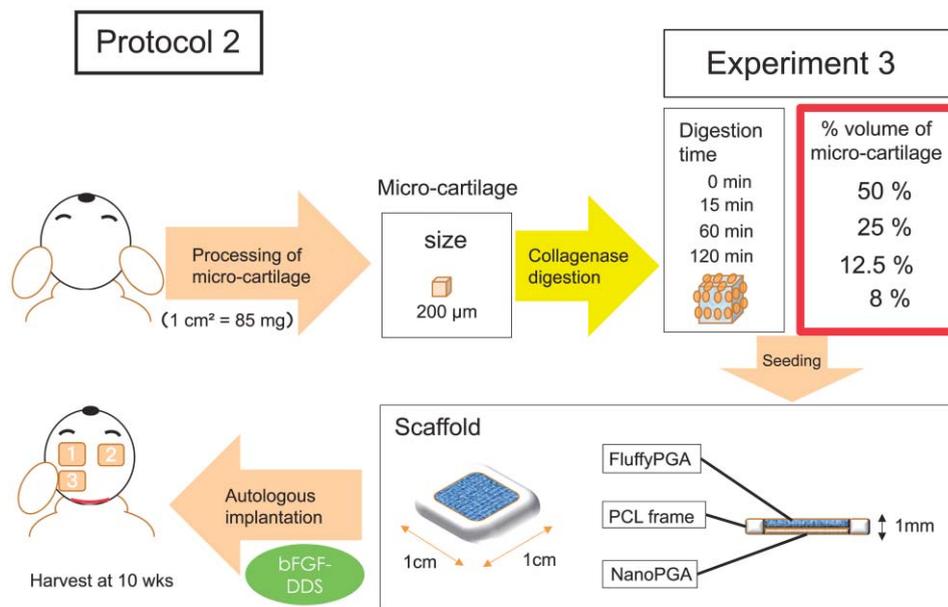


図 2 実験 3 (マイクロ軟骨播種量の最適化) のプロトコール

軟骨の3次元形状が維持されず、軟骨細胞は散在性に分布していた(図5)。さらに走査型電子顕微鏡(SEM)および透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて、マイクロ軟骨の表面および断面性状の微細構造を検討した。その結果、コラゲナーゼ未処理群では、マイクロ軟骨の表面性状が平滑であり、軟骨細胞は細胞外基質に被覆されていた。一方、コラゲナーゼ処理群(15分群および60分群)では、表面性状は粗造化し、軟骨細胞がマイクロ軟骨表面へ露出する傾向が著明となった。120分群では、細胞外基質が分解しており軟骨細胞および軟骨基質の観察は不能で

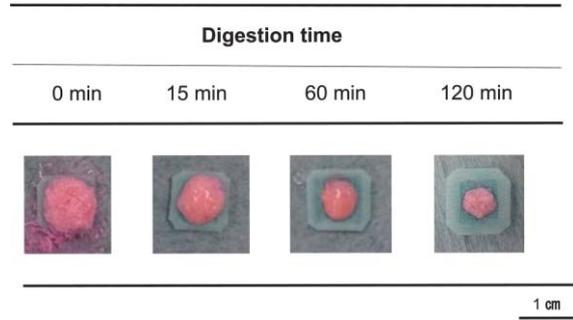


図4 コラゲナーゼ表面処理後におけるマイクロ軟骨の肉眼所見(複合型吸収性ポリマーに播種後)

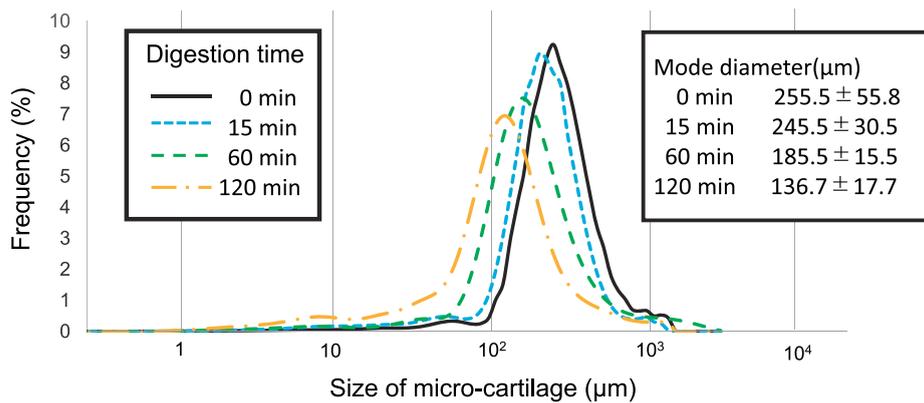
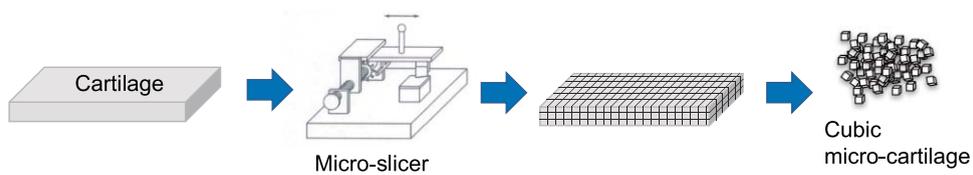


