

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592300

研究課題名（和文）天然高分子と合成高分子の複合化技術を導入した自家移植モデルにおける軟骨再生

研究課題名（英文）Effect of local environment, fibrin, and basic FGF incorporation on a canine autologous model of bio-engineered cartilage tissue

研究代表者

磯貝 典孝（ISOGAI NORITAKA）

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：90203067

研究成果の概要（和文）：本研究では、播種細胞の漏出を抑制して播種効率を向上させるため、生体吸収性の合成高分子（PGA）と天然高分子（フィブリン）を複合化する技術を開発した。複合化した分解性高分子を試用して自家移植モデルの軟骨再生を試み、異なる移植部位における複合化高分子の有用性について検討した（実験A）。さらに本モデルに塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）徐放システムを導入して、bFGFによる軟骨再生の促進効果と軟骨再生における新生血管の役割について検討した（実験B）。

研究成果の概要（英文）：We developed a technique to form a bioabsorbable synthetic polymer (poly glycolic acid; PGA) combined with a natural polymer (fibrin) to serve as a scaffold to help retain seeded cells and improve the seeding efficiency of chondrocytes in an implantable construct. This approach was evaluated in a canine autologous implant model of bio-engineered cartilage. The implantation site (subcutaneous or intra-fascial) and the use of basic fibroblast growth factor (b-FGF) were also evaluated with this system. The intra-fascial implantation site yielded optimal results, especially when used in conjunction with fibrin and a b-FGF sustained-release system incorporated into the complex. A thicker, more sustained cartilagenous layer was formed, with a more vascularized outer fibrous supporting tissue layer. This combined approach of implant environment selection, natural polymer for cell retention, and growth factor supplementation offers a more optimized method for generating bio-engineered auricular cartilage.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：生分解性高分子、自家移植、軟骨再生、bFGF、徐放システム

### 1. 研究開始当初の背景

耳介軟骨は、複雑な3次元形状を特徴とする薄い弾性軟骨によって構成されている。細胞外マトリックスに含まれる弾性線維によって、耳介は特有の柔らかい性状を保持している。“耳介の再生”では、高度な3次元形状の再現を必要とするが、比較的単純な組織構造が単一化細胞（弾性軟骨細胞）によって構築されているため、tissue engineeringのモデルケースとして理想的であると考えられてきた。この耳介軟骨の再生誘導を実現するため、これまで主に小動物（ヌードマウス）を用いてヒト耳介形状軟骨の再生誘導が試みられてきた。その結果、細胞操作技術、細胞供給源の探索、生分解性高分子の改良、軟骨再生における形態形成制御機構と成長因子の関与などの基盤技術の開発や臨床応用化に関する研究が系統的に数多く報告されてきた。これら一連の研究結果から、弾性軟骨の組織性状と複雑な3次元形状を有する軟骨再生は可能であり、ヒト耳介特有の3次元形状は長期間維持されることが判明した。しかし、臨床応用を目指して行った大動物（例えば、ブタ、羊など）実験において、ヒト耳介形状軟骨の再生誘導が試みられたが、未だに成功例は報告されていない。

### 2. 研究の目的

播種細胞の足場となる高分子（スカフォールド）には、高い細胞親和性、力学的強度、多孔性、連通性、設計した3次元形状に成形できる加工性、組織形成に伴って分解される生体吸収性が要求される。生分解性高分子の中でも特に合成高分子（PGA、PLA、PCLなど）は、力学的強度が高く加工性に優れている。しかし、疎水性であるため、細胞がスカフォールド内部に浸透しにくく、いったん浸透した播種細胞はスカフォールドに接着することなく漏れ出すため、播種効率が低下する点が大きな問題として残されている。一方、天然高分子であるフィブリンは、播種細胞が特異的に結合する部位を持つため、高い細胞接着性と細胞増殖活性を持つが、力学的強度と加工性の点で劣っている。そこで、これらの弱点を克服するために、両方の高分子を複合化する新技術を開発した。本研究では、播種細胞の漏出を抑制して播種効率を向上させるための高分子複合化技術を明らかとし、本法を導入して大動物の異な

る移植部位において軟骨組織の再生誘導を試みた。さらに、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）を複合化高分子（スカフォールド）に組み込むことにより軟骨再生が促進される可能性について組織学的に検討した。

### 3. 研究の方法

（1）実験A：異なる移植部位における複合化高分子の有用性

細胞・高分子複合体の作成：ピペットにて、イヌ耳介軟骨細胞をPGA不織布に播種して、細胞・高分子複合体を作成した。軟骨細胞の播種濃度は、 $100 \times 10^6$ 個/mlに調節した。複合体をインキュベーター内（37℃，5%CO<sub>2</sub>）に4時間静置して、軟骨細胞を生分解性高分子に接着させた。

