

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2006～2009  
 課題番号：18591679  
 研究課題名 (和文) 脂肪由来の間葉系幹細胞を用いた関節軟骨修復法の開発と MRI による組織評価  
 研究課題名 (英文) Evaluation of articular cartilage made from mesenchymal stem cell derived from adipose using MRI  
 研究代表者  
 山下 剛司 (YAMASHITA TAKESHI)  
 帝京大学・医学部・講師  
 研究者番号 80407915

研究成果の概要 (和文): 運動器の再生医療分野で臨床応用が開始されている関節軟骨において、脂肪組織を用いた修復法の開発を *in vitro* を中心に検討した。また、軟骨造影 MRI を用いた関節軟骨の定性的評価を臨床例において検討し、手術後の細胞外基質の可逆的な修復現象など、新たな知見を得た。

研究成果の概要 (英文): New methods to treat the articular cartilage defects using adipose tissue *in vitro* were examined in the field of cartilage tissue engineering that already clinical trials had been started. Delayed gadolinium enhanced MRI of cartilage to evaluate the articular cartilage was efficient in clinical cases. New phenomenon that extracellular matrix could repair reversibly after an operation was observed.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,400,000	0	1,400,000
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
2009年度	100,000	30,000	130,000
年度			
総計	3,500,000	630,000	4,130,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：軟骨、MRI、幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 広範な関節軟骨損傷や変形性関節症に対して、正常な硝子軟骨による修復を可能とする治療法は、未だ確立されていない。本来、自己修復能に極めて乏しい関節軟骨を修復する方法として、近年、自家培養軟骨細胞移

植術 (以下 ACI) と自家骨軟骨移植術 (以下 Mosaicplasty) が臨床応用され、短期的には限局した範囲の関節軟骨を修復し得るとして、その臨床成績は比較的良好である。しかし、ACI は、採取した軟骨細胞の増殖能の低さから移植細胞数は限定され、硝子軟骨

を再生するのに十分な細胞密度の培養軟骨を移植するのは現状では困難である。また、Mosaicplasty は採取部位の面積の限界から、自ずと適応範囲は限定されてしまう。そこで、広範囲な軟骨損傷を治療するための、cell source として、軟骨細胞よりも増殖能の遥かに高い間葉系幹細胞（以下 MSC）が注目されている。

(2)MSC は、骨髄、脂肪、真皮、筋、血液などに存在するとの報告があるものの、それらを用いて従来の治療法との修復組織の違いを経時的かつ非侵襲的に比較した報告は未だなされていない。修復組織の多くは組織学的評価や RT-PCR また、MSC による再生軟骨の MRI を用いた評価法も確立されていない。したがって、再生組織を非侵襲的に評価する MRI での評価法の開発は、再生医療の発展に不可欠なものであると考えられていた。

## 2. 研究の目的

(1) 今回の研究目的は、動物実験モデルにおいて脂肪由来の細胞などを用いて軟骨組織を再生させる条件検討を行うことである。

(2) また、Glycosaminoglycan (GAG) 濃度の定量が可能な造影MRI (以下dGEMRIC) を用いて、臨床例においても変形性関節症の治療評価や、靭帯損傷術後の軟骨評価に応用可能な、定性評価型造影MRIによる修復軟骨組織の撮像条件を検討し、組織学的評価に代わり得るMRIによる非侵襲的な評価方法を確立することである。

(3) 現在の関節軟骨修復法は、ACIやMosaicplastyのように自家軟骨細胞もしくは自家骨軟骨組織を利用したものであり、その採取量の限界から適応範囲が限定されてしまい、広

範囲な軟骨損傷や変形性関節症などに応用するのは困難である。高齢化社会の中で患者数が増加し、ADLが著しく制限されるこれらの疾患に対して有効な治療法を開発することは、患者のQOLを高めるのみならず、介護負担を軽減する意味で医療経済上においても極めて有益である。今回、MSCを用いた軟骨修復法を確立することにより、変形性膝関節症への臨床応用が期待される。

また、これらの方法を、MRI用いて非侵襲的に評価することにより、biopsyによって修復組織を傷つけることなく移植部の経時的变化を定性的に明らかにすることが可能となり、MSCの臨床応用の可能性が提示できるものと考えられる。加えて、MRIを用いることにより、実験動物のsacrificeを最小限に抑えることが可能で、動物愛護の観点からも意義が深いものと考えられる。

## 3. 研究の方法

(1) 幹細胞を用いた軟骨分化の実験系を確立すべく、最も軟骨分化しやすい幹細胞の一つと報告されている滑膜由来幹細胞を用いて *in vitro* の研究を施行した。本実験は、軟骨分化の共培養における軟骨細胞の滑膜由来幹細胞へ与える影響を調べることを初期の目的に行った。

方法：Cell Culture Insert を用いて上層に軟骨細胞・下層に滑膜由来幹細胞を播種し、Johnstone らの chondrogenic medium を用いて、7日・14日間の共培養を行った。上記培養条件を Treatment 群とし、Negative control には腱細胞由来の fibroblast を上層に用い、下層に滑膜由来幹細胞を播種した。評価には DNA content、Proteoglycan content を用いた。