図3 コラゲナーゼ表面処理後におけるマイクロ軟骨の粒度分布

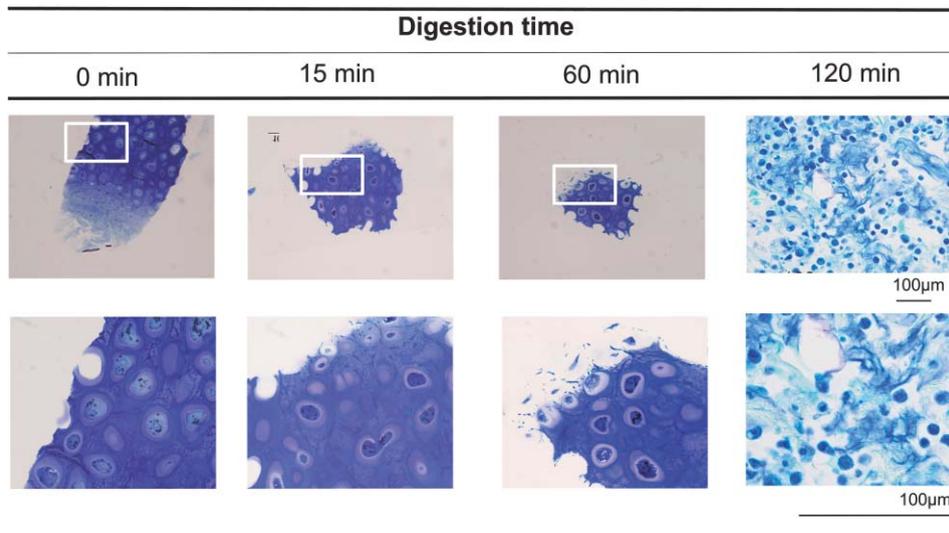


図5 コラゲナーゼ表面処理後におけるマイクロ軟骨の組織変化(トルイジンブルー染色)

あった(図6)。細胞接着因子としてフィブロネクチンを選択し、その発現を検討した。その結果、コラゲナーゼ処理群において発現を認め、フィブロネクチンの発現は60分群、120分群において、マイクロ軟骨の細胞外基質全体に及び、増強していた。一方、コラゲナーゼ未処理群ではフィブロネクチンの発現を認めなかった(図7)。

実験2：軟骨再生におけるコラゲナーゼ処理の有用性と至適コラゲナーゼ処理時間

移植10週目の標本を採取し、各群におけるサフラニンO陽性断面積から再生軟骨量を算出し、比較検討した。その結果、コラゲナーゼ未処理群($79 \pm 8.3 \times 10^5 \mu\text{m}^2$)の再生軟骨量は、本来の軟骨に比較し

て、約2.5倍増加していた。一方、15分群($127 \pm 23.1 \times 10^5 \mu\text{m}^2$)、60分群($122 \pm 17.6 \times 10^5 \mu\text{m}^2$)、および120分群($132 \pm 96.1 \times 10^5 \mu\text{m}^2$)の再生軟骨量は、約4倍増加していた(図8)。

各実験群における再生軟骨の接着因子、細胞増殖、および分化を評価する目的で免疫染色をおこなった。フィブロネクチン発現を検討した結果、15分群および60分群のマイクロ軟骨周辺部に一致して、フィブロネクチン発現が亢進し、軟骨再生に寄与している機序が示唆された。一方、未処理群では、フィブロネクチン発現は著明に減弱し、120分群では発現が認められなかった(図9)。次に細胞増殖マーカーとして選択したKi67の発現を検討した。その結果、未処理群、15分群および60分群のマイクロ軟骨およ

