

成長因子を用いた関節軟骨修復に関する研究

(研究課題番号 12671410)

平成12年度～平成13年度科学研究費補助金
(基盤研究(C)(2)) 研究成果報告書

平成14年3月



研究代表者 中村孝志

(京都大学 医学研究科 教授)

科研

2001

318

成長因子を用いた関節軟骨修復に関する研究

(研究課題番号 12671410)

平成 12 年度～平成 13 年度科学研究費補助金
(基盤研究(C)(2)) 成果報告書

平成 14 年 3 月

研究代表者 中村孝志

(京都大学 医学研究科 教授)

はしがき

研究組織

研究代表者：中村 孝志

(京都大学大学院医学研究科感覚運動系病態学・教授)

研究分担者：中川 泰彰

(京都大学大学院医学研究科感覚運動系病態学・講師)

研究分担者：田畑 泰彦

(京都大学再生医科学研究所・教授)

研究経費

平成 11 年度 2200 千円

平成 12 年度 1200 千円

合 計 3400 千円

はじめに

変形性関節症に対する治療としては、その状態、年齢等により様々な治療法があり、臨床的にも一定の成果が上げられている。しかし若年者の変形性膝関節症は、患者の活動性が高いことから変形が進行して、疼痛、可動域制限など関節機能の障害が生じ、社会生活に制限を来すことが少なくない。また手術的に再建を行う場合でも長期にわたって関節機能が維持されないといけないことから治療が困難である。若年者の変形性膝関節症の治療で、長期にわたって良好な関節機能を維持するには関節軟骨の修復が必要であるが、現在のところ決定的な治療法は確立されていない。現在外科的治療としては骨軟骨移植、培養軟骨移植が実用化されているが、関節軟骨の修復は行われるものの組織的、機能的な修復は不十分である。長期的な予後を改善するには、軟骨再生を補助し、再生軟骨の形態、機能を改善する方法の開発が望まれる。

成長因子が骨軟骨欠損の再生に有効であるとの報告は、TGF- β 、BMP などで行われているが、bFGF は軟骨細胞の増殖因子であるばかりでなく、cartilage matrix の形成を促進するといわれている。また成長因子を作用させるためには、投与部位に適切な量を必要なだけ投与することが重要である。現在のところ骨軟骨欠損の局所に持続的に作用するような有効な Drug delivery system については、投与部位や投与する物質により性質が異なるので、PLLA やゼラチンなど様々な材料が研究されており開発途上である。

一方細胞を効率よく欠損部位に進入させるためには、細胞の carier が必要であるが、carier としてのヒアルロン酸スポンジは、分解されたときにヒアルロン酸となり、生理的に吸収される。また軟骨に対するヒアルロン酸の有効性は多数報告されており、有望な材料であると考えられる。

本研究ではウサギ膝関節の顆間部に直径 4 mm の骨関節欠損を作成し、これを骨軟骨欠損のモデルとし、ゼラチン粒子に成長因子を吸着させたものをヒアルロン酸スポンジに含浸させて骨関節欠損に充填した。ヒアルロン酸スポンジには骨髄間葉系細胞が進入することができ、また成長因子を吸着したゼラチン粒子をヒアルロン酸スポンジに含浸させることも可能である。これを用いて局所で効率よく成長因子を放出して、進入した骨髄間葉系細胞を増殖させ、軟骨細胞に分化誘導させられるのではないかと考えた。

効率のよい細胞の carier と有効な成長因子の Drug delivery system が開発されれば、生体に対して低侵襲で有効な軟骨再生の治療方法となることが期待される。以下研究結果を報告する。

