

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2005～2008

課題番号：18591673

研究課題名 (和文) 骨髄間葉系幹細胞を用いた靭帯・腱付着部の構造再生に関する研究

研究課題名 (英文) The reconstruction of the enthesis with the cultured mesenchymal stem cells

研究代表者 高倉義典 (TAKAKURA YOSHINORI)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：40094578

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,700,000		1,700,000
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	540,000	4,040,000

研究成果の概要：靭帯・腱付着部の損傷に対して骨髄間葉系細胞を用いて構造再生を促進する基礎的研究を行った。実験は家兎の上肢肩関節に欠損部を作製し、まずは自然修復過程を観察した。靭帯・腱付着部のみの損傷では隣接組織である滑液包に存在する滑膜細胞からの反応が重要であることが分かった。次に骨髄間葉系細胞の欠損部への移植に対する修復促進過程を観察したが、有意な成果を得ることができなかった。同様に骨髄間葉系細胞による反応を確認するために靭帯・腱付着部の損傷作製時にその下層の骨髄まで損傷させた場合、骨髄からの反応により修復過程が促進されることが確認された。以上から骨髄間葉系細胞による靭帯・腱付着部の構造再生作用が明らかになった。

1. 研究開始当初の背景

膝関節の前十字靭帯損傷に対する再建術など整形外科およびスポーツ整形外科領域に於ける靭帯・腱骨付着部の損傷に対する構造再生は未だに満足する結果を得ることができず、現在も大きな課題である。これまでに様々な骨への腱移植の実験的試みがなされてきたが、腱-骨付着部にみられる特殊な四層構造を構築できたという報告はない。

2. 研究の目的

我々はこれまで骨髄間葉系細胞を用いた骨および軟骨の再生に対する研究を行っており、実際に臨床応用するまでに成果をあげてきた。また骨髄間葉系細胞が靭帯や腱にも分化する能力を有することは周知の事実であることから、靭帯・腱骨付着部の損傷に対

しても骨髄間葉系細胞により特殊な線維軟骨を介する四層構造をより解剖学的、組織学的に再生すると考えた。本研究により十分な成果が得られれば、これまで難渋していた難渋していた靭帯・腱骨付着部の損傷に対する治療が飛躍的に進歩する可能性が考えられる。

3. 研究の方法

3-1 腱付着部損傷モデルの作製と自然修復過程の観察

家兎の棘上筋腱骨付着部の中央 1/2 を腱および骨付着部組織を含めて切除し、周囲軟部組織は切除せず縫合する。切除後、3 日目、1、2、4、8、12 週後に標本採取し組織学的 (Toluidine blue, Alcian blue + haematoxylin, Masson's trichrome 染色)、

免疫組織学的 (Type I, II, III collagen, Chondroitine 4,6 sulfate, Aggrecan, Versican) に観察し、経時変化を捉える。

3-2 骨髄間葉系細胞の移植による修復促進効果の観察

家兎大腿骨または腸骨から骨髄細胞を採取し、間葉系幹細胞を増殖させる。骨部分の細胞担体としては多孔質ハイドロキシアパタイト (HA) を用い、腱部分の細胞担体としてはコラーゲンスポンジ (CS) を用いる。初期培養が終わった段階の未分化幹細胞 1×10^7 個/ml を HA と CS と共に欠損部に補填したモデルと、Dexamethasone の存在下で HA と CS の上で骨芽細胞に分化させた後補填するモデルの 2 種類を作成する。それぞれのモデルの対側にはコントロールとして担体のみを移植する。前実験と同時期に標本採取し、組織学的、免疫組織学的、力学的評価を行い、比較する。

3-3 靭帯・腱付着部ドリリング損傷モデルによる修復過程の観察

骨髄間葉系細胞の反応を見るために、家兎の膝蓋腱脛骨付着部にドリリングを付着部骨髄内まで行った。同様に経時的に標本採取し、組織学的、免疫組織学的に観察した。

4. 研究成果

4-1 靭帯付着部損傷モデルの作製と自然修復過程の観察

損傷作製後 1 週より靭帯付着部隣接組織である肩峰下滑液包内の滑膜組織の増生 (未分化間葉系細胞および新生血管の増生) が認められた。2 週になるとこれらの細胞および血管が滑液包側より滑液包側寄り損傷 (欠損) 部に侵入し、充填していく。欠損部が全て充填されるのは約 4 週であり、3 週の時点で、欠損部断端の腱および付着部組織に未分化間葉系細胞および新生血管が侵入していた。8 週の時点で未分化間葉系細胞は紡錘形の線維芽細胞へと置き換わり、12 週で徐々に配向性を持つようになった。免疫組織学的にも損傷作製後徐々に Type II collagen, Chondroitine 4,6 sulfate, Aggrecan の消失を認める反面、修復反応を示す Type III collagen の強い局在を確認した。