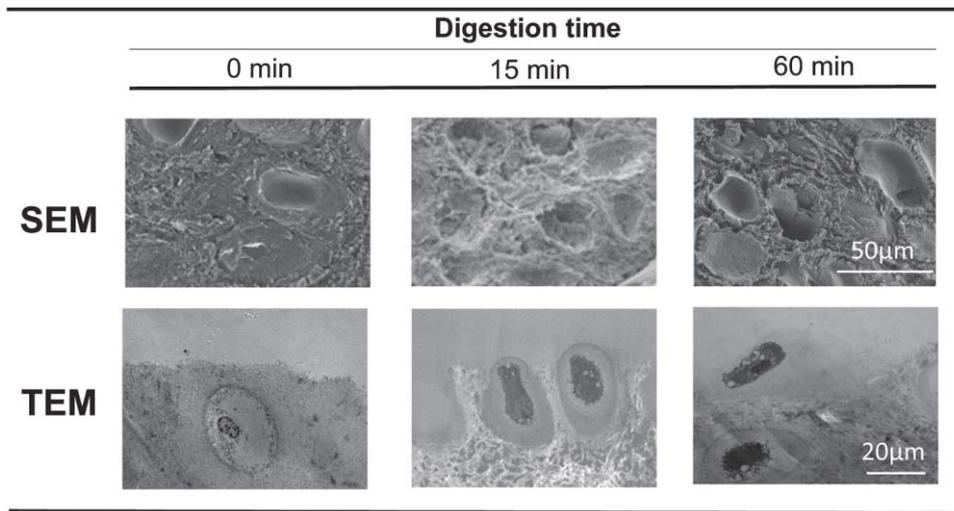
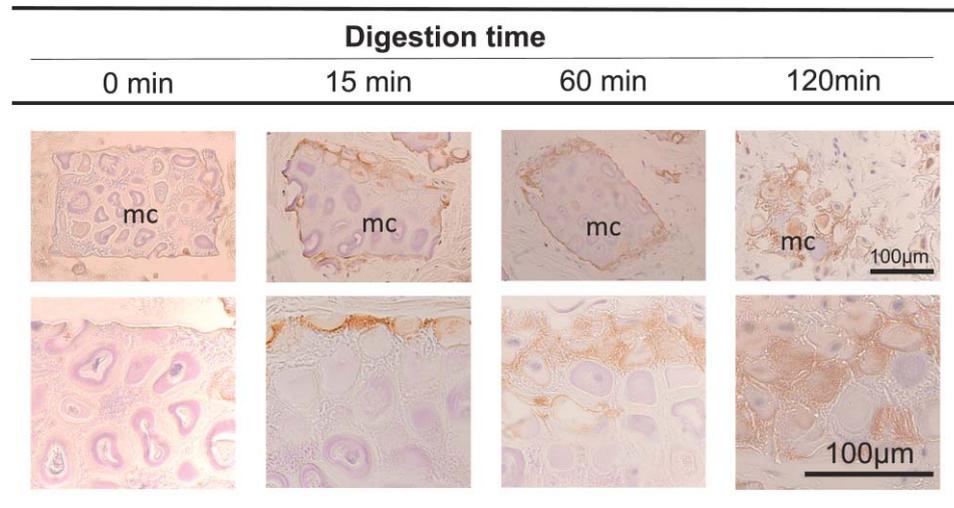


図6 コラゲナーゼ表面処理後におけるマイクロ軟骨の微細構造の変化(走査および透過電顕像)



mc: micro-cartilage

図7 コラゲナーゼ表面処理後におけるマイクロ軟骨のフィブロネクチン発現(免疫組織染色像)

び周辺の再生軟骨領域において、Ki67 陽性細胞が観察された。一方、120分群においては、マイクロ軟骨内の Ki67 陽性細胞は観察されなかったが、再生軟骨領域のみに Ki67 陽性細胞が認められた。この結果から、全ての実験群において、再生軟骨領域の軟骨細胞増殖能は維持されていることが示唆された(図10)。さらに軟骨分化因子である SOX5 の発現を検討した。その結果、60分群において、マイクロ軟骨周囲の再生軟骨領域に数多くの SOX5 陽性細胞が観察された。未処理群および120分群では、SOX5 陽

性細胞が観察されなかった。この結果から、軟骨分化は60分群において最も促進していることが示唆された(図10)。

実験3：マイクロ軟骨播種量の最適化

移植10週目の標本を採取し、マイクロ軟骨播種量とサフラニンO陽性面積との相関を検討した。その結果、全ての群において、マイクロ軟骨播種量の増加に伴いサフラニン陽性断面積が増加し、マイクロ軟骨播種量とサフラニン陽性断面積は正の相関を示

Digestion time			
0 min	15 min	60 min	120 min
Gross morphology			
			
Safranin O			
			
Safranin O ⁺ area (× 10 ⁵ μm ²)			
79 ± 8.3	127 ± 23.1	122 ± 17.6	132 ± 96.1
Growth of neocartilage (%)			
263	422	407	441

