

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業））
分担研究報告書

再発性多発軟骨炎の診断と治療体系の確立

—軟骨炎により侵された軟骨再生医療に向けた自己組織化バイオマテリアルの創製—

研究分担者 遊道 和雄 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター

研究要旨：再発性多発軟骨炎（relapsing polychondritis、以下 RP）は、原因不明で稀な難治性疾患である。本邦における疫学情報や病態研究は不十分であり、診断・治療のための指針が作成されていない。本年度は、平成21年度厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業[課題名：疾患の診断及び治療方法の更なる推進に関する研究]の計画に基づいて、聖マリアンナ医科大学および全国基幹医療機関・施設（RP診療担当科）の研究者で構成されるRP研究チームを組織し、病因・病態の解明ならびに、診断および治療法の確立を目指した研究を進めている。平成24年度は、本疾患の進行、すなわち軟骨炎（軟骨組織の炎症細胞浸潤・破壊）に対する新規治療法として再生医療導入の可能性を探求するため、自己組織化軟骨様バイオマテリアルの創製に向けた研究開発を行なったので報告する。

A. 研究目的

i) 研究の背景

再発性多発軟骨炎（relapsing polychondritis、以下 RP）は、原因不明で稀な難治性疾患である。本邦における疫学情報や病態研究は不十分であり、かつ診断・治療のための指針が作成されていない。その為、認知度が低く診断が見逃されているケースも多く、気道軟骨病変などの臓器病変を伴う患者の予後は極めて不良であり、診断、治療法の確立が急務である。

我々は平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業[課題名：再発性多発軟骨炎の診断と治療体系の確立]において、RP に対する患者実態・疫学調査(RP 239 症例)を行ない、本邦の患者実態(有病率、初発年齢、性差、臨床像、予後)に加えて、ステロイド剤や免疫抑制剤、生物学的製剤の治療薬の効果に関して新たな知見を得た。しかしながら、本症に対する薬物療法の有効性については未だ不明な点も多く、既に軟骨炎が進行し、変性破壊が進んでしまった軟骨組織病変については、薬物療法で進行を抑制することはできても、その組織そのものの機能を維持または再建することは困難と言わざるを得ない。

特に軟骨組織は、無血管・無神経分布の自己修復能のない組織であり、発生学的にも組織学的にも細胞外

マトリックスが組織体積比 90%（細胞成分 10%）を占め、かつ高度に分化した硬組織であることから、他の組織のように幹細胞等を培養して再生組織を作製しても、軟骨特有の組織・機能までを再生・再建できる技術レベルには至っていない。

ii) 本年度研究の目的

本年度研究の目的は、再発性多発軟骨炎における進行性の軟骨炎のため、重度に軟骨組織変性・破壊が進み、罹患軟骨部位の機能障害（気道軟骨の破壊、鼻軟骨破壊による鞍鼻、耳介軟骨破壊等）に対して軟骨再生医療を実現するための自己組織化軟骨様バイオマテリアルを創製することである。

iii) 期待される研究成果

本研究の達成によって、発症早期から進行期のうちに、炎症により変性破壊された軟骨部を修復させ、症状を治療し、RP 罹患軟骨の変性の広がりや破壊を防止する新しい治療戦略・再生医療の柱となるバイオマテリアルを早く世に出し、医療の場で役立てることを期待している。これにより、現在まだ予防または早期治療薬のない RP 患者の生命予後および QOL 低下を改善し、社会的損失と医療費の軽減の一助としたい。

さらに、現在研究が進んでいる iPS 細胞を用いた再生医療研究に対しても、軟骨組織固有の特性を生かし

た scaffold として本研究シーズを活用できることから、再生医療の実現に資するものとする。

B. 研究の概要

i) これまでの人工軟骨の問題点

① ヒト培養細胞を用いた人工軟骨

個々の患者由来の関節軟骨組織から分離した軟骨細胞を培養して増やす場合にも、間葉系幹細胞や iPS 細胞から軟骨細胞を誘導するにしても、軟骨組織を形成するためには細胞自体に軟骨マトリックスを産生させるプロセスが必須である。しかし、例えば 1 cm^3 の軟骨欠損を充填するには、 $2 \sim 5 \times 10^6$ 個の軟骨細胞が必要とされており、大型の再生組織を作製するために必要十分な細胞数を獲得するには細胞培養を数代にわたり続ける必要がある。このため継代培養中に軟骨細胞としての特性を失い、脱分化する可能性があり、細胞資源確保の観点から解決すべき問題点も多い。

