

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16610

研究課題名(和文)半月板損傷後の修復プロセスの解析に基づいた再生医療実現可能性の検証

研究課題名(英文) ACUTE INFLAMMATORY RESPONSE IS PREREQUISITE TO INITIATE PROPER HEALING PROCESS DURING MENISCAL REGENERATION IN MICE.

研究代表者

日山 鐘浩 (HIYAMA, Kanehiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：90815789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの半月板は、内縁部まで至る切除を行なっても再生することが、経験上知られている。マウスにおける半月板再生過程の解析から得られる知見は、ヒト半月板再生のヒントを与えてくれるとの考えの下、内側半月板前方1/2切除後の再生過程の詳細な解析を行なった。その結果、半月板の再生のプロセスは、炎症、構造体の再構築、軟骨分化3ステージが、決まった時間軸で生じることで生じることを示した。それぞれのステージは、前のステージで起こる反応が起点となっているとの仮説から、本研究では、隣接滑膜で観察された急性炎症が、その後観察される切除部位への線維芽細胞の集積に必須であるか否かの検証を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトと異なり、マウスの半月板は、内縁部まで至る切除を行なってもある一定の期間後、元の大きさと形で再生することが、経験上知られているが、マウスの半月板再生の分子メカニズムを詳細に解析した先行研究は乏しい限り存在しない。本研究では、マウスで観察される半月板再生のプロセスを詳細に解析することにより、ヒトにおける半月板再生医療の開発のための新しい学術的基盤を構築することを目指す。

研究成果の概要(英文)：Meniscus is a wedge-shaped fibrocartilagenous tissue important for shock absorption and stability of the knee joint. Previous studies indicated that the failure of meniscal functions significantly exacerbated the degeneration of contiguous articular cartilage. We have performed histological assessments during the regenerative process after transection of anterior half of medial meniscus in mouse and reported that acute synovial inflammation was observed within 3 days after meniscectomy. Massive fibroblastic cell migration was observed between 2 to 4 weeks, and cartilagenous tissue formation by 6 weeks. In this study, to examine the roles of acute inflammatory responses in synovial membrane to initiate the regenerative process, we examined the effect of anti-inflammation drugs on the process of meniscal regeneration after meniscectomy in mice, which is advantageous in genetics.

研究分野：整形外科学

キーワード：半月板 再生 炎症 滑膜線維芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

半月板は、膝関節の大腿骨と脛骨の間に位置する、三日月型の線維軟骨組織で、膝関節の力学的負荷の低減、安定化、及び潤滑に機能していると考えられている。半月板損傷や、半月板切除術の施行による半月板機能の喪失、加齢に伴う半月板の細胞外基質の退行変性に起因する機能低下は、関節疼痛や膝のロッキング等の日常生活動作(ADL)の減少に直接結びつく症状を誘導するとともに、隣接する関節軟骨の変性を引き起こし、変形性膝関節症の重要な危険因子となることが報告されている (Poulsen E., et al., Br J Sports Med 2019; 53:1454-1463)。

半月板は、解剖学的には、比較的血管に富む外縁領域、ほぼ無血管組織である内縁領域とその中間の領域の3種類に分類されている。外縁部の損傷に対しては、縫合術が施行される例が多く、その術後成績も概ね良好とされている。これに対して、内縁部は自己修復能力に劣るため、一般的に正常と思われる領域を残して切除(トリミング)を行うことが多い。内縁部と外縁部の修復能力の差は血管分布の差や細胞外基質の質的差異に起因すると考えられているが、詳しい理由は未だ不明である。半月板の部位毎の損傷後修復能力の違いを科学的に解釈するためには、胎生期、生後の半月板形成過程や、半月板機能発現に重要と考えられる生後の組織の成熟のプロセスの詳細な解析が重要であると考えられるが、この領域の研究は、現在までほとんど進捗が得られていない。

ヒトと異なり、マウスの半月板は、内縁部まで至る切除を行っても、ある一定の期間後、元の大きさと形で再生することが、経験上知られている。本研究では、マウスにおける半月板再生過程を詳細に検討することにより、ヒトにおける半月板再生医療開発のためのヒントを探索するとの考えに立脚している。

そこで本研究では予備的検討として、マウス膝関節内側半月板前方1/2切除術の手技の確立と、切除後の再生過程の詳細な組織学的解析を行なった(図1, 原著論文 Hiyama K., et al., J Orthop Res 2017;35: 1958-1965)。その結果、半月板切除部位に隣接する滑膜組織におけるマクロファージの浸潤が切除後3日に観察されること、滑膜の炎症所見(Cellularityの増加)は2週間で最大になることを明らかとした(図2)。切除部位における肉芽組織の形成は切除後2-4週までに観察され、肉眼的には4

