

高純度硬化性ゲルを用いた低侵襲軟骨再生治療法の開発

北海道大学大学院医学研究科整形外科学分野

岩崎 倫政, 小野寺 智洋, 馬場 力哉

Norimasa IWASAKI, Tomohiro ONODERA, Rikiya BABA



1. はじめに

関節軟骨は硝子軟骨と呼ばれ、血管や末梢神経は存在せず、組織中唯一の細胞である軟骨細胞とType II コラーゲンや各種のプロテオグリカンを主体とする細胞外マトリックス、および水分より構成される。具体的には、水分を多く含む豊富な細胞外マトリックス中に、少数の軟骨細胞が点在している状態としてイメージされる(図1)。したがって、関節軟骨は組織修復に必須の細胞集積や血液供給に乏しいため、一度損傷を受けると自然修復能はきわめて低いと考えられてきた。さらに、軟骨細胞は容易に脱分化するため、組織が修復されたとしても本来の硝子軟骨ではなく、線維軟骨と呼ばれる正常な関節軟骨としての機能を有さない組織による修復が生じる。そのため、症候性の軟骨損傷に対する保存的治療の有効性は低く、何らかの外科的治療を考慮する機会が多い。

軟骨損傷に対する外科的治療としては、骨髄間葉系幹細胞 (bone marrow stem cell, BMSC) を損傷部へ集積させることで修復を促す骨髄刺激法、損傷部への力学的ストレスを減少させて修復を促す各種の骨切り術、正常部から円柱状の骨軟骨組織を採取して損傷部へ移植する自家骨軟骨柱移植術などの手術、もしくはこれらの複合手術(骨髄刺激法+骨切り術、自家骨軟骨柱移植術+骨切り術)が行われてきた。しかし、骨髄刺激法や骨切り術では線維軟骨による修復機転しか期待できず、その術後成績にも限界がある。一方、自家骨軟骨柱移植術では採取する組織に限界があり広範な損傷には対応できず、さらにドナー部位に生じる合

併症のリスクなど解決しがたい問題が存在する。

これに対し、従来の術式の問題点を解決するとして期待され臨床応用が進んでいる治療法が軟骨再生治療法である。1994年にBrittbergら¹⁾が、培養した自家軟骨細胞移植により満足すべき成績を報告して以来、欧米を中心に本治療法が広く行われるようになった。本邦でも、2013年4月より自家培養軟骨による再生治療法(ジャック)が保険適用下で実施可能となっている。

再生医療全体のなかで軟骨再生医療は、現在、最も広く臨床応用されている領域の1つであるが、現行の治療法の限界や臨床成績向上のために解決すべき問題点も報告されている^{2)~7)}。最大の問題点の1つが、手術手技上の侵襲性の高さである。現行の軟骨再生治療手技では、正常軟骨組織の採取、軟骨細胞の単離・培養、損傷部への培養細胞の移植とそれを被覆するために用いる骨膜の採取と移植部への逢着といった操作を要する。通常、これら一連の操作を行うためには2回の手術かつ関節切開直視下での移植操作が必要である。したがって、軟骨再生治療のさらなる成績向上のためには、確実な硝子軟骨の再生と同時に、手術操作の低侵襲化が不可欠である。

著者らは、この問題点を解決するため、新規高純度硬化性ゲルを用いた低侵襲軟骨再生治療法の開発研究を行ってきた^{8)~10)}。本稿では、これまでの研究成果を中心に本マテリアルを用いた軟骨再生治療の臨床応用の可能性について述べていく。

2. 高純度硬化性ゲル

現在考えられる最も低侵襲の軟骨再生医療は、関節鏡下1期的治療法である。関節鏡下手術を可能にするには骨膜による被覆を要さないシステムが必要であり、1期的治療法を実現する1つの戦略が細胞移植なしの再生治療法を開

■ 著者連絡先

北海道大学大学院医学研究科整形外科学分野
(〒060-8638 北海道札幌市北区北15条西7丁目)
E-mail. niwasaki@med.hokudai.ac.jp

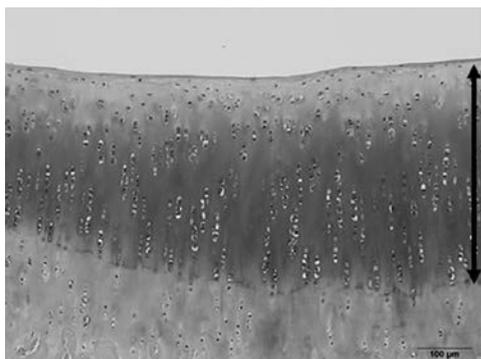


図1 正常軟骨組織 (HE染色)

