

令和 2 年 5 月 1 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19717

研究課題名(和文) 脱細胞化異種半月板移植は同種半月板移植に代替するか

研究課題名(英文) Is decellularized xenogeneic meniscus an alternative to allogeneic meniscus for meniscus transplantation?

研究代表者

関矢 一郎 (sekiya, ichiro)

東京医科歯科大学・統合研究機構・教授

研究者番号：10345291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：半月板損傷に伴う切除後欠損に対する新たな治療手段の模索のため、高静水圧印加処理を用いた脱細胞化半月板の作製を世界で初めて行った。本研究では、凍結融解処理後半月板と脱細胞化半月板を組織学的、生化学的、生体力学的、および免疫学的観点から比較検証を行った。高静水圧印加処理を用いた脱細胞化半月板は、機械的強度に関しては若干劣るものの、移植後の免疫反応に関しては優位であった。以上より、高静水圧印加処理脱細胞化半月板は、凍結融解同種半月板移植に代わる可能性を有する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦で制限されている同種半月板移植に代わる新たな半月板欠損に対する治療法の構築

研究成果の概要(英文)：We decellularized menisci using high hydrostatic pressure (HHP) and compared the decellularized menisci with freeze-thawed menisci in vitro and in vivo. Decellularization of meniscus was confirmed by histological and biochemical analyses. The compression strength of the HHP-decellularized menisci slightly decreased compared with freeze-thawed menisci. After implantation, the numbers of immune cells were significantly lower around the HHP-treated menisci than around the freeze-thawed menisci. Recellularization of the HHP-decellularized menisci was confirmed.

研究分野：整形外科学

キーワード：移植・再生医療 再生医学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

変形性膝関節症は主に加齢により関節軟骨が摩耗し、疼痛を生じる病態であり、国内に 2500 万人罹患している。半月板は膝関節内にある三日月状の線維軟骨であり、クッションの機能を有する。近年、変形性膝関節症の進行は半月板の変性・摩耗・機能低下が主要な要因になっていることが明らかになりつつある。移植用の半月板組織は欧米で市販されているが、抗原性の残存、力学的強度低下、ドナー不足等の問題を有する。岸田晶夫が開発した高静水圧処理脱細胞化により、力学的強度を保ったまま抗原性を除去する組織作成が可能になる。

2. 研究の目的

本研究ではヒトとサイズが同等のピッグの半月板を高静水圧処理脱細胞化することにより、脱細胞化ピッグ半月板移植が同種半月板の代替になるかを検討する。高静水圧処理脱細胞化組織の初めての製品化を目指すものであり、血管、心臓、角膜、皮膚、骨等の他の組織への発展がさらに期待できる。

3. 研究の方法

本学および協力施設の倫理委員会の承認を得て本研究を行った。

新鮮ブタ膝内側半月板を用いた。脱細胞群は 30 度、1000MPa で高圧処理を 10 分間施行後、DNase 含有溶液で 3 日間の核酸除去処理を 37 度で施行した。凍結融解群は半月板を -80 度で冷凍後、37 度で温浴し融解した。未処理半月板を正常群とした。

(1) 組織学的には HE 染色、DAPI 染色、サフラニン-O 染色およびピクロシリウスレッド染色を評価した。

(2) 生化学的には dsDNA とグリコサミノグリカン(以下 GAG)およびコラーゲンの含有量を定量した。

(3) 生体力学的には中節から径 8mm の円柱を作製し、10%ひずみ(生理的な圧縮)および 20%ひずみ(過負荷時の圧縮)時の圧縮応力、繰り返し圧縮後の 20%ひずみでの圧縮応力を測定し、各群の応力緩和に関しても検証した(N=6)。

(4) 生体適合性についてはブタの背部皮下に脱細胞化半月板および凍結融解半月板を移植し、移植後 3、14、28 日で組織を採取し、異物巨細胞の数により拒絶反応についての評価を行った(N=5)。

(5) 再細胞化に関しては、ブタ背部皮下に移植した脱細胞化半月板へのレシピエントの細胞侵入に関してその細胞数および深さに関して経時的に評価した。

4. 研究成果

(1) 脱細胞群(HHP 後 3 日間または 7 日間の核酸除去処理を行った群)では HE 染色像および DAPI 染色で核を認めなかった。サフラニン-O 染色像では未処理群と比較し他のすべての群で染色性の低下傾向を認め、HHP 後 3 日間の DNase 洗浄を加えた群で有意にサフラニン-O 染色面積が低下した。ピクロシリウスレッド染色では各群で染色性の変化は認めなかった。

(2) 脱細胞群の dsDNA 重量は HHP 後 3 日間の DNase 洗浄を加えた群で $4.9 \pm 0.8 \text{ ng/mg}$ 、HHP 後 7 日間の DNase 洗浄を加えた群で $2.9 \pm 0.3 \text{ ng/mg}$ であり、正常群、凍結融解群と比較し有意に減少した(図 1, $P < 0.05$)。

(3) GAG の定量では凍結融解群と同等であったが、DNase による洗浄期間に従って GAG の減少傾向を認め、HHP 後 7 日間の DNase 洗浄を加えた群では正常群と比較して有意な低下を認めた。