図8 自家移植後10週目におけるマイクロ軟骨（コラゲナーゼ表面処理後）を用いた軟骨再生（サフラニンO染色）

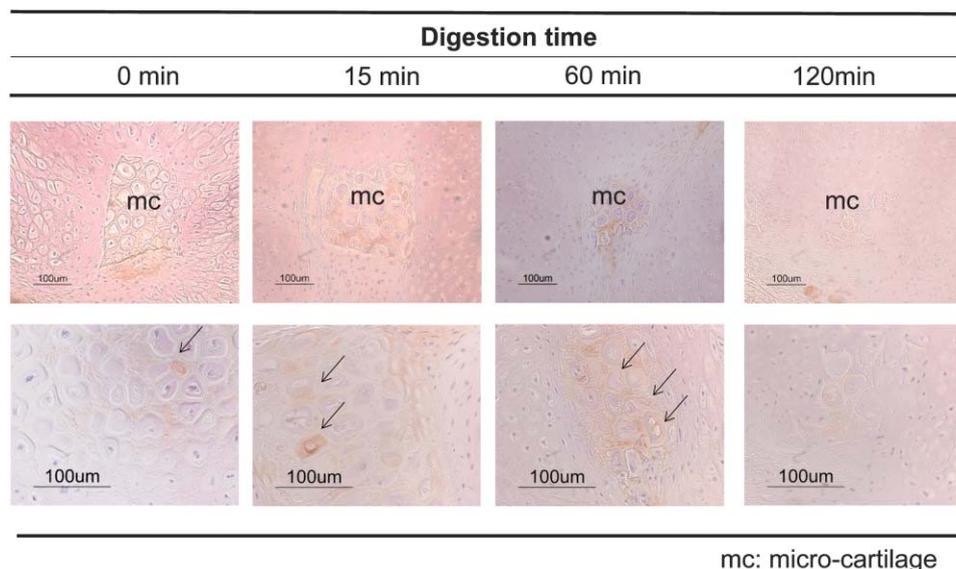


図9 自家移植後10週目におけるマイクロ軟骨（コラゲナーゼ表面処理後）を用いた軟骨再生（免疫組織染色法を用いたフィブロネクチン発現）
矢印は、陽性発現部位を示す。

した。また、コラゲナーゼ表面未処理群と比較して、表面処理群ではサフラニンO陽性断面積は高値となる傾向が認められた。さらにコラゲナーゼ表面処理群の中では、サフラニンO陽性断面積は60分群において最も高くなる傾向が観察された(図11)。次にマ

イクロ軟骨播種量と再生軟骨量の相関を調べた。その結果、マイクロ軟骨8%播種群では、コラゲナーゼ表面処理時間に関係なく、再生軟骨量は基準断面積($3 \times 10^6 \mu\text{m}^2$)に比較して低値を示した。マイクロ軟骨12.5%および25%播種群では、コラゲナーゼ

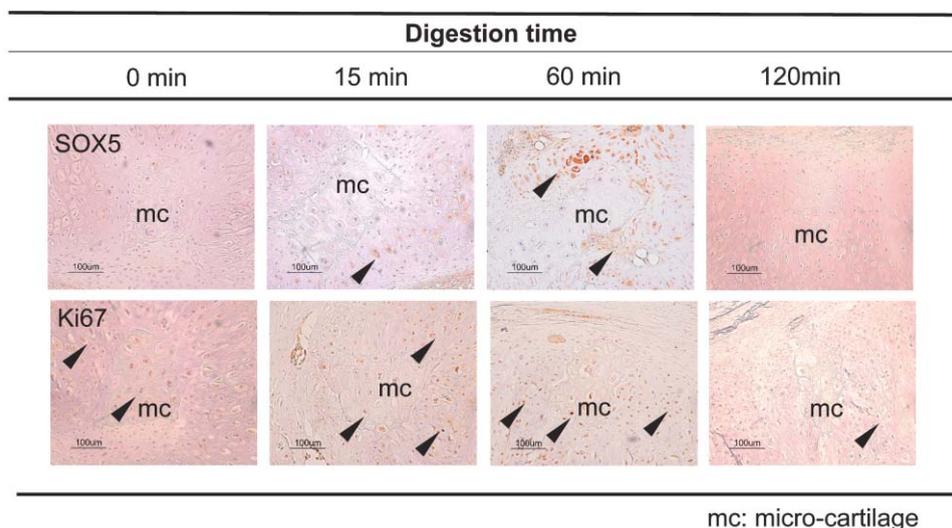


図10 自家移植後10週目におけるマイクロ軟骨(コラゲナーゼ表面処理後)を用いた軟骨再生(免疫組織染色法を用いたKi67およびSOX5発現) 矢印は、陽性発現部位を示す。

