

学位論文題名

Application of Tissue Engineering Techniques for Rotator Cuff Regeneration Using a Chitosan-based Hyaluronan Hybrid Fiber Scaffold

(キトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド線維を用いた
組織工学的手法の肩腱板再生への応用)

学位論文内容の要旨

修復不能な広範囲肩腱板断裂に対する治療法として、広背筋などを用いた腱移行術、大腿筋膜張筋を用いた自家移植術、テフロンなどの非生体吸収性材料を用いた移植術が主に行われている。しかし、腱移行術や自家移植術では自家組織採取の犠牲があり非生体吸収性材料を用いた移植術では異物反応があるなどの問題点が指摘され、新しい治療法の確立が必要であると考えられている。

近年、組織工学的手法を用いた組織再生の試みが注目されている。組織工学的手法とは単離した細胞と生体吸収性 scaffold を用いて新たに組織を再構築させる科学的アプローチである。腱靭帯組織再生はコラーゲンゲルやコラーゲン生成物、またはポリ乳酸、シルクなどを scaffold として用いた報告が散見される。Awad らは骨髓幹細胞とコラーゲンゲルを用いて膝蓋腱再生を試み、欠損部をコントロールとすると約2倍の強度を得たことを報告している。また、Altman らは *in vitro* において骨髓幹細胞とシルクの scaffold を用いて靭帯様組織が再生されたことを報告した。このように幾つかの報告があるが、臨床応用には未だ解決すべき問題点があると考えられる。

重要な問題点の一つは再生課程において移植された細胞が自ら細胞外マトリックスを産生することで徐々に再生組織の強度が増加する必要があることである。このためには細胞外マトリックスが産生されるべき空間を確保するために材料の生体吸収性をコントロールでき、かつ生体力学的環境に耐えうる十分な強度をもった scaffold が必要であるが、理想的な材料は未だ知られていない。

腱靭帯組織を構成する主な細胞外マトリックスはタイプ I コラーゲンである。一般的に再生された癒痕組織はタイプ III コラーゲンが主体であり、これが癒痕組織が正常組織より力学的に弱い要因である。それゆえ再生された組織の強度を増加させるにはタイプ I コラーゲン産生を増加させることが不可欠であると考えられる。

我々は基礎実験として腱靭帯組織再生の scaffold として新規のキトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維を開発し良好な細胞接着能をもち、優れたタイプ I コラーゲン産生促進能を有することを示した。細胞外マトリックスの一つである Glycosaminoglycans は細胞の phenotype の発現を制御し組織治癒を支持するという重要な働きが知られている。このハイブリッド繊維には腱板組織の Glycosaminoglycans の 50%を占めるヒアルロン酸を選択した。ヒアルロン酸には様々な生物学的活性が知られており細胞接着性やタイプ I コラーゲン産生に深く関わっていると考えられている。そこで、この繊維を用いて腱板組織再生用の 3次元 scaffold を作成した。

本実験の仮説は生体外で3次元培養した後体内に移植した細胞がタイプIコラーゲンを産生し、これが再生組織の強度増加につながることであり、この仮説を証明するためにウサギの肩腱板断裂モデルを作成し新規 scaffold を用いた組織工学的手法を試み、再生組織のタイプIコラーゲン産生と生体力学試験を行いこの両者の相関関係を検討した。

まず、キトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維を湿式紡糸法にて作成し、これを特殊な紡糸器を用いてウサギの腱板のサイズに合わせた3次元 scaffold (10 x 7 mm) を作成した。日本白色家兎の膝蓋腱より単離した第二継代の線維芽細胞をこの3次元 scaffold 内で4週間培養した。次に24匹の日本白色家兎の両肩に腱板欠損(10 x 7 mm)を作成し16匹の右肩に細胞を播種した scaffold を移植した群(CSS群)、左側に細胞を播種していない scaffold を移植した群(NCSS群)を作成した。残りの8匹、16肩は断裂部をそのまま欠損とし対照群とした。

術後4、12週で各群2匹ずつを組織学・免疫組織化学的(タイプI, II, IIIコラーゲン)に、同じ週数で各群6匹ずつを生体力学的に検討した。

術後4週では肉眼的にCSS, NCSS群とも瘢痕様組織で欠損部が充填されていたが、対照群は欠損のままであった。顕微鏡的には細胞数、コラーゲン産生ともCSS, NCSS群に明らかな差は認めなかった。すべての切片で新規繊維は残存しており吸収像はなかった。また、scaffoldの断裂、高度な異物反応はみられなかった。この時点ではコラーゲンの免疫組織染色で明らかな陽性所見はなかった。