ヒト軟骨細胞を培養した培養軟骨を用いた再生医療には、自己細胞を採取するための事前の手術や数週間の細胞培養を必要とする。さらに移植時の培養軟骨(ゲル状)は軟骨機能として必須の弾性を持たず、仮に移植した人工軟骨様組織が欠損部に生着してとしても軟骨に求められる機能(弾性)を発揮できる組織として維持されるか否かについては今後の詳解を待たねばならない。

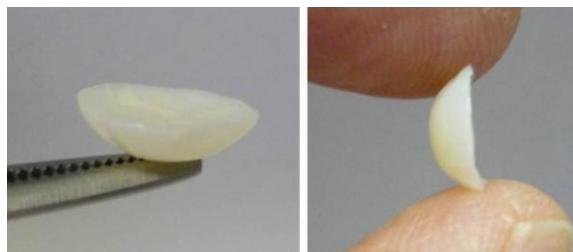
② 化学合成による人工軟骨

ヒアルロン酸を薬剤で架橋した例や、グリコサミノグリカンとポリカチオンを縮合剤で架橋したグリコサミノグリカン-ポリカチオン複合体の報告がある。しかし、架橋剤や縮合剤を用いた場合は、製造過程で架橋剤、縮合剤、副生成物を洗浄除去する手間がかかり、また、これらを体内に移植した場合は残留化学物質のリスクがある。

ii) 我々が開発中の人工軟骨

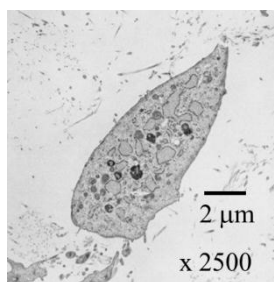
我々は、軟骨マトリックスの構成成分(II型コラーゲン、プロテオグリカン、ヒアルロン酸)のみを用い、各種反応条件下で軟骨様組織が形成されるか否

か検討した結果、成分の濃度及び pH 等を特定範囲に制御することで、 $0.1 \sim 500$ micrometer 長($10 \sim 50$ nanometer 径)の細線維からなる II 型コラーゲン-アグリカン複合体を自己組織化させることに成功した(特許査定手続き中 2013 年 2 月)。



人工軟骨様複合体

作製した人工軟骨様組織を位相差顕微鏡で観察したところ、細線維からなる密な網状構造が観察された。人工軟骨様組織を走査型および透過型電子顕微鏡で観察した結果、コラーゲン分子配列からなる細線維の網状構造間に、一本鎖のヒアルロン酸高分子に平均約 $100 \sim 200$ 個のプロテオグリカン分子が結合したアグリカン-ヒアルロン酸複合体が保持されている構造体が観察された。これは、生体軟骨組織の基本骨格であるコラーゲン線維網と、保水機能を担うプロテオグリカンがヒアルロン酸に結合した複合体に相当する構造に相当すると考えた。



電顕写真：バイオマテリアル内の軟骨細胞

(自著論文図より改変)

また、人工軟骨様組織の作製段階で、溶液中に浮遊培養軟骨細胞を加えることで、複合体中に細胞を播種し、 37°C の細胞培養器で 8 週間培養させたのち、光学顕微鏡視下に観察したところ、細胞の生着と増殖が観察された。この組織を走査型および透過型電子顕微鏡で解析すると、細胞突起を伸ばして複合体

に接着し、正常な細胞内小器官も観察された。

さらに研究を進めて、最終的には生体軟骨特性に近い弾力性 [1~2 MPa (メガパスカル)と表面低摩擦性(0.001~0.003)を有する製法を目指していく(文献)。

現在、実験動物を用いて、この自己組織化軟骨様バイオマテリアルの生体親和性および生体内における機能を試験中である。

結語

RPにおいて軟骨組織は再発・多発性に変性破壊されていく。軟骨組織は無血管で、かつ自己治癒能に乏しいことから、ADL 障害に対して QOL を維持するためには、予防とともに早期の比較的小範囲・軽度変性の段階から病変を治療して増悪させないような、発症早期~中期に対応した新しい治療法の確立が求められている。しかし、軟骨変性を早期から抑制し、保護する有効な医薬品は未だない。

我々は、未だ有効な治療法のない RP の軟骨障害に対して、次世代の中心的治療法と位置づけられる再生医療への応用を目標として、既存の軟骨再生技術に比べて構造・機能ともに生体軟骨により近似した「細胞を培養せずに作製する自己組織化軟骨再生用バイオマテリアル」を短時間で創製する技術を研究した。

文献

Yudoh K. A Novel Biomaterial for Cartilage Repair Generated by Self-Assembly: Creation of a Self-Organized Articular Cartilage-Like Tissue. Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, 2012, 3, 125-129.

知的財産

出願番号 PCT/JP2006/318188

自己組織化軟骨様バイオマテリアル

(2013年2月現在 特許査定手続き中)