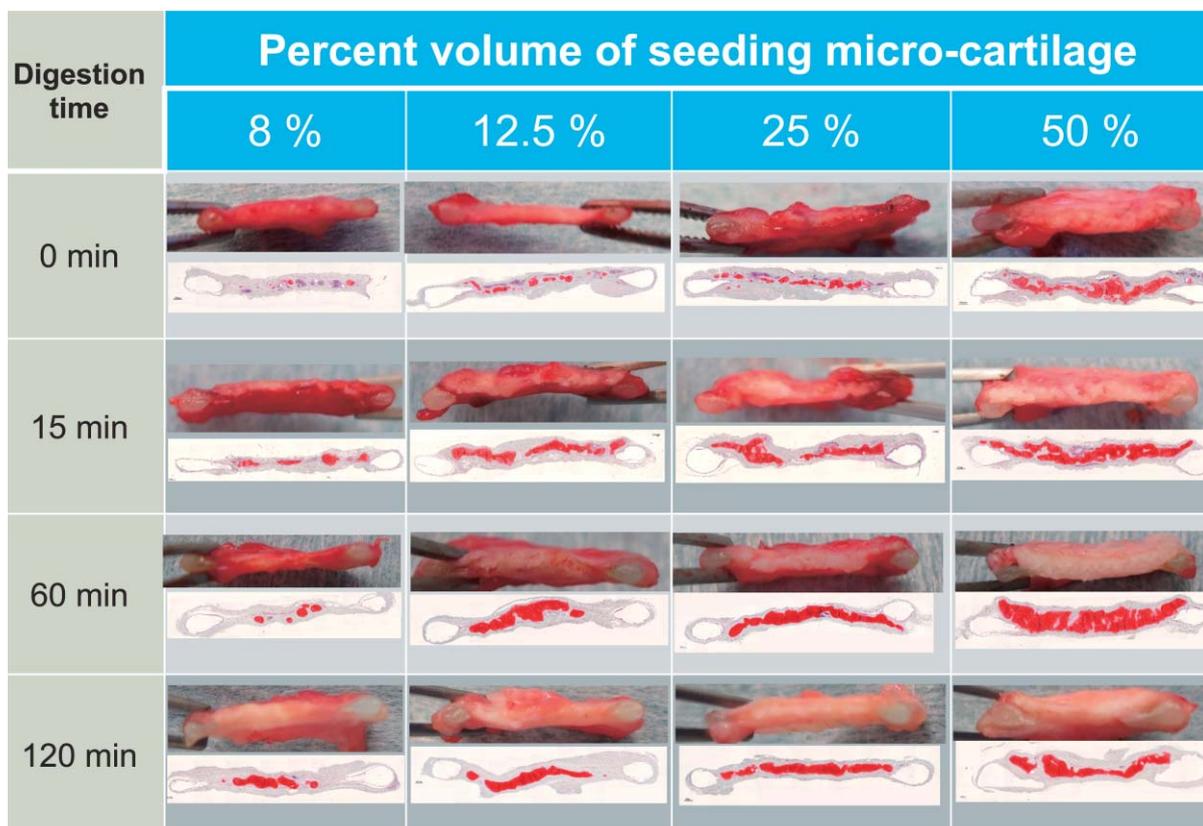
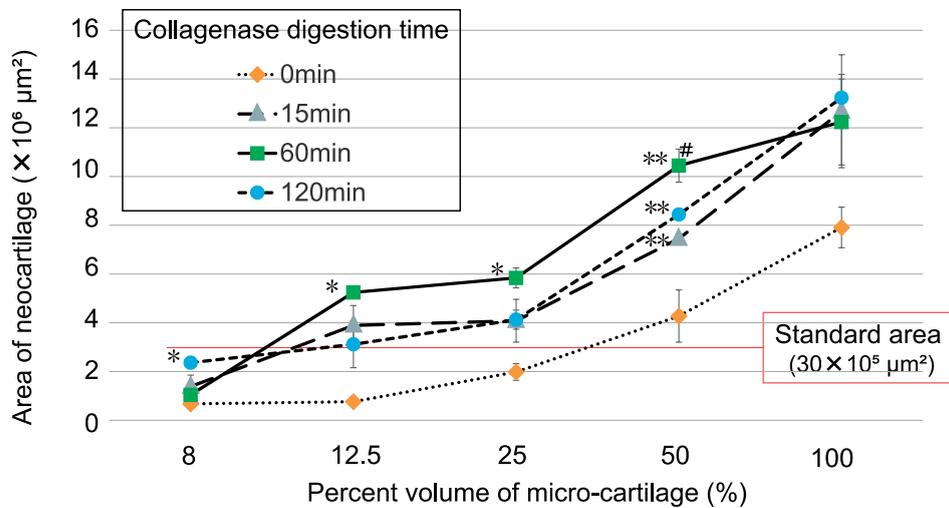


図11 異なるマイクロ軟骨量(コラゲナーゼ表面処理後)を播種した軟骨再生(自家移植後10週目, サフラニンO染色)

表面処理群の再生軟骨量は、基準断面積 ($3 \times 10^6 \mu\text{m}^2$) に比較して高値を示した。コラゲナーゼ表面処理群の中では、60分群が未処理群と比較して有意に高い再生軟骨量を示した ($p < 0.05$)。マイクロ軟骨50%播種群では、コラゲナーゼ処理の有無に関係なく再生軟骨量は基準断面積 ($3 \times 10^6 \mu\text{m}^2$) に比較して高値を示した。またコラゲナーゼ未処理群と比較して、全てのコラゲナーゼ処理群において有意に高い再生軟骨量を示した ($p < 0.01$)。

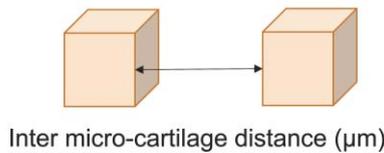
以上の結果より、マイクロ軟骨12.5%、25%およ

び50%播種群において、コラゲナーゼ表面処理時間を60分とした際、再生軟骨量は基準断面積 ($3 \times 10^6 \mu\text{m}^2$) と比較して有意に高値を示した (図12)。さらにマイクロ軟骨播種量と再生軟骨量から、マイクロ軟骨を播種する際のマイクロ軟骨間至適距離を算出した。その結果、コラゲナーゼ表面処理時間を60分間、マイクロ軟骨播種量を12.5%群に設定した場合のマイクロ軟骨間至適距離は $548 \mu\text{m}$ であった (図13)。



Statistical significance was determined at $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**) levels for specimens compared with the control (0 minute for collagenase digestion), and at $p < 0.05$ (#) for samples compared between 15 and 60 minutes collagenase digestion.

