

学位論文要旨

学位の種類	博士	氏名	槌谷宏平
<p>学位論文題目</p> <p>Establishment of a custom-shaping system for bone regeneration by seeding marrow stromal cells onto a web-like biodegradable hybrid sheet</p> <p>(邦題：骨再生における形状制御システムの構築 ー 骨髄細胞と新たな生分解性シートを用いて ー)</p> <p style="text-align: right;">共著者名</p> <p style="text-align: right;">森 泰昌 陳 国平 牛田 多加志 立石 哲也 坂元 亨宇 梅澤 明弘</p> <p style="text-align: center;">未公表</p> <p>研究目的</p> <p>骨は再生能力に富む。しかし、生体の自然治癒能力を超えた欠損、障害に対しては積極的な治療が必要とされる。骨欠損に対する標準的治療法である自家骨移植は、優れた方法であるものの、骨採取部位における合併症の危険性は避けられない。近年、細胞を用いた組織再生研究が進み、骨組織再生は自家骨移植に代わる重要な治療戦略となることが期待されている¹⁾。</p> <p>骨再生の細胞源としては軟骨、脂肪、筋細胞の他に骨芽細胞へ分化することが証明されている骨髄間質細胞がその有力候補である。目的とする部位へ細胞を接着・集積させるため、細胞の足場(担体:Scaffold)が用いられるが、特に硬組織においては再生組織の成形性、形状の維持が必須となるため、その重要性は高い。骨再生の担体としては従来ハイドロキシアパタイトや三リン酸カルシウムなどの無機材料が用いられてきたが、細胞接着性、形状の制御、生体親和性の観点から生分解性高分子が選択肢のひとつとなる。</p> <p>高分子担体には天然高分子と合成高分子のふたつが存在する。天然高分子であるコラー</p>			

ゲンは細胞培養において繁用される素材で、細胞保持性に優れているものの、形状の維持が困難である。そのため強度に優れた合成高分子の研究が進んできた。しかし、合成高分子には疎水性であるが故に細胞接着性に乏しいという欠点が存在する。両者の問題点を解決するため、過去、合成高分子にて作製したスポンジ形状をした培養担体にコラーゲンを複合化することで初期強度に優れ、かつ細胞接着性に優れた培養担体を開発、骨・軟骨再生における有用性を報告してきた^{2), 3)}。この担体の欠点は、厚い三次元構造体のために細胞の均一な播種が困難なことにある。我々は新規に均一な細胞分布、形状制御の簡便さを目的としたシート形状の複合培養担体を作製した。本研究の目的は、骨髄間質細胞由来骨芽細胞を用い、新規複合化シートの形状制御を要する骨再生への有用性を検証することにある。

材 料・方 法

培養担体および細胞播種

合成高分子ポリ乳酸-グリコール酸共重合体 (PLGA) の網目状構造を持つ織布に、ウシ I 型コラーゲンのマイクロスポンジを複合化、グルタルアルデヒドにて架橋したシートを作成した。細胞は、マウス骨髄間質より樹立した骨芽細胞株 KUSA-A1 を用いた。KUSA-A1 細胞を 10%ウシ血清加 DMEM 培地に懸濁、 1×10^7 個の細胞を 4cm^2 の複合化シートに播種し 37°C にて培養を行った。

細胞接着性評価法

コラーゲン複合化の有無による接着細胞数の違いを、播種後 6 時間での付着細胞数にて計測、比較した。また複合化シートへ付着した細胞の状態を走査型および透過型電子顕微鏡にて観察した。

動物モデルへの移植系

慶應義塾大学医学部動物実験規約に従い、C3H/He または NOD-SCID IL-2 receptor γ knockout mouse に径 4.3mm の頭蓋骨欠損を作製、細胞を播種した複合化シート 5 枚を重層して移植した。対照として、細胞を播種しないシートのみおよび骨欠損のみの群を作製し、各 10 匹の観察を行った。4 および 8 週において移植部位の観察を行った。また、シリコンにて作製した任意形状の表面に細胞を播種したシートを設置しマウス皮下に移植、移植後 4 週にて摘出し任意形状の作製および維持が可能か否か確認した。

レントゲンおよび組織学的評価

評価は検体採取時におけるレントゲン像、パラフィン切片による H-E 染色、血管侵入評価のため Factor VIII, CD31, CD34 の免疫染色を行った。

成 績

コラーゲン複合化シートの作製

厚さ 200 μ m の織布に網目状のコラーゲンのマイクロスポンジ構造が形成された。このシートは操作性に優れ、容易に把持や形状を変化させることが可能であった。

細胞接着性の向上

コラーゲン複合化シートは非複合化シートに比較し 4～5 倍の細胞接着能を有することが確認された。走査電子顕微鏡像では PLGA ファイバー表層よりも、ファイバー間に張ったコラーゲンのマイクロスポンジに多く細胞が接着し、コラーゲンの有用性が示された。透過電子顕微鏡像にて多量のコラーゲンフィブリル、多数の拡大した粗面小胞体が観察され、接着した細胞が旺盛な蛋白合成、細胞外器質産生を行っていることが確認された。

頭蓋骨欠損モデルに対する細胞移植効果

マウス頭蓋に作製した径 4.3mm の骨欠損は、対照群（非移植群および細胞未播種シート群）において組織学的に骨の形成が観察されなかったのに対し、重層化し移植した細胞播種シート群においては 4 週にて良好な骨形成と豊富な血管形成、8 週においては骨組織内の骨髄形成を確認した。

生体内での形状制御

形状作製および維持が可能かどうかを確認するため、シートを丸め管状骨を模倣した円管形態やシートにて結び目を作製、さらに指骨形態を模倣したシリコンにシートを巻き付けマウス皮下に移植した。4 週においてレントゲン像、外観ともに移植時と同一形状の骨形成が起こることを確認した。