研究発表

(1) 学会誌、専門誌等

- 1、松末吉隆、中川泰彰、中村孝志、関節軟骨欠損の修復（モザイクプラスチック）、臨床整形外科2000
- 2、松末吉隆、中川泰彰、中村孝志、mosaicplasty、骨・関節・靭帯2000
- 3、田畑泰彦、細胞増殖因子の徐放化技術を用いた骨再建、THE BONE、2001
- 4、TABATA Y, The importance of drug delivery system in tissue engineering, Pharmaceutical Science and Technology Today 2000
- 5、IWAKUA, TABATA Y, Basic fibroblast growth factor may improve devascularized sternal healing. Annals of Thoracic Surgery 2000
- 6、OKA M, NAKAMURA T, How to repair joint surface, Tissue Engineering for Therapeutic Use 2001
- 7、NAKAGAWA Y, NAKAMURA T, Osteochondral Grafting and Arthroplasty for End-satage, American Journal of Sports Medicin 2001

(2) 口頭発表

- 1、軟部吸収性材料フォーラム2002 京都（2002.3.30）

研究成果

関節軟骨欠損の修復について、家兎の膝関節をモデルとしてヒアルロン酸スポンジを carier とし、bFGF を局所に徐放したもので関節軟骨の修復を観察した。ヒアルロン酸スポンジは、ヒアルロン酸を酸処理した後、フリーズドライする事により作成した。またゼラチン粒子は、水に溶解したゼラチンを、オリーブ油と攪拌し、次にグルタルアルデヒドで架橋反応させ、洗浄した後凍結乾燥して作成した。

まず家兎の大腿骨顆間部に直径4mm 径の骨軟骨欠損をドリルを用いて作成し、これに対して bFGF 1 μ g 含浸したヒアルロン酸スポンジを充填した。ヒアルロン酸スポンジはラットの皮下で1週間で溶解するものを用いた。bFGF はゼラチンの粒子に吸着させ、ゼラチンの生体内での分解によって bFGF を約2週間局所に徐放させた。対照としては直径4mm 径の骨軟骨欠損のみのコントロール群、直径4mm 径の骨軟骨欠損にヒアルロン酸スポンジを充填したヒアルロン酸スポンジ群の合計3群を用いた。

術後4週、12週、25週、50週にて経時的に屠殺し、肉眼的、組織学的検討

を行った。得られた組織は、肉眼的に観察した後、中性緩衝ホルマリン溶液で固定した。次に 20%EDTA 溶液で2週間脱灰し、アルコールで脱水した後、パラフィン包埋した。さらにパラフィン包埋した組織のうち、骨軟骨欠損の中央部分を6 μ m の切片とした。この切片はトルイジンブルー染色、ヘマトキシリンエオジン染色、抗 type2 collagen 抗体免疫染色を行った。

肉眼的には4週、12週では骨軟骨欠損はまだ軟骨様組織では十分には充填されていない。25週、50週では bFGF 使用群では組織が十分充填されていた。また周囲との境界も不鮮明で、硝子軟骨様の組織が形成されていた。その他の群では、25週、50週では周囲との境界が鮮明な線維性組織で充填されていた。

組織学的観察では4週、12週ではヒアルロン酸スポンジの溶解性が早く、組織の骨軟骨欠損部への充填が不十分であり、それぞれの群で明確な差異は認められなかった。また再生した軟骨様組織のトルイジンブルー、抗 type2 collagen 抗体での染色性は低かった。25週、50週においてヒアルロン酸スポンジ+bFGF 使用群ではトルイジンブルーでの染色性の高い、抗 type2 collagen 抗体陽性の軟骨様組織で修復されており、matrix の産生も他群より多く認められ、軟骨様組織の再生が促進される傾向がみられた。また軟骨下骨の再生も優れていた。一方ヒアルロン酸スポンジ使用群とコントロール群では骨軟骨欠損部の組織の充填はヒアルロン酸スポンジ群の方がコントロール群より優れていたが、軟骨様組織の厚さ、軟骨下骨の再生、軟骨様組織の染色性はヒアルロン酸スポンジ+bFGF 使用群に比べて劣っていた。