図12 マイクロ軟骨 (コラゲナーゼ表面処理後) を用いた軟骨再生における播種軟骨量と再生軟骨量の関係



Inter micro-cartilage distance (μm)	%volume of seeding micro-cartilage				
	8%	12.5 %	25 %	50 %	100 %
	208.6	548.0	358.1	327.8	203.9

Size of micro-cartilage: 200 μm
Collagenase digestion time: 60 min

図13 異なるマイクロ軟骨量 (コラゲナーゼ表面処理後) を播種した軟骨再生における至適マイクロ軟骨間距離 (μm)

考 察

従来、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てきたが、再生軟骨組織の成熟度と形状維持に関する長期成績は好ましくない¹。これまでの軟骨再生誘導に関する基礎研究から、不適切な細胞供給源による軟骨再生誘導では、再生軟骨組織の成熟度が制限され¹³⁻¹⁵、石灰化が生じやすく^{16,17}、また形状維持が困難である¹⁸⁻²⁰ことが報告されてきた。近年、骨髄由来幹細胞や脂肪由来幹細胞など種々の幹細胞を用いた研究が進み、再生誘導においては組織特異的な幹細胞が必須であることが報告された²¹。特に耳介軟骨の再生誘導では、耳介軟骨膜に存在する軟骨膜幹細胞が同定され、耳介本来の組織構造である軟骨膜と軟骨組織を同時再生しうることが報告されている^{22,23}。細胞は常に最適化された細胞外基質という外環境に覆われているが、特に幹細胞の増殖・維持には、最適化された細胞外微小環境（ニッチ、niche）が必要であると考えられている²⁴。ニッチの詳細は未だ不明であるが、様々な増殖因子を組み込んだ細胞外基質がその実体であることが推察される。組織工学という新しい医療を臨床の場に根付かせるには、個々の細胞に最適化された細胞外環境が重要であり、本研究では、幹細胞を含めた軟骨細胞および細胞外微小環境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に分離加工して新たな細胞供給源とし、マイクロ軟骨を用いた新規軟骨再生技術の開発と確立を試みた。

再生された耳介形状軟骨を変形させずに長期形状維持するためには、軟骨再生の誘導過程において成熟したコラーゲンやエラスチンが再生軟骨内部に構築されなければならない。この点に関して、bFGFおよびTGF β 1を再生過程において投与すれば、形態学的、生化学的にも正常軟骨組織と区別できない成熟した軟骨組織が誘導できることが近年報告された^{25,26}。特に耳介に代表される弾性軟骨の再生誘導においては、bFGFの投与が必須であることが追加報告された²⁷。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ている²⁸。軟骨細胞においては、軟骨細胞を増殖させ、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機序が知られている²⁹。一方、bFGF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ため、近年、ゼラチン粒子を用いた徐放システムが開発された³⁰。このbFGF-DDSにより、bFGFを長期間安定的に供給することが可能となったが、軟骨組織では軟骨細胞が細胞外基質に取り囲まれているため、bFGFが細胞に到達しないことが報告されている¹¹。

そこで今回の研究では、コラゲナーゼ表面処理によりマイクロ軟骨の細胞外基質を部分的に分解させ、表層に露出した細胞接着タンパクとbFGF-DDSにより増殖した軟骨細胞が結合する結果、軟骨再生が促進される機序を仮説として考えた。実験1の結果より、コラゲナーゼ表面処理により軟骨基質は分解され、マイクロ軟骨の粒子径が減少することが明らかとなった。またマイクロ軟骨内部の軟骨細胞は、マイクロ軟骨表層に露出する傾向を示し、投与bFGFがより容易にマイクロ軟骨内部に到達しうることが示唆された。

これまで細胞外基質は、解剖学的に細胞と細胞の隙間を埋める物理的な構造物として理解されてきた。近年、細胞外基質から細胞に向けて、細胞の増殖・分化を制御するシグナルが伝達されることが明らかにされ、細胞外基質の細胞機能制御因子としての役割が注目されている^{8,9}。細胞外基質の主要成分はコラーゲンであるが、それ以外に各種プロテオグリカン、フィブロネクチンやラミニンのような細胞接着性タンパクやエラスチンのような構造タンパク質などが含まれている。細胞は、細胞表面に発現しているセンサー分子を動員して、細胞外基質に書き込まれた情報を読み取り、その情報に従って細胞死を回避し、増殖、分化、形質発現の制御を行っている。