考 察

合成高分子シートにコラーゲンマイクロスポンジを複合化することで、細胞接着性に優れかつ形状形成の容易な細胞培養担体が作製可能であった。自然治癒の起こらない頭蓋骨欠損モデルにおいて、本シートを用いた細胞移植群のみに骨修復が起こったことより、細胞移植の骨再生治療における有用性が示された。

従来のコラーゲンを複合化した合成高分子スポンジ²⁾は、立方体内部への細胞播種が困難なため均一な組織を得にくいという欠点があった。形状をシート状にしたことで細胞の播種が容易となり、細胞の分布を均一化することが可能となった。可塑性のある複合化シートは、細胞播種後に重層化することで立体構造、丸めることで管状構造、さらに既成の構造物に貼り付けることで任意の形状を作製することが可能となるため手術中での操作が容易である。荷重に耐えうる強度には至らないため、荷重骨においては無機材料のひとつであるハイドロキシアパタイトを中心に用い、表層を被覆することで細胞の局在化をもたらす治療法が想定される。さらに早期の骨分化を促すために成長因子の固相化、細胞接着因子を付加⁴⁾することでより高い接着性も期待できるなどその応用範囲は広いと思われる。

本複合化シートに用いた PLGA およびアテロ化コラーゲンはそれぞれ米国食品医薬品局 (FDA)基準を満たし既に臨床にて使用されているものであるため早期の臨床化が見込まれる。また、この新規培養担体は骨再生のみならず、軟骨再生⁵⁾や血管再生など他に形状を要求される組織再生の培養担体として優れているものと考えられる。

結 論

コラーゲン複合化合成高分子シートは細胞接着性、形状維持に優れ、自在な形状の骨を生体内にて作製可能であり、骨再生のための有用な培養担体であると考えられた。



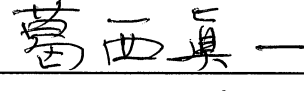

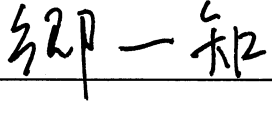

引用文献

- 1) Langer R, Vacanti JP (1993) Tissue engineering. Science 260: 920-6
- 2) Chen G, Ushida T, Tateishi T (2000) A biodegradable hybrid sponge nested with collagen microsponges. J Biomed Mater Res 51: 273-9
- 3) Ochi K, Chen G, Ushida T, Gojo S, Segawa K, Tai H, Ueno K, Ohkawa H, Mori T, Yamaguchi A, Toyama Y, Hata J, Umezawa A (2003) Use of isolated mature osteoblasts in abundance acts as desired-shaped bone regeneration in combination with a modified poly-DL-lactic-co-glycolic acid (PLGA)-collagen sponge. J Cell Physiol 194: 45-53

参考論文

- 4) Tsuchiya K, Chen G, Ushida T, Matsuno T, Tateishi T (2001) Effects of cell adhesion molecules on adhesion of chondrocytes, ligament cells and mesenchymal stem cells. Materials Science & Engineering C 17: 79-82
- 5) Tsuchiya K, Chen G, Ushida T, Matsuno T, Tateishi T (2003) The effect of co-culture of chondrocytes with mesenchymal stem cells on their cartilaginous phenotype *in vitro*. Materials Science & Engineering C (in press)

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	槌 谷 宏 平
<p>審査委員長  </p> <p>審査委員  </p> <p>審査委員  </p>			
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Establishment of a custom-shaping system for bone regeneration by seeding marrow stromal cells onto a web-like biodegradable hybrid sheet</p> <p>(骨再生における形状制御システムの構築 — 骨髄細胞と新たな生分解性シートを用いて —)</p>			
<p>組織工学による再生医療の概念が確立され、治療に苦慮する骨疾患に対してもその応用が期待されている。骨再生には自家骨髄細胞と、細胞の足場となる培養担体を用いるが、細胞の保持に加え、硬組織に求められる形状の制御が培養担体の大きな役割となる。従来研究されてきた無機材料や合成高分子多孔体は、形状の維持に優れるものの、その立体構造や細胞接着性の問題から不均一な細胞分布となる欠点があった。</p> <p>本研究はこの問題点を解決するため、機械的強度に優れた生体吸収性合成高分子へ、細胞接着性に優れた天然高分子コラーゲンを複合化したシート形状の新規培養担体を開発し、複合化による細胞接着性への効果と骨形状の制御性を検討したものである。</p>			

マウス骨髄細胞を用いた細胞接着率の検討では、本複合化シートは合成高分子単独シートの約5倍の接着性を示し、組織像、電子顕微鏡所見において担体上への均一な細胞分布と活発な細胞外基質の産生を認めた。また、マウス頭蓋骨欠損への移植においては、豊富な血管侵入と骨髄形成を伴う完全な骨性治癒が得られ、細胞とともに移植された培養担体は移植後8週間にて完全に吸収されることが確認された。また、シートを重層化や筒状に形成、さらに指骨の形状を模倣することで、生体内にて初期の形状をそのまま維持した骨を作成することが可能であった。これらの結果より、本複合化シートは均一かつ多量の細胞を保持し、目的とした形状の骨組織を構築することが容易であるという特性が明らかとなった。

本論文は培養担体に天然および合成高分子の複合化シート材料を用いることで質の良い再生骨が得られる可能性を示したものであり、この分野の臨床応用に大きく寄与するものと考えられる。なお、各審査委員より、本論文とその関連路湯行きに関して試問が行われた結果、適切な回答が得られた。以上より、本審査委員会は本論文を学位論文に値するものと判断した。