細胞外マトリックス中(矢印)に、少数の軟骨細胞が点在している。

発することである。

著者らは、この目的のためにアルギン酸を基盤とした組織親和性に優れた高純度硬化性ゲルを開発し、移植部への骨膜被覆を必要としない関節鏡下移植システムを確立した⁸⁾。アルギン酸は海藻から抽出される多糖類で、単糖のD-マンヌロン酸とL-グルロン酸が結合した直鎖状のヘテロポリマーである。いずれの単糖もマイナス電荷を帯びたカルボキシル基を持ち、陽イオンと結合して塩を作る性質を有する。特に、2価のカチオンであるCaイオンとの親和性が高く、鋭敏に反応して2つの単糖を架橋するようにイオン結合する。アルギン酸はこのような性質を持ち、Caイオンと接触すると直ちにゲル化するため、ソフトバイオマテリアルとして再生医療分野などへ応用されてきた。一方で、アルギン酸は細胞を包埋するcarrierもしくは足場となるscaffoldマテリアルとして軟骨再生研究で用いられてきたが^{11)~13)}、自然界由来マテリアルのためエンドトキシン含有量が高く、生体内で炎症反応を惹起する危険性を有していた。したがって、ヒトへの臨床応用は困難であるとされてきた。これに対し、本マテリアルはエンドトキシン含有量を従来のものの約1/15,000まで減少させることで、生体内への安全な投与が可能となった。また、高分子量化(1,700 kDa)にも成功し、粘度が高く術中のハンドリングも容易になった。著者らが行った*in vitro*評価において、この高純度硬化性ゲルは従来軟骨再生用scaffoldとして用いられてきたcommercial gradeのアルギン酸と比較して細胞毒性がきわめて低く、かつ、高い細胞増殖能とBMSCから軟骨細胞への優れた分化誘導能を持つことが証明された⁸⁾。

3 *in vivo* 治療実験

*in vitro*での実験結果を踏まえ、成熟日本白色家兔の膝大腿骨膝蓋面に径5 mmの骨軟骨欠損を作成し、高純度硬化

性ゲル移植による治療効果を評価した⁸⁾。ゲル移植時には骨膜による被覆は行わず、マテリアルの移植のみで十分な表面強度が得られ、術後12週の評価時には移植したゲルまたは再生組織の欠損部からの脱落を認めたものはなかった。無治療群、高純度硬化性ゲル単独移植(BMSC移植なし)群、BMSC包埋高純度硬化性ゲル移植(2.5×10^7 個BMSC移植)群の3群間比較では、術後12週の肉眼および組織学的評価においてBMSC包埋高純度硬化性ゲル移植群で硝子様軟骨による修復が得られていた。一方で、高純度硬化性ゲル単独移植群においても比較的良好な硝子様軟骨による修復が得られていた。2つの治療群の肉眼的および組織学的スコアは無治療群に比べて有意に優れており、両治療群間では有意差は認めなかった。また、高純度硬化性ゲルを投与した両治療群において、修復部周囲および関節内での明らかな炎症所見や炎症細胞浸潤は認めなかった。

さらに、本ゲルに生体内の損傷部周囲に発現して幹細胞や前駆細胞の集積作用を持つケモカインのstromal cell-derived factor 1 (SDF-1)を包埋し、上記の家兔軟骨損傷モデルを用いてその治療効果を確認した⁹⁾。SDF-1包埋高純度硬化性ゲル群では、ゲル単独移植群と比較して損傷部へ集積する細胞数は有意に増加し、硝子様軟骨による修復が促進された。これらの結果より、我々が開発した高純度硬化性ゲルの単独移植(無細胞移植)でも、損傷部周囲の宿主細胞を遊走・集積させることで、軟骨組織修復が促進されることが明らかとなった。

4. 臨床応用を目指して

自家軟骨細胞を用いた軟骨再生医療の臨床応用が広く行われている欧米からは、軟骨再生治療法と従来の治療法との術後成績に関する比較結果が発信されてきた。その結果のいくつかは、現行の軟骨再生治療は必ずしも従来の治療法を完全に凌駕するものではないことを示唆し、同時に本治療法の限界や臨床成績向上のために解決すべき問題点を明らかにしてきた^{5)~7)}。加えて、移植する細胞やその培養のための動物由来血清の使用などに関する法的問題、現行の軟骨再生医療に要する医療費の高騰など、医療経済的問題も指摘されている。これらの問題点を解決するためには、低侵襲かつ安全性の高い治療システムの確立が不可欠である。著者らが開発してきた新規高純度硬化性ゲルを用いた無細胞移植軟骨再生治療法は、1期的手術が可能で低侵襲かつ安価な治療法となる可能性を秘めている。