術後12週では、肉眼的にCSS, NCSS群とも4週より厚い結合組織に覆われ、対照群も薄い膜状組織で被覆されていた。腱靭帯組織に特徴的なクランプはCSS群でNCSS群より認められ、ハイブリッド繊維は吸収像が目立つようになった。免疫組織化学染色ではタイプIコラーゲンがCSS群で有意に見られ、NCSS群では認められなかった。タイプIコラーゲンは骨溝付近で一部にみられ、タイプIIIコラーゲンはCSS群ではタイプIよりはっきりしなかった。

生体力学試験ではCSS群で術後4週から12週までに破断強度、破断ひずみがそれぞれ191%、163%と明らかに増加した($P < 0.01$)。一方NCSS群では破断強度、破断ひずみとも明らかな増加を示さなかった。術後4週では3群間には有意な差を認めず、術後12週でCSS群は他の2群より有意に優れた強度を示した。

本実験では家兎の腱板欠損部に細胞を播種した新規3次元 scaffold を用いることで術後4週から12週までの間にタイプIコラーゲンが増加し、さらに力学的強度が増加した。一方、細胞を播種していない scaffold ではタイプIコラーゲンが認められず、力学的強度の増加も見られなかった。以上より、この scaffold で培養された細胞はタイプIコラーゲン産生を促進させ、この結果力学的強度が向上したと考えられた。

本実験の限界として、まず、この新規 scaffold の生体適合性と生体吸収性が不明であることがある。キトサンは優れた生体適合性を持つと言われ本実験においても短期ではあるが明らかな異物反応は認めていない。しかし、長期にわたる全身的、局所的な免疫反応を悪化する必要があるといえる。他には、タイプIコラーゲンが再生されたものの、scaffoldの表面に存在していたことが挙げられる。これは *in vitro* での培養環境において、中央部に栄養が行き渡らずいわゆる中心性壊死を呈したものと考えられる。力学的強度のさらなる向上にとってもタイプIコラーゲンを全層にわたり再生させる必要があり、バイオリクターなどによる培養環境の改善が重要であると考えられた。さらに今回得られた力学的強度は正常組織の約20%でしかなかった。再生組織の強度を増加させるため、scaffoldの強度を改善する必要がある。

結論として本実験によりキトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維からなる3次元 scaffold はタイプIコラーゲン産生を促進し力学的強度を向上させたことが示された。幾つかの制限はあるが、本結果は新規 scaffold を用いた組織工学的手法が肩腱板再生に有用であることを強く示唆している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安 田 和 則

副 査 教 授 清 水 宏

副 査 教 授 三 浪 明 男

学 位 論 文 題 名

Application of Tissue Engineering Techniques for Rotator Cuff Regeneration Using a Chitosan-based Hyaluronan Hybrid Fiber Scaffold

(キトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド線維を用いた
組織工学的手法の肩腱板再生への応用)

修復不能な広範囲肩腱板断裂に対する治療法として、広背筋などを用いた腱移行術、大腿筋膜張筋を用いた自家移植術、テフロンなどの非生体吸収性材料を用いた移植術が主に行われている。しかし、腱移行術や自家移植術では自家組織採取の犠牲があり非生体吸収性材料を用いた移植術では異物反応があるなどの問題点が指摘され、新しい治療法の確立が必要であると考えられている。

近年、組織工学的手法を用いた組織再生の試みが注目されている。組織工学的手法とは単離した細胞と生体吸収性 scaffold を用いて新たに組織を再構築させる科学的アプローチである。腱靭帯組織再生用の scaffold として幾つかの報告があるが臨床応用には未だ解決すべき問題点があると考えられる。重要な問題点の一つは再生課程において移植された細胞が自ら細胞外マトリックスを産生することで徐々に再生組織の強度が増加する必要があることである。このためには細胞外マトリックスが産生されるべき空間を確保するために材料の生体吸収性をコントロールでき、かつ生体力学的環境に耐えうる十分な強度をもった scaffold が必要であるが、理想的な材料は未だ知られていない。

我々は基礎実験として腱靭帯組織再生の scaffold として新規のキトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維を開発し良好な細胞接着能をもち、優れたタイプ I コラーゲン産生促進能を有することを示した。細胞外マトリックスの一つである Glycosaminoglycans は細胞の phenotype の発現を制御し組織治癒を支持するという重要な働きが知られている。このハイブリッド繊維には腱板組織の Glycosaminoglycans の 50% を占めるヒアルロン酸を選択した。ヒアルロン酸には様々な生物学的活性が知られており細胞接着性やタイプ I コラーゲン産生に深く関わっていると考えられている。そこで、この繊維を用いて腱板組織再生用の 3 次元 scaffold を作成した。