本研究では、コラゲナーゼ表面処理を行ったマイクロ軟骨における細胞接着因子であるフィブロネクチンの発現を検討した。フィブロネクチンは巨大な糖タンパク質であり、インテグリンと結合することが知られている。細胞表面のインテグリンに結合したフィブロネクチン分子は、結合後に折りたたまれたフィブロネクチンの二量体構造が開き、内部に隠れていたフィブロネクチン結合部位が分子表面に露出して、周囲のフィブロネクチン分子やヘパラン硫酸プロテオグリカンと結合して安定した細胞外基質を形成する³¹。

一方、インテグリンは、フィブロネクチンのレセプターとして1985年に発見された細胞膜にあるタンパク質で、細胞と細胞（細胞接着）、細胞と細胞外基質（細胞-基質接着）間のシグナル伝達を担っている。近年、軟骨細胞の増殖には、細胞外基質中に存在する細胞接着因子フィブロネクチンからの増殖シグナルが必須であり、細胞増殖の調整には軟骨細胞のインテグリンがレセプターとして関与することが明らかとされた^{8,9}。そのため軟骨再生誘導では、細胞供給源とともに、細胞外基質を主体とする細胞外微小環境の検討は不可欠と考えられた。実験1の結果より、コラゲナーゼ表面処理60分群において、マイクロ軟骨の細胞外基質にフィブロネクチンが最

も強く発現し、フィブロネクチンとインテグリンの結合を介して軟骨再生に最も大きく寄与することが推察された。

実験2では、自家移植モデル(イヌ)を用いて、コラゲナーゼ表面処理およびbFGF-DDSを併用した軟骨再生を行った。その結果、再生軟骨量はbFGF-DDSにより基準断面積($3 \times 10^6 \mu\text{m}^2$)の約2倍に、コラゲナーゼ表面処理を追加使用した場合には約4倍に増加することが明らかとなった。さらに免疫組織染色の結果、至適コラゲナーゼ表面処理時間は60分であり、この条件下において、マイクロ軟骨自体の細胞増殖能および細胞分化能が最も促進されることが判明した。すなわちマイクロ軟骨を細胞供給源とする軟骨再生を行う場合、従来のbFGF-DDSにコラゲナーゼ表面処理を併用することにより、bFGFの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を含めた軟骨細胞の増殖が促進される可能性が示唆された。実験3では、マイクロ播種量の最適化について検討した。その結果、コラゲナーゼ表面処理時間を60分、マイクロ軟骨播種量を12.5%、マイクロ軟骨間距離を $548 \mu\text{m}$ の条件下でマイクロ軟骨を播種すれば、再生軟骨量は基準断面積($3 \times 10^6 \mu\text{m}^2$)の約2倍に達することが判明した。本条件下で再生誘導しうる軟骨量は、出発材料となる耳介軟骨量の約16倍(マイクロ軟骨播種量(8x)×再生軟骨量(2x))となり、マイクロ軟骨を細胞供給源とする軟骨再生において、最適な誘導条件であることが示唆された。

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³²。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、微細加工したマイクロ軟骨にコラゲナーゼ表面処理して細胞供給源とし、その後、足場材料およびサイトカイン徐放システムと組み合わせて移植する手法を提唱した。また、至適コラゲナーゼ表面処理時間および播種マイクロ軟骨の最適化を検討した。この手法を導入することにより、限られた生体軟骨組織から臨床応用に必要な軟骨量を低侵襲で効率的に再生誘導しうる可能性が示唆された。また本法は、(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細胞培養施設を用いないため、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。マイクロ軟骨を正確に足場に

播種する播種装置の開発が急務であり、今後、本法を用いた耳介軟骨形状軟骨の再生誘導法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に深甚な謝意を捧げます。ご協力いただきました京都大学ウイルス・再生医科学研究所再生組織構築研究部門田畑泰彦教授、近畿大学ライフサイエンス研究所堀内喜高副技師長に心より感謝申し上げます。なお、開示すべき利益相反はありません。