本治療戦略の実際の臨床応用に関しては、従来行われてきた骨髓刺激法(ドリリング)によりBMSCを損傷部へ集

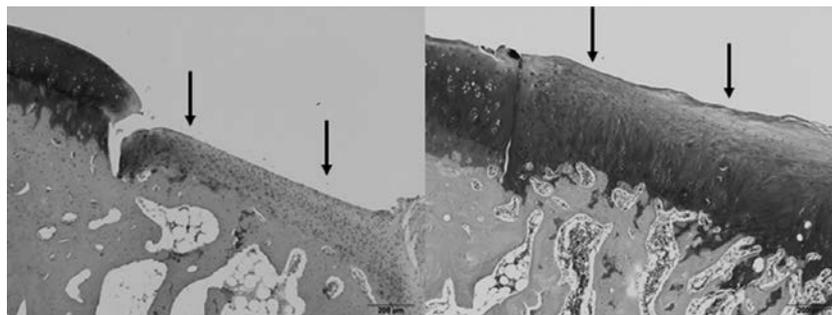


図2 手術後16週の修復軟骨組織 (HE染色)

無治療(左)骨髄刺激法+高純度硬化性ゲル投与(右)。無治療後には軟骨修復が得られない(矢印)が、骨髄刺激法+高純度硬化性ゲル投与により良好な軟骨修復が獲得されている(矢印)。

積させ、同部に移植した高純度硬化性ゲルが細胞の増殖・分化のための足場となり軟骨組織修復が促進されると考えられている¹⁰⁾(図2)。現在、これまでの研究成果に加えて、大型動物を用いた治療効果の確認、移植したゲルの生体内分解・吸収機序などの解明を行いつつ、高純度硬化性ゲルを用いた軟骨再生治療法の臨床応用への準備を推進中である。

謝 辞

本論文の内容の一部は、国立研究開発法人科学技術振興機構(JST)の産学共同実用化開発事業(NexTEP)の「硬化性ゲルを用いた関節軟骨損傷の治療」(開発実施企業:持田製薬株式会社)として実施された。

利益相反の開示

岩崎倫政:持田製薬株式会社(研究費,寄附金)

文 献

- 1) Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, et al: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Eng J Med* **331**: 889-95, 1994
- 2) Nehrer S, Spector M, Minas T: Histologic analysis of tissue after failed cartilage repair procedures. *Clin Orthop Relat Res* **365**: 149-62, 1999
- 3) Peterson L, Minas T, Brittberg M, et al: Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop Relat Res* **374**: 212-34, 2000
- 4) Minas T: Autologous chondrocyte implantation for focal chondral defects of the knee. *Clin Orthop Relat Res* **391** (Suppl): S349-61, 2001
- 5) Bentley G, Biant LC, Carrington RW, et al: A prospective,

randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *J Bone Joint Surg Br* **85**: 223-30, 2003

- 6) Horas U, Pelinkovic D, Herr G, et al: Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial. *J Bone Joint Surg Am* **85**: 185-92, 2003
- 7) Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen TC, et al: Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J Bone Joint Surg Am* **86**: 455-64, 2004
- 8) Igarashi T, Iwasaki N, Kasahara Y, et al: A cellular implantation system using an injectable ultra-purified alginate gel for repair of osteochondral defects in a rabbit model. *J Biomed Mater Res A* **94**: 844-55, 2010
- 9) Sukegawa A, Iwasaki N, Kasahara Y, et al: Repair of rabbit osteochondral defects by an acellular technique with an ultrapurified alginate gel containing stromal cell-derived factor-1. *Tissue Eng Part A* **18**: 934-45, 2012
- 10) Baba R, Onodera T, Momma D, et al: A novel bone marrow stimulation technique augmented by administration of ultrapurified alginate gel enhances osteochondral repair in a rabbit model. *Tissue Eng Part C Methods* **21**: 1263-73, 2015
- 11) Paige KT, Cima LG, Yaremchuk MJ, et al: De novo cartilage generation using calcium alginate-chondrocyte constructs. *Plast Reconstr Surg* **97**: 168-78, 1996
- 12) Mierisch CM, Cohen SB, Jordan LC, et al: Transforming growth factor-beta in calcium alginate beads for the treatment of articular cartilage defects in the rabbit. *Arthroscopy* **18**: 892-900, 2002
- 13) Steinert A, Weber M, Dimmler A, et al: Chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells encapsulated in ultrahigh-viscosity alginate. *J Orthop Res* **21**: 1090-7, 2003