天然高分子フィブリンによる複合化：フィブリン（ボルヒール®，化学及血清療法研究所，熊本）を散布して、細胞・高分子複合体を複層化した。フィブリンの散布には、スプレーキット（ボルヒールスプレーキット，化学及血清療法研究所，熊本）を用い、送気圧を0.75kgf/cm<sup>2</sup>に調整し、複合体から30cm離してフィブリンを散布した。その結果、複合体は、均一な厚さ（約100～120μm）のフィブリン膜によって複合化された。また、走査電顕像によって、天然高分子フィブリンによる複合化処理を施した後は、合成高分子PGA内に数多くの播種細胞が接着する様子が観察された。

複合体の移植：複合化された複合体は、細胞採取を行った同一個体に自家移植した。塩酸ケタミン（ケタラール®，15mg/kg，三共株式会社，東京）の殿部筋肉注射による睡眠導入の後、ペントバルビタール（ネンプタール®，25mg/kg，大日本製薬株式会社，大阪）による静脈麻酔を行った。移植部位を剃毛した後、ポビドンヨード（イソジン®，明治製薬株式会社，東京）にて消毒した。設定した切開線に沿って10万倍希釈エピネフリン添加塩酸リドカイン（エピレナミン含有キシロカイン1%E®，アストラゼネカ株式会社，大阪）による局所麻酔を行い、皮膚切開を加えて複合体を移植した。移植部位は、皮下（そけい部）および筋膜間（浅および深側頭筋膜の間）の2部位を選択した。移植後、5-0ナイロン縫合糸（シグマ，東京）にて閉創した。実験群の設定：移植部位および複層化の有無によって、次の4つの実験群を設定した。

Group 細胞・高分子複合体を皮下移植した群、n=3

Group (複合化した細胞・高分子複合体を皮下移植した群、n=3)

Group 細胞・高分子複合体を筋膜間に移植した群、n=3

Group 複合化した細胞・高分子複合体を筋膜間に移植した群、n=3

移植した複合体は、移植後1週目、3週目、5週目および10週目に標本採取し、組織学検討および免疫組織学的検討をおこなった。

(2) 実験B: 塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)含有徐放化ゼラチン微粒子が軟骨再生に及ぼす影響

ゼラチン微粒子の作成:b-FGF徐放システムでは、生体内分解吸収性高分子微粒子としてゼラチンを使用した。オリブオイル5ml(40)に、あらかじめ作成した10%ゼラチン水溶液0.2ml(等電点5,牛骨ゼラチン,新田ゼラチン株式会社,大阪)を加え、静置(40,1時間)した。攪拌後4で冷蔵し粒子化したゼラチン周囲に付着したオリブオイルをアセトン1.5mlにて洗浄した。得られた溶液をファルコンチューブ(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)に回収し、遠心分離(4,5,000 rpm,5分間)を行った。再度、アセトンにて洗浄(4にて3回洗浄)した後、冷蔵庫内(4)で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1mgに対し、0.1% polyoxyethylene sorbitan monooleate を1ml、25% glutaraldehyde を5 $\mu$ l加え、攪拌(4 $^{\circ}$ Cにて24時間)した。溶液を遠心分離(5,000 rpm,5分間)し、沈査のゼラチン粒子に glycine 溶液を加え、常温にて1時間攪拌した。その後、蒸留水を加えて遠心分離(5,000 rpm,5分間)を3回行い、洗浄した。得られたゼラチン粒子に超純水を加え、液体窒素で凍結させた。真空凍結乾燥を行い、直径約10 $\mu$ mのゼラチン微粒子を作成した。凍結乾燥したゼラチン微粒子は、エチレンオキシドガスを用いて滅菌した。

bFGF徐放システム:b-FGF 100 $\mu$ m(trafermin, 科研製薬,東京)をCa<sup>++</sup>,Mg<sup>++</sup>不含リン酸緩衝液60 $\mu$ (Dulbecco's

phosphate-buffered saline, Gibco)に溶解した後、ゼラチン微粒子10 $\mu$ gと混和し、4 $^{\circ}$ C下に静置してb-FGF含有徐放化ゼラチン微粒子を作成した。

複合体の移植:実験1と同様に、シート状に加工したPGA不織布に、イヌ耳介軟骨より単離した軟骨細胞を播種した。さらに、b-FGF含有徐放化ゼラチン微粒子を複合体へ直接塗布させた後、フィブリンによる複合体の複合化を行った。b-FGF徐放システムを導入して複合化された複合体は、細胞採取を行った

同一個体の浅および深側頭筋膜間に自家移植した。

実験群の設定:b-FGF徐放システムおよびフィブリンを用いた複合化処理の有無によって、次の4群を設定した。

Group 細胞・高分子複合体を移植した群、n=3

Group (b-FGF徐放システムを施した細胞・高分子複合体を移植した群、n=3)