本実験の仮説は生体外で 3 次元培養した後体内に移植した細胞がタイプ I コラーゲンを産生し、これが再生組織の強度増加につながることにし、この仮説を証明するためにウサギの肩腱板断裂モデルを作成し新規 scaffold を用いた組織工学的手法を試み、再生組織のタイプ I コラーゲン産生と生体力学試験を行いこの両者の相関関係を検討した。

まず、キトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維を作成し、ウサギの腱板のサイズに合わせた 3 次

元 scaffold(10 x 7 mm)を作成した。日本白色家兎の膝蓋腱より単離した第二継代の線維芽細胞をこの3次元 scaffold 内で4週間培養した。次に24匹の日本白色家兎の両肩に腱板欠損(10 x 7 mm)を作成し16匹の右肩に細胞を播種した scaffold を移植した群(CSS 群)、左側に細胞を播種していない scaffold を移植した群(NCSS 群)を作成した。残りの8匹、16肩は断裂部をそのまま欠損とし対照群とした。

術後4, 12週で各群2匹ずつを組織学・免疫組織化学的(タイプI, II, III コラーゲン)に、同じ週数で各群6匹ずつを生体力学的に検討した。

術後4週では肉眼的に CSS, NCSS 群とも癒痕様組織で欠損部が充填されていたが、対照群は欠損のままであった。顕微鏡的には細胞数、コラーゲン産生とも CSS, NCSS 群に明らかな差は認めなかった。すべての切片で新規繊維は残存しており吸収像はなかった。また、scaffold の断裂、高度な異物反応はみられなかった。この時点ではコラーゲンの免疫組織染色で明らかな陽性所見はなかった。

術後12週では、肉眼的に CSS, NCSS 群とも4週より厚い結合組織に覆われ、対照群も薄い膜状組織で被覆されていた。腱靭帯組織に特徴的なクランプは CSS 群で NCSS 群より認められ、ハイブリッド繊維は吸収像が目立つようになった。免疫組織化学染色ではタイプIコラーゲンが CSS 群で有意に見られ、NCSS 群では認められなかった。タイプIIコラーゲンは骨溝付近で一部にみられ、タイプ III コラーゲンは CSS 群ではタイプIよりはっきりしなかった。

生体力学試験では CSS 群で術後4週から12週までに破断強度、破断ひずみがそれぞれ 191%, 163%と明らかに増加した($P < 0.01$)。一方 NCSS 群では破断強度、破断ひずみとも明らかな増加を示さなかった。術後4週では3群間には有意な差を認めず、術後12週で CSS 群は他の2群より有意に優れた強度を示した。

本実験では家兎の腱板欠損部に細胞を播種した新規3次元 scaffold を用いることで術後4週から12週までの間にタイプIコラーゲンが増加し、さらに力学的強度が増加した。一方、細胞を播種していない scaffold ではタイプIコラーゲンが認められず、力学的強度の増加も見られなかった。以上より、この scaffold で培養された細胞はそれ自身または周囲との相互作用によりタイプIコラーゲン産生を促進させ、この結果力学的強度が向上したと考えられた。

結論として本実験によりキトサン-ヒアルロン酸ハイブリッド繊維からなる3次元 scaffold はタイプIコラーゲン産生を促進し力学的強度を向上させたことが示された。幾つかの制限はあるが、本結果は新規 scaffold を用いた組織学的手法が肩腱板再生に有用であることを強く示唆している。

審査にあたり、副査清水宏教授より腱板由来の線維芽細胞、幹細胞、適切な3次元 scaffold、他の組織への応用についての質問があった。次いで主査安田和則教授より、実験に使用したモデル、引っ張り試験、正常腱板との比較、播種した細胞の働きについて質問があった。最後に副査三浪明男教授から臨床的見地より、腱骨付着部の強度の改善についての質問と臨床応用に向けてのコメントがあった。申請者はこれらの質問に対して今回行った実験の結果と過去の文献を引用し適切に回答した。

この論文は、整形外科分野における再生医療のために最も重要な要素の一つである scaffold を糖鎖工学的手法により作成し、in vitro, in vivo においてその有用性を示した独創的な研究である。今後発展すると思われる再生医学の指標となり、さらなる臨床応用へ向け大きな期待がもたれる。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院博士課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。