

## 主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：熊井 隆智

専攻分野：スポーツ医学

指導教授：藤谷 博人

主論文の題目：

A Novel, Self-Assembled Artificial Cartilage-Hydroxyapatite Conjugate for Combined Articular Cartilage and Subchondral Bone Repair:  
Histopathological Analysis of Cartilage Tissue Engineering in Rat Knee Joints.

(軟骨、軟骨下骨修復に向けた自己組織化技術を用いた人工軟骨-人工骨複合バイオマテリアルの創製 —ラット膝関節における軟骨組織の組織学的分析—)

共著者：

Naoko Yui, Kanaka Yatabe, Chizuko Sasaki, Ryoji Fujii, Mitsuko Takenaga, Hiroto Fujiya, Hisateru Niki, Kazuo Yudoh

緒言

関節軟骨は無血管で、全く修復能がないことから、一度変性・破壊が生じると関節機能は経時的に障害されていくため、人工関節置換術を迫られる症例も少なくない。我々は、未だ有効な治療法のない関節軟骨障害に対して、次世代の治療法と位置づけられる軟骨再生医療への応用を目標として、細胞を培養せずに作製する軟骨再生用バイオマテリアルを創製する技術を研究してきた。

近年、変形性関節症 (osteoarthritis, OA) 等の関節変性疾患の治療には、軟骨層ばかりでなく軟骨下骨層を含めた関節全体の再生・再建が必要であることが報告されてきた。そこで我々は、軟骨組織に加えて、軟骨下骨組織の修復も可能な再生医療用バイオマテリアルを開発すること目的として、細胞を用いずに、人工骨を基盤として階層的に軟骨基質成分 (コラーゲン、プロテオグリカン、アグリカン) を自己組織化させた新規の人工軟骨-人工骨複合体を創製し、バイオマテリアルとしての

特性ならびに軟骨・軟骨下骨層の再生能を実験動物モデルを用いて解析した。

#### 方法・対象

関節軟骨基質成分（ヒアルロン酸、プロテオグリカン、II型コラーゲン）のみを用い、これらを至適条件下で自己組織化させることで、人工軟骨を創製した。① この人工軟骨を scaffold としてヒト培養軟骨細胞を1、2週間培養し、人工軟骨の微細構造ならびに軟骨細胞の生着・増殖状態を電子顕微鏡で観察した。② 人工軟骨の片面に人工骨（ハイドロキシアパタイト）を固着させた人工軟骨-人工骨複合体を作製し、その複合体の粘弾性評価、ならびに電子顕微鏡による微細構造の解析を行なった。③ 9-11週齢のSDラット（雄、30匹）の左膝関節（大腿骨遠位端側）に直径2mm×深さ2mmの孔を開けた軟骨-軟骨下骨欠損を作製し、A) 人工軟骨のみを埋植した群、B) 人工軟骨-人工骨複合体（人工軟骨+人工骨ブロック体）、C) 人工軟骨+人工骨パウダー体（5μm径）、D) 人工軟骨+人工骨パウダー体（40nm径）を埋植した群の計4群に分けて飼育し、4週目と8週目に解剖し、各群の関節軟骨および軟骨下骨の再生能をInternational Cartilage Repair Society (ICRS) II scoring systemを用いて病理組織学的に解析した。右膝関節は軟骨-軟骨下骨欠損のみのコントロール群とした（本学動物実験委員会承認番号1708019号）。本研究は、聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会（承認1315号）の承認を得たものである。統計学的解析にはStudent's *t* 検定を用い、有意水準を $P < 0.05$ とした。

#### 結果

電子顕微鏡解析結果から、自己組織化人工軟骨は自家軟骨に類似した微細構造を有し、軟骨細胞の生着と増殖が培養1、2週間後に確認できた。人工軟骨-人工骨複合体についても、関節軟骨層と軟骨下骨層を模した微細構造が電子顕微鏡像において確認できた。

作製した各複合体の湿潤体、乾燥体、再湿潤体の3つのフォームにおける粘弾性を比較したところ、乾燥体がもっとも粘弾性が高く（ $P < 0.05$ ）、また各フォーム間の比較では、人工軟骨のみよりも人工軟骨-人工骨複合体の方が粘弾性は高い傾向を認めた。

動物実験（病理組織学的解析）では、4週目、8週目ともにコントロ

ール群では OA の進行を認めた。4 週目、8 週目ともに人工軟骨のみ埋植群では軟骨組織の修復を認めなかった。2 種類の人工軟骨＋人工骨パウダー複合体埋植群（人工骨 40nm powder 群、5  $\mu$  m powder 群）ともに、軟骨組織の修復および軟骨下骨修復を認めた。人工軟骨＋人工骨 block 複合体埋植群では、4 週目に軟骨修復と軟骨下骨修復を認めたが、8 週目では一部に軟骨および軟骨下骨修復が見られたものも、軟骨欠損部もあり全般改善度は低い傾向であった。ICRS スコア評価では、人工軟骨 - 人工骨複合体を埋植した群は、軟骨再生度および軟骨下骨再生度ともに、人工骨を含まない人工軟骨のみを埋植した群よりも優れていることが明らかになった ( $P < 0.05$ )。

### 考察

これまでに、OA の進行期から後期において軟骨変性に加えて、軟骨下骨層変化が生じており、OA の病態との関連が報告されている。しかし、軟骨下骨を治療する方法は現時点では報告が少なく、再生医療用バイオマテリアルを OA 治療に適応していくには、軟骨再生能に加えて、軟骨下骨修復能を持つことが望ましいと考える。

今回、我々が自己組織化技術を用いて創製した人工軟骨 - 人工骨複合体は、ラットにおいて軟骨層に加えて軟骨下骨の再生も誘導しうることが確認できた。今後さらに、人工軟骨の組成・微細構造に加えて、機能も正常関節軟骨組織に近似させていく必要がある。

### 結論

本研究のバイオマテリアルは関節軟骨欠損を修復するだけでなく、軟骨下骨の変性も修復できる可能性があることが示唆された。