週目までに元の半月板に近い構造体の形成を観察した(図3)。組織学的所見では、切除部位に新たに形成された軟組織の軟骨分化が、4週から6週にかけて急激に進行することが明らかとなっ

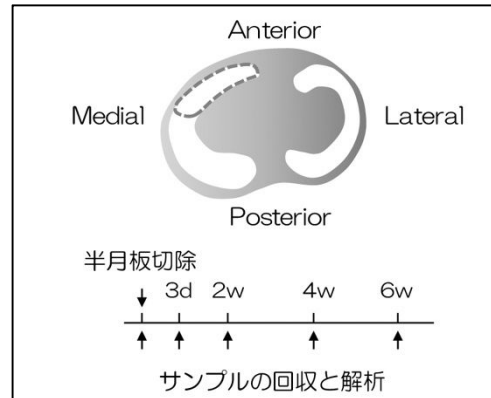


図1 実験の概要
内側半月板前方1/2切除(図中の点線で囲まれた部分)後、3日、2週、4週、6週目にサンプルを採取し組織学的解析を行なった。

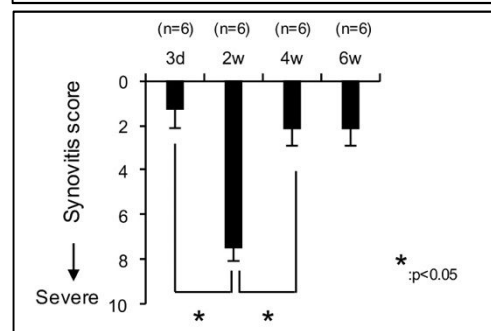


図2 半月板切除後の滑膜炎の時間経過
内側半月板切除後、隣接する滑膜組織の炎症(細胞密度)は2週で最大になりその後消退する。炎症の重症度はSynovitis Scoring Systemを用いて行なった。

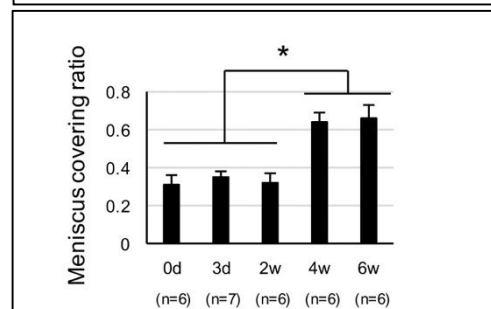


図3 半月板切除後の半月板様組織再構築の時間経過
内側半月板切除後、新たに形成された半月板様組織による内側脛骨高原の被覆率を示している。切除後2週以降、肉眼的に見て急速に半月板様構造体の形成が観察される。

た(図4)。以上の実験結果から、図5に示す半月板再生の模式図が考えられた。すなわち、切除後3日までに生じる急性炎症が修復プロセスの起点となり、隣接滑膜における線維芽細胞の集積が生じる(急性炎症期)。その後、2-4週にかけて滑膜より線維芽細胞の遊走が生じ欠損部位での半月板様構造体の再構築が生じる(形成期)。4週以降、構造体に内包された細胞の軟骨分化が誘導され、6週間で再生のプロセスがほぼ終了する(分化誘導期)。