Group フィブリンによる複合化処理を施した細胞・高分子複合体を移植した群、n=3

Group b-FGF徐放システムおよびフィブリンによる複合化の両処理を施した細胞・高分子複合体を移植した群、n=3

移植した複合体は、移植後5週目に標本採取し、組織学検討および免疫組織学的検討をおこなった。

#### 4. 研究成果

(1) 本研究では、播種細胞の漏出を抑制して播種効率を向上させるため、生体吸収性の合成高分子(PGA)と天然高分子(フィブリン)を複合化する技術を開発した。PGAは、高い力学強度と細胞接着性を示し、早い分解・吸収によって優れた生体適合性を有している。このため、小動物を用いた種々の3次元組織の再生誘導実験において、理想的な支持体として応用されている。しかし、大動物を用いた自家移植モデルでは、PGA含有量と炎症反応の強さは正の相関を示し、惹起された強い炎症反応によって、軟骨組織の再生誘導は阻止されることが近年報告された。そこで本研究では、PGA含有量を20mgと低く設定し、軟骨の再生誘導過程の初期に生ずる炎症反応を抑制した。天然高分子として用いたフィブリンは、注入充填が可能なハイドロゲルスカフォールドとして有用であり、すでに3次元培養用スcaフォールドとして試用されている。一方、tissue engineeringに用いるスcaフォールドは、種々の形状への成形が可能であり、その複雑な3次元形状が生体内で維持されなくてはならない。フィブリンは、生体内分解速度が数日~数週間と早い特徴がある。そのため単一のスcaフォールドとして試用する場合、物理的強度の不足、短い吸収期間、体積減少などの問題点を補う必要がある。そこで本研究では、フィブリンの欠点を補う目的で合成高分子と組み合わせで複合化した。複合化された高分子では、合成高分子の支持性によりスcaフォールドの3次元構造が維持され、生体親和性、細胞接着性、細胞増殖促進活性などの付加が可能となった。この場合、合成高分子に強固に天然高分子を固定化する技術、さらには固定化した天然高分子機能を十分に発揮できる固定化の手段が必要と考えられる。本研究では、合成高分子表面にフィブリンを強固に固定

可する目的で、スプレーキットの送気圧を0.75kgf/cm<sup>2</sup>に調整してフィブリンを散布した。この結果、合成高分子PGAを、均一な厚さ(約100~120μm)のフィブリン膜によって強固に複合化することが可能となった。また、天然高分子フィブリンによる複合化処理を施すことにより、播種細胞はスカフォールドから漏れ出すことなく、高濃度の細胞接着が可能となった。

(2) 実験Bにおいてb-FGF徐放システムを施した群(Group および )では、再生軟骨組織は著しく厚く変化していた。また、複合体を取り囲む線維性組織の周囲に、明らかに径の大きい血管からなる発達した血管網の形成が観察された。この組織学的検討結果から、b-FGFは軟骨組織の増殖因子のみでなく、機能的血管を誘導する強力な血管新生誘導因子として作用していた。

(3) 本研究では、自家移植モデルにおいて軟骨の再生誘導を試みた。生体吸収性の合成高分子と天然高分子を複合化処理する技術に加えてb-FGF徐放システムを組み合わせることで生体内に導入することにより、軟骨再生誘導を促進し、再生軟骨組織を栄養する機能的血管を同時誘導する効率的な手法を確立することができた。今後、本法を応用して、複雑な3次元形態を特徴とするヒト耳介形状軟骨の再生誘導の可能性が高まったと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Isogai N, Wada M, Wada Y, Morotomi T, Tissue engineering of the ear : Effect of local environment, fibrin, and basic FGF incorporation on a canine autologous model, Oral & Craniofacial Tissue Engineering, 査読有, Vol.1, No.2, 2011, pp363

伊谷善仁、松島星夏、磯貝典孝、再生軟骨による耳介再建、治療、査読有、Vol.93、No.2、pp499-504、2011

[学会発表](計5件)

Isogai N, Tissue engineering of the ear. Effect of local environment, fibrin, and basic FGF incorporation on a canine autologous model, The 4th International Conference on the Development of Biomedical Engineering (Hochimin, Vietnam) 2012.01.10

Isogai N, Topical application of b-FGF-impregnated gelatin microspheres to tissue engineer bone and cartilage or plastic surgical reconstruction, The 11th

US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems (Hawaii, USA), 2011.12.20

磯貝典孝、骨・軟骨再生と創傷外科への応用、H23年度第4回日本創傷外科学会教育セミナー、(札幌) 2011.07.08

磯貝典孝、三次元形状を有する硬組織(骨および軟骨)の再生誘導、第35回日本外科学系連合学会(東京) 2010.06.18

Isogai N, Advances in tissue engineering models of human phalanx and ears, The 10<sup>th</sup> Korea-Japan Congress of Plastic and Reconstructive Surgery (Pusan, Korea), 2010.06.17

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

磯貝典孝 (ISOGAI NORITAKA)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：90203067

##### (2) 研究分担者

朝村真一 (ASAMURA SHINICHI)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：20340804

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：