今後の課題

- 1、今回行った実験では、ヒアルロン酸スポンジの溶解性が速く、そのために細胞の進入が不十分で、術後4週、12週での軟骨再生が不十分であった。今後さらに溶解性を遅くしたヒアルロン酸スポンジを作成し、適当な生体内でのヒアルロン酸スポンジの溶解性を検討する。
- 2、bFGF は関節軟骨の形成を促進し、軟骨基質の形成も促進していたが、bFGF 単独では軟骨の再生は不十分であり、今後他の成長因子を単独で徐放したり、もしくは数種類の成長因子の徐放を行って関節軟骨の再生が促進されるかを観察する予定である。
- 3、今回の実験では骨髄からヒアルロン酸スポンジ内に進入した骨髄間葉系細胞を軟骨細胞に分化誘導して、骨軟骨欠損の再生を行ったものであるが、骨髄から進入する細胞は骨髄間葉系細胞だけではないので、骨髄間葉系細胞を精製して移植する方法や、軟骨組織を培養して移植する方法も検討する必要がある。

結語

ウサギ膝関節の骨関節欠損をモデルとし、ゼラチン粒子に bFGF を吸着させたものをヒアルロン酸スポンジに含浸させて組織の再生を観察し、良好な結果を得た。これが臨床に応用されれば、関節軟骨再建の治療法として活用が期待される。

関節軟骨欠損の修復

関節軟骨欠損は、関節の機能を損傷し、疼痛、腫脹、運動障害を引き起こす。関節軟骨は、関節の滑らかな動きを維持するために重要な役割を果たしている。関節軟骨の再生は、自然に起こることは稀であり、したがって、関節軟骨欠損の治療は、関節の機能を回復させるために不可欠である。

関節軟骨欠損の治療には、手術と非手術の両方がある。手術は、関節軟骨欠損を修復するために必要である。非手術治療は、関節軟骨欠損を修復するために必要である。関節軟骨欠損の治療は、関節の機能を回復させるために不可欠である。

関節軟骨欠損の治療には、手術と非手術の両方がある。手術は、関節軟骨欠損を修復するために必要である。非手術治療は、関節軟骨欠損を修復するために必要である。

関節軟骨欠損の治療には、手術と非手術の両方がある。手術は、関節軟骨欠損を修復するために必要である。非手術治療は、関節軟骨欠損を修復するために必要である。

関節軟骨欠損の治療には、手術と非手術の両方がある。手術は、関節軟骨欠損を修復するために必要である。非手術治療は、関節軟骨欠損を修復するために必要である。

関節軟骨欠損の治療には、手術と非手術の両方がある。手術は、関節軟骨欠損を修復するために必要である。非手術治療は、関節軟骨欠損を修復するために必要である。

関節軟骨欠損の治療には、手術と非手術の両方がある。手術は、関節軟骨欠損を修復するために必要である。非手術治療は、関節軟骨欠損を修復するために必要である。

関節軟骨欠損の治療には、手術と非手術の両方がある。手術は、関節軟骨欠損を修復するために必要である。非手術治療は、関節軟骨欠損を修復するために必要である。

関節軟骨欠損の治療には、手術と非手術の両方がある。手術は、関節軟骨欠損を修復するために必要である。非手術治療は、関節軟骨欠損を修復するために必要である。

関節軟骨欠損の治療には、手術と非手術の両方がある。手術は、関節軟骨欠損を修復するために必要である。非手術治療は、関節軟骨欠損を修復するために必要である。

関節軟骨欠損の治療には、手術と非手術の両方がある。手術は、関節軟骨欠損を修復するために必要である。非手術治療は、関節軟骨欠損を修復するために必要である。

関節軟骨欠損の治療には、手術と非手術の両方がある。手術は、関節軟骨欠損を修復するために必要である。非手術治療は、関節軟骨欠損を修復するために必要である。

関節軟骨欠損の治療には、手術と非手術の両方がある。手術は、関節軟骨欠損を修復するために必要である。非手術治療は、関節軟骨欠損を修復するために必要である。

関節軟骨欠損の治療には、手術と非手術の両方がある。手術は、関節軟骨欠損を修復するために必要である。非手術治療は、関節軟骨欠損を修復するために必要である。