(4) コラーゲンの定量では、凍結融解群と比較し、HHP 後 7 日間の DNase 洗浄を行った群で有意に低下した。

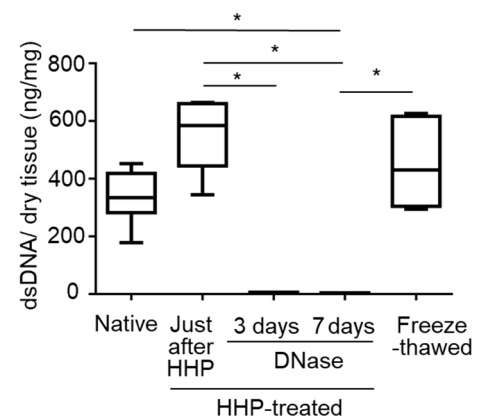


図 1 DNA 定量の結果

以上の結果から、以下の実験は HHP 後 3 日間の DNase 洗浄を行った群を脱細胞群として実験を行った。

(5)10%ひずみでの圧縮応力は 3 群間で有意差を認めなかった(図 2)が、20%ひずみでの圧縮応力や 50 回繰り返し圧縮後の 20%ひずみでの圧縮応力は脱細胞群で正常群、凍結融解群と比較し有意に低下した。応力緩和に関しても正常群と比較し、脱細胞群で有意に低下したが凍結融解群との比較では有意差を認めなかった。

(6)生体適合性に関する実験では、異物巨細胞の数は移植後 3 日、14 日、28 日のすべての日時に脱細胞群のほうが凍結融解群より有意に少なかった。再細胞化に関しては、細胞数および細胞侵入の深さのいずれに関しても経時的に増加傾向にあり、移植後 28 日では 3 日と比較し有意に増加した。

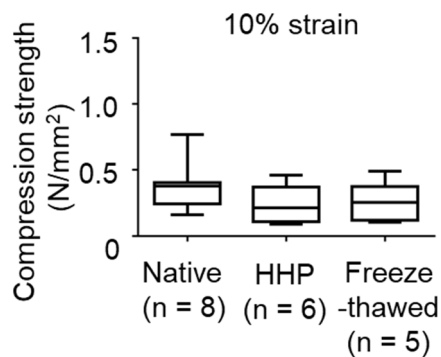


図 2 圧縮応力の結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Naoto Watanabe	4. 巻 37巻11号
2. 論文標題 Comparison of high-hydrostatic-pressure decellularized versus freeze-thawed porcine menisci	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Research	6. 最初と最後の頁 2466-2475
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jor.24350.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 渡部直人、大関信武、小田遼浩二、岸田晶夫、宗田大、古賀英之、関矢一郎
2. 発表標題 高静水圧印加処理を用いた脱細胞化半月板の作製および力学的強度の評価
3. 学会等名 日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会（ポスター）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡部直人、水野満、中村奈緒子、松田純平、大関信武、片野尚子、木村剛、岸田晶夫、古賀英之、大川淳、関矢一郎
2. 発表標題 高静水圧印加処理による脱細胞化半月板は凍結融解処理同種半月板移植の代替材料に成りうるか
3. 学会等名 日本整形外科基礎学術集会（口演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoto Watanabe, Mitsuru Mizuno, Junpei Matsuda, Naoko Nakamura, Koji
2. 発表標題 Comparison of decellularized meniscus by high hydrostatic pressure with freeze-thawed meniscus
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society（国際学会、ポスター）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 1. 渡部直人、水野満、中村奈緒子、松田純平、片野尚子、大関信武、木村剛、岸田晶夫、辻邦和、宗田大、関矢一郎
2. 発表標題 2. Ultra-High Hydrostatic Pressureを用いた脱細胞化半月板の作製および力学的強度の評価
3. 学会等名 日本臨床バイオメカニクス学会（口演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 1. 渡部直人、水野満、中村奈緒子、松田純平、大関信武、片桐健太、河野佑二、串田淑久、片野尚子、木村剛、岸田晶夫、辻邦和、宗田大、大川淳、関矢一郎
2. 発表標題 高静水圧印加処理による脱細胞化半月板の作製
3. 学会等名 日本整形外科基礎学術集会（口演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 1. Naoto Watanabe, Mitsuru Mizuno, Junpei Matsuda, Naoko Nakamura, Koji
2. 発表標題 2. Can Decellularized Meniscus by High Hydrostatic Pressure be an Alternative to Meniscus Allograft? - Compared with Deep Frozen Meniscus
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society（国際学会、口演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡部直人、水野満、松田純平、大関信武、片野尚子、小田遼浩二、辻邦和、古賀英之、大川淳、関矢一郎
2. 発表標題 高静水圧印加処理による脱細胞化半月板と凍結融解処理半月板の比較
3. 学会等名 日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡部直人、水野満、松田純平、大関信武、片野尚子、小田遼浩二、河野佑二、辻邦和、古賀英之、大川淳、関矢一郎
2. 発表標題 高静水圧印加処理による脱細胞化半月板と凍結融解処理半月板の機械的強度と生体適合性の比較
3. 学会等名 日本整形外科基礎学術集会 (シンポジウム)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Naoto Watanabe, Mitsuru Mizuno, Junpei Matsuda, Naoko Nakamura, Koji Otabe, Hisako Katano, Nobutake Ozeki, Yuji Kohno, Tsuyoshi Kimura, Kunikazu Tsuji, Hideyuki Koga, Akio Kishida, Ichiro Sekiya
2. 発表標題 The amount of collagen is not related to mechanical properties in high hydrostatic pressure-decellularized menisci and freeze-thawed menisci
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	岸田 晶夫 (Akio Kishida) (60224929)	東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授 (12602)	
研究協力者	小田遼 浩二 (Koji Otabe)		
研究協力者	渡部 直人 (Naoto Watanabe)		