4-2 骨髄間葉系細胞の移植による修復促進効果の観察

培養した骨髄間葉系細胞を移植した群と HA と CS の担体のみを移植したコントロール群を組織学的に比較したところ、両群ともに明らかな差は認められなかった。修復過程の経時的な変化は前実験よりも遅く、不十分であった。使用したスカフォールドと培養した

細胞間の問題あるいは生体内でのスカフォールドおよび培養細胞の反応の問題などが考えられるが不明である。したがって免疫組織学的検討、力学的検討は行うことができなかった。

4-3 靭帯・腱付着部ドリリング損傷モデルによる修復過程の観察

組織学的観察では約 2 週の時点で損傷部に骨髄内からの炎症細胞の浸潤および血管の侵入が著明に認められ、4 週で欠損部への細胞の充填を、12 週で腱・靭帯骨付着部の構造が再生されていることが明らかになった。今回は組織学的観察のみであったが、今後、免疫組織学的、力学的検討を行う必要があると考えられた。

[主な雑誌論文] (計 7 件)

- ① Hayashi K, Kumai T, Higashiyama I, Shinohara Y, Matsuda T, Takakura Y. Repair process after fibrocartilaginous enthesis drilling: histological study in a rabbit model. J Orthop Sci. 14(1): 76-84, 2009. 査読有
- ② Kumai T, Yamada G, Takakura Y et al. Trace elements in human tendons and ligaments. Biol Trace Elem Res 114: 151-161, 2006. 査読有
- ③ Toumi H, Higashiyama I, Suzuki D, Kumai T et al. Regional variations in human patellar trabecular architecture and the structure of the proximal patellar tendon enthesis. J Anat 208: 47-57, 2006. 査読有
- ④ Ishimoto Y, Hattori K, Ohgushi H, Uematsu K, Tanikake Y, Tanaka Y, Takakura Y. Spectrocolorimetric evaluation of human articular cartilage. Osteoarthritis Cartilage. 24: 2009. 査読有
- ⑤ Nakamura A, Dohi Y, Akahane M, Ohgushi H, Nakajima H, Funaoka H, Takakura Y. Osteocalcin Secretion as an Early Marker of In Vitro Osteogenic Differentiation of Rat Mesenchymal Stem Cells. Tissue Eng Part C Methods. 3: 2009. 査読有
- ⑥ Isomoto S, Hattori K, Ohgushi H, Tanaka Y, Takakura Y. Rapamycin as an inhibitor of osteogenic differentiation in bone marrow-derived

mesenchymal stem cells. J Orthop Sci.
12: 83-88, 2007. 査読有

研究者番号 : 40382288

- ⑦ 篠原靖司, 熊井司, 高倉義典 踵腓靭帯の組織学的構造からみた機能について 日本足の外科学会誌 28(2) : 71-75, 2007. 査読有

[主な学会発表] (計 5 件)

- ① 篠原靖司 熊井 司 松田剛典 松本憲和 笠次良爾 東山一郎 高倉義典 除負荷状態における靭帯・腱付着部構造の変化-アポトーシスとの関連-日本整形外科学会基礎学術集会 2008年10月23-24日 京都市
- ② 篠原靖司 熊井 司 松田剛典 東山一郎 高倉義典 M.Benjamin (シンポジウム) Enthesisの組織構造とenthesis organ concept 日本整形外科学会基礎学術集会 2008年10月23-24日 京都市
- ③ 篠原靖司 熊井 司 松本憲和 高倉義典 東野義之 (ポスター) 除負荷状態における靭帯内含有微量元素の変化について 日本整形外科学会基礎学術集会 2008年10月23-24日 京都市
- ④ 熊井 司 (ランチョンセミナー) 腱・靭帯付着部症の基礎と臨床 日本整形外科学会基礎学術集会 2008年10月23-24日 京都市
- ⑤ 笠次良爾 熊井 司 篠原靖司 高倉義典 満野徹 橋本正道 (ポスター) 蛍光標識ヒアルロン酸ナトリウムのウサギ肩峰下滑液包内投与後の蛍光分布-腱板損傷と健全骨の比較- 日本整形外科学会基礎学術集会 2008年10月23-24日 京都市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高倉義典 (TAKAKURA YOSHINORI)
奈良県立医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 40094578

(2) 研究分担者

田中康仁 (TANAKA YASUHITO)
奈良県立医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 30316070

熊井 司 (KUMAI TSUKASA)
奈良県立医科大学・医学部・講師