(2) dGEMRIC を用いて変形性膝関節症の Kellgren Laurence 分類と MRI の相関を検討した。57 膝において、単純 X-P の grading と dGEMRIC における T1 値を比較した。

(3) dGEMRIC を用いて ACL 再建術後の関節軟骨の細胞外基質濃度の経時的な評価を行った。

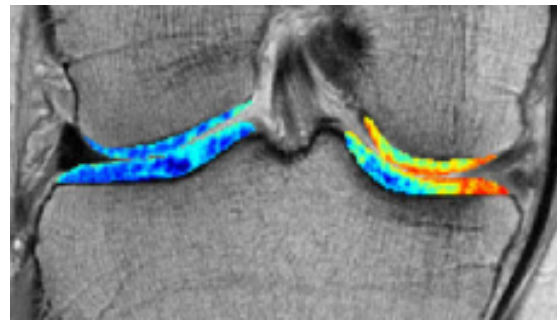
(4) dGEMRIC を用いて高位脛骨骨切術後の関節軟骨の細胞外基質濃度の経時的な評価を行った。

#### 4. 研究成果

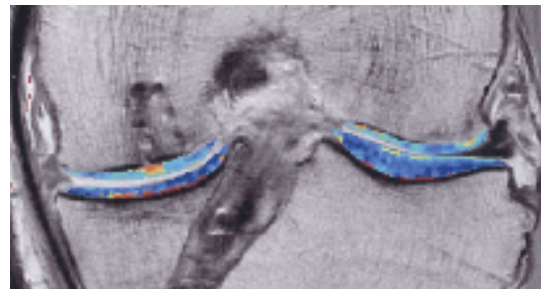
(1) Chondrogenic medium 中の TGF- $\beta$ 1 の濃度を 1ng/ml に設定したものは Treatment 群と Negative control 群の間で DNA・PG 共に有意差を認めず、軟骨細胞からの液性因子の幹細胞への軟骨分化誘導の影響は認められなかった。

Chondrogenic medium 中の TGF- $\beta$ 1 の濃度を 0.1ng/ml に設定したものは Treatment 群と Negative control 群の間で DNA・PG 共に有意差を認めないものの、Treatment での PG 濃度が、Day7 : 0.764ug/ml、Day14 : 2.045ug/ml と Negative control 群 (同 : 0.683 ug/ml、1.710 ug/ml) に比してより高い傾向があった。

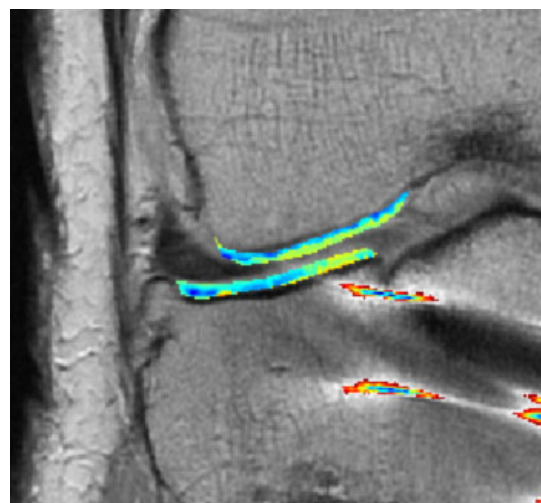
(2) Kellgren Laurence grade 0 から grade 3 に対して、dGEMRIC における T1 値は優位に相関していた。以下の図の赤い部分は変性した軟骨部を描出し、青い部分は健常軟骨を描出している。



(3) ACL 再建術後の関節軟骨の細胞外基質濃度は術後 3 カ月で一過性に低下し術後 9 カ月で可逆的に回復を認め、細胞外基質レベルでは関節軟骨は自己修復しうる可能性が示唆された。以下の図は、Mosaicplasty を併用した例においても可逆的に細胞外基質が回復した例である。



(4) 高位脛骨骨切術後の関節軟骨の細胞外基質濃度は、外側コンパートメントにおいて、術後早期に一過性に低下し、術後 6 カ月で回復する事が示された。以下の図は術後 6 カ月の回復した軟骨部を示している。



5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計10件)

① 山下 剛司

軟骨造影MRIを用いた前十字靭帯再建術後の関節軟骨評価  
日本関節鏡学会(JOSKAS)  
2009年6月25日 札幌

② T. Yamashita

Evaluation of the articular cartilage using dGEMRIC after HTO  
日仏整形外科学会  
2009年5月29日 沖縄

③ 山下 剛司

軟骨造影MRIを用いた変形性膝関節症の評価  
日本関節症研究会  
2009年5月23日 横浜

④ T. Yamashita

Evaluation of ankle cartilage injury using dGEMRIC technique  
国際関節症学会(ISAKOS)  
2009年4月4日 大阪

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 剛司 (YAMASHITA TAKESHI)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：80407915