文 献

1. Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast Reconstr Surg.* 1997; 100: 297-302.
2. Haisch A, Klaring S, Groger A, Gebert C, Sittinger M. A tissue-engineering model for the manufacture of auricular-shaped cartilage implants. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2002; 259: 316-321.
3. Shieh SJ, Terada S, Vacanti JP. Tissue engineering auricular reconstruction: in vitro and in vivo studies. *Biomaterials.* 2004; 25: 1545-1557.
4. Britt JC, Park SS. Autogenous tissue-engineered cartilage: evaluation as an implant material. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998; 124: 671-677.
5. Rodriguez A, et al. Characteristics of cartilage engineered from human pediatric auricular cartilage. *Plast Reconstr Surg.* 1999; 103: 1111-1119.
6. Reiffel AJ, et al. High-fidelity tissue engineering of patient-specific auricles for reconstruction of pediatric microtia and other auricular deformities. *PLoS One.* 2013; 8(2): e56506.
7. Nimeskern L, van Osch GJVM, Muller R, Stok KS. Quantitative evaluation of mechanical properties in tissue-engineered auricular cartilage. *Tissue Eng Part B Rev.* 2013; 20(1): 17-27.
8. Boettiger D, et al. Regulation of integrin alpha 5 beta 1 affinity during myogenic differentiation. *Dev Biol.* 1995; 169(1): 261-272.
9. Yonezawa I, Kato K, Yagita H, Yamauchi Y, Okumura K. VLA-5-mediated interaction with fibronectin induces cytokine production by human chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 219(1): 261-265.
10. Nishiwaki H, et al. A Novel Method to Induce Cartilage Regeneration with Cubic Microcartilage. *Cells Tissues Organs.* 2017; 204(5-6): 251-260.
11. Hideshi Satoh, et al. Functional Analysis of Diastrophic Dysplasia Sulfate Transporter ITS INVOLVEMENT IN GROWTH REGULATION OF CHONDROCYTES MEDIATED BY SULFATED PROTEOGLYCANS. *J Bio Chem* 1998; 273: 12307-12315.
12. Itani Y, Asamura S, Matsui M, Tabata Y, Isogai N.

- Evaluation of nanofiber-based polyglycolic acid scaffolds for improved chondrocyte retention and in vivo bioengineered cartilage regeneration. *Plast Reconstr Surg.* 2014; 133: 805e–813e.
13. Gonfiotti A, et al. The first tissue-engineered airway transplantation: 5-year follow-up results. *Lancet.* 2014; 383: 238–244.
 14. Delaere P, Vranckx J, Verleden G, De Leyn P, Van Raemdonck D. Tracheal Transplant Group. Tracheal allotransplantation after withdrawal of immunosuppressive therapy. *N Engl J Med.* 2010; 362: 138–145.
 15. Vogel G. Trachea transplants test the limits. *Science.* 2013; 340: 266–268.
 16. Bichara DA, et al. The tissue-engineered auricle: past, present, and future. *Tissue Eng Part B Rev.* 2012; 18: 51–61.
 17. Kusuhara H, et al. Tissue engineering a model for the human ear: assessment of size, shape, morphology, and gene expression following seeding of different chondrocytes. *Wound Repair Regen.* 2009; 17(1): 136–146.
 18. Nabzdyk C, et al. Auricular chondrocytes from benchwork to clinical applications. *In Vivo.* 2009; 23(3): 369–380.
 19. Homicz MR, Schumacher BL, Sah RL, Watson D. Effects of serial expansion of septal chondrocytes on tissue-engineered neocartilage composition. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002; 127: 398–408.
 20. Jian-Wei X, et al. Producing a flexible tissue-engineered cartilage framework using expanded polytetrafluoroethylene membrane as a pseudoperichondrium. *Plastic Reconstr Surg.* 2005; 116(2): 577–589.
 21. Zita M. Jessop, et al. Combining regenerative medicine strategies to provide durable reconstructive options: auricular cartilage tissue engineering. *Stem Cell Res Ther.* 2016; 7: 19.
 22. Kobayashi S, et al. Presence of cartilage stem/progenitor cells in adult mice auricular perichondrium. *PLoS One.* 2011; 6(10): e26393.
 23. Kobayashi S, et al. Reconstruction of human elastic cartilage by a CD44 CD90 stem cell in the ear perichondrium. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108: 14479.
 24. Jiwang Zhang, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003; 425: 836–841.
 25. Khan IM, et al. Fibroblast growth factor 2 and transforming growth factor β 1 induce precocious maturation of articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 2011; 63(11): 3417–3427.
 26. Khan IM, et al. In vitro growth factor-induced bioengineering of mature articular cartilage. *Biomaterials.* 2013; 34(5):1478–1487.
 27. Tseng A. Extensively expanded auricular chondrocytes form neocartilage in vivo. *Cartilage.* 2014; 5: 241–251.
 28. Denis Gospodarowicz. Localisation of a fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth. *Nature.* 1974; 249: 123–127.
 29. Noël D, Djouad F, Jorgense C. Regenerative medicine through mesenchymal stem cells for bone and cartilage repair. *Curr Opin Investig Drugs.* 2002; 3: 1000–1004.
 30. Yasuhiko Tabata, Shigeki Hijikata, Muniruzzaman, Yoshito Ikada. Neovascularization effect of biodegradable gelatin microspheres incorporating basic fibroblast growth factor. *J Biomater Sci Polym Ed.* 1999; 10: 79–94.
 31. Suda T, Nishida T, Ohashi Y, Nakagawa S, Manabe R. Fibronectin appears at the site of corneal stromal wound in rabbits. *Curr Eye Res.* 1981–1982; 1(9): 553–556.
 32. Luc Nimeskern, Gerjo J. V. M. van Osch, Ralph Müller, and Kathryn S. Stok Quantitative Evaluation of Mechanical Properties in Tissue-Engineered Auricular Cartilage. *Tissue Engineering Part B: Reviews.* 2014; 20: 17–27.