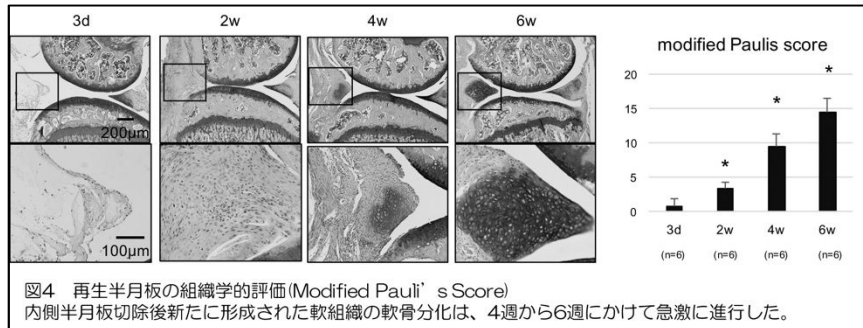
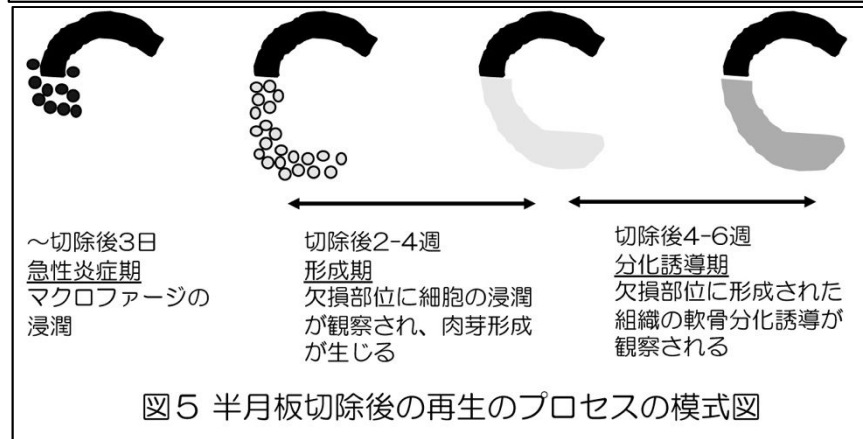


図4 再生半月板の組織学的評価(Modified Pauli's Score)
内側半月板切除後新たに形成された軟組織の軟骨分化は、4週から6週にかけて急激に進行した。



2. 研究の目的

予備的検討で示した結果から、半月板再生のプロセスは、炎症、形成、分化(成熟)の3種類の反応が連続して生じることが重要であると考えられた。それぞれの時期に起こる反応がどのようなメカニズムで次のプロセスを誘導するか(起点となるか)を明らかとすることを本研究の主たる目的とする。具体的には、

隣接滑膜で観察された急性炎症は、その後に観察される切除部位への線維芽細胞の集積に必須であるか否か、

切除部位に形成された肉芽組織の軟骨分化を制御する因子の同定、
の2種類の問いに対する結論を得ることを本研究計画の最終的な目標とした。2年間の本研究期間では、特に半月板切除後の炎症反応の半月板再生のプロセスにおける重要性(検討項目)に関して詳細に検討することを目的とした。

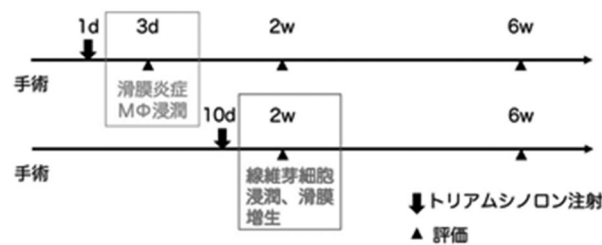
ヒトと異なり、マウスの半月板は、内縁部まで至る切除を行なってもある一定の期間後、元の大きさと同形で再生することが、経験上知られているが、マウスの半月板再生の分子メカニズムを詳細に解析した先行研究は乏しい限り存在しない。本研究では、ヒトにおける半月板再生医療の開発のための新しい学術的基盤を構築することを目指す。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために、以下に示す3種類の実験の結果を通じて急性期の炎症反応がその後続く半月板欠損部位への組織再生の起点となることの検証を行う。

(実験1) In vivo 実験として、急性期の炎症が観察される切除後1日目、または線維芽細胞の浸潤が進行中の切除後10日目に関節内に抗炎症剤を注射して強制的に消炎効果を誘導した場合、その後の修復反応にどのような障害が生じるかを検証する。使用する抗炎症剤として、トリアムシ

ノロン(ケナコルト)を用い、マウス一膝あたり2.8マイクログラムを注射する。使用量は、ヒトの使用量を基準に体重換算で算出した。切除後、2週及び6週でマウスを屠殺し、半月板の再生の程度を組織学的解析により評価する。



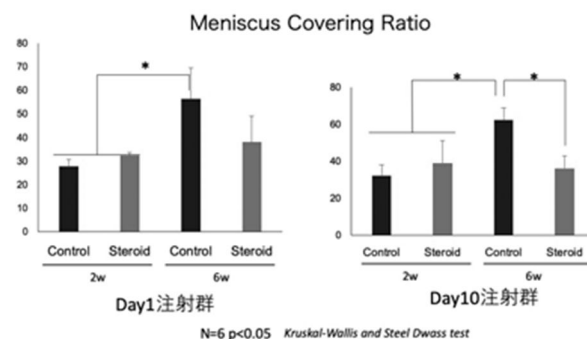
(実験2) Ex vivo 実験として、炎症が抑えられた滑膜に間葉系細胞の outgrowth 能力があるかどうかの検証を行う。炎症後、細胞浸潤の兆候が観察される直前の切除後1日目、または線維芽細胞の浸潤が進行中の切除後10日目に関節内にトリアムシノロンを注射しその後滑膜組織を採取、培養し、滑膜からの細胞浸潤の観察を行う。

(実験3) 滑膜組織を構成する細胞は、線維芽細胞とマクロファージであることが知られている。滑膜マクロファージが半月板再生のプロセスに及ぼす生理作用を検証するため、クロドロン酸内包リポソームを半月板切除2日前に関節内注射し、マクロファージを選択的に欠失させた状態で、半月板の再生過程を組織学的に検証する。

4. 研究成果

(実験1) 急性炎症期(Day1)または細胞浸潤期(Day10)にトリアムシノロンを関節内注射した場合の半月板再生過程の観察。

実験計画図に基づいて、半月板切除後1日目または10日目にトリアムシノロンを関節内注射し、炎症反応の抑制を行った。その後の半月板の再生を2週、6週時点で観察した。その結果、急性炎症期にトリアムシノロンを

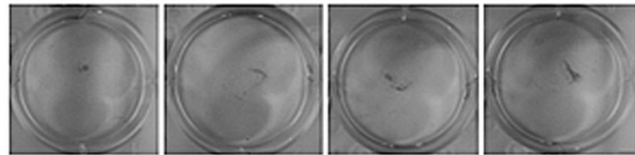


注射して、炎症の初期段階から反応を抑制した群においては、切除後6週における半月板再生の程度(Meniscus Covering Ratio: 内側脛骨高原の面積における半月板の被覆率(%))は、コントロールに対して低下していた(上図)。同様の傾向は、トリアムシノロンを切除後10日目に関節内投与した場合も観察された。これらのことから、初期の炎症反応で分泌される因子がその後の半月板再生のプロセスに促進的に作用している可能性が考えられた。

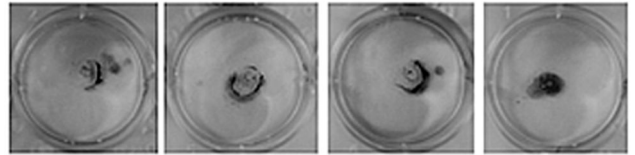
(実験2) 急性炎症期(Day1)または細胞浸潤期(Day10)にトリアムシノロンを関節内注射した場合の滑膜組織からの線維芽細胞の Outgrowth 抑制効果の検証(Ex Vivo)。

半月板切除後 1 日目または 10 日目に
トリアムシノロンを関節内注射し、炎症
反応の抑制を行った。その後膝蓋下
脂肪体および滑膜組織を含む膝蓋腱を
採取し、培養皿に静置して、線維芽細胞
の Outgrowth を誘導した。培養皿を
Crystal Violet 染色を行なって細胞の
Outgrowth の程度の比較を行なった。図
は、1 日目にトリアムシノロンを注射し

トリアムシノロン注射群



コントロール



Day1 注射群 Crystal Violet染色

た結果である。図に示す通り、トリアムシノロン注射群では、培養皿への線維芽細胞の outgrowth が顕著に抑制されていることが明らかとなった。これらの結果から、炎症反応は再生のプロセスにおいて、組織の再構築の際の細胞走化性を上昇させる働きがあることが示唆された。

(実験 3) クロドロン酸内包リポソームによる滑膜マクロファージの枯渇が半月板再生プロセスに及ぼす影響の検証。

半月板切除 2 日前に関節内注射し、マクロファージを選択的に欠失させた状態で、半月板の再生過程を組織学的に検証したところ、コントロールに比して顕著な再生のプロセスの遅延は観察されなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 尾島美代子、日山鐘浩、辻邦和、大川淳、関矢一郎、宗田大、古賀英之 |
| 2. 発表標題 マウス半月板再生過程において初期炎症反応は必須である |
| 3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Ojima, M., Hiyama, K., Miyatake, K., Katagiri, H., Muneta, T., Sekiya, I., Koga, H., and Tsuji, K. |
| 2. 発表標題 Acute inflammatory response is prerequisite to initiate proper healing process during meniscal regeneration in mice. |
| 3. 学会等名 Osteoarthritis Research Society International (国際学会) |
| 4. 発表年 2018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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
| | | | |