

平成 21 年 4 月 28 日現在

研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2007 ～ 2008
 課題番号：19791042
 研究課題名 (和文) BMP を用いた組織学的半月板再建術の開発
 研究課題名 (英文) Meniscus reconstruction by a tendon autograft with recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a rabbit model
 研究代表者 星 学 (Hoshi Manabu)
 大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師
 研究者番号：50445037

研究成果の概要：

rhBMPを用いて半月板の代替材料となるうる軟骨化腱の最適化及び軟骨化腱を用いて臨床に直結した動物実験モデルでの有用性を検証した。

白色家兎の半腱様筋腱にrhBMPを注入した結果よりrhBMP注入後10～14日にかけて腱内に軟骨細胞の出現と軟骨基質産生がみられ、その後骨化に進むことが確認できた。rhBMP注入後10日の軟骨化腱を半月板の代替物として半月板再建術を行った。

再建術後1,2ヶ月で高率に半月板内に骨化が見られた。組織像では半月板内（主に関節包側）に骨化が見られた。このことから関節外で軟骨化腱を誘導し、それを移植材料として半月板再建とする2期的手術では骨化まで誘導されることがわかった。よって低酸素環境下である関節内でBMPを作用させる1期的手術を計画し、実施している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

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：BMP、半月板、再生医療、スポーツ医学

1. 研究開始当初の背景

半月板は組織学的に線維軟骨で構成されており、その弾力性によって関節にかかる荷重の緩衝や吸収に大きく寄与している。半月板損傷による半月板切除術後に関節軟

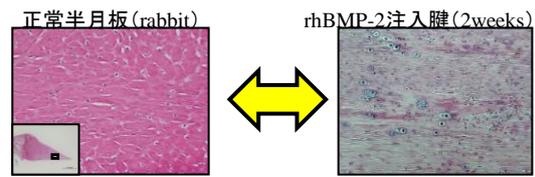
骨が損傷し、関節症変化が出現することは周知の事実であり、半月板を修復、再生させることは臨床的意義が大きい。半月板の血行動態は辺縁側の10～30%にのみ分布し、それ以外の大部分は無血行野である。

このことは半月板損傷後の組織修復の困難さを物語っている。現在の半月板損傷に対する治療は、血行野における断裂は半月板縫合、無血行野では半月板切除とされているが、血行野においても半月板切除されるケースが散見される。海外では、このような症例に対し同種半月板移植がなされているが、病原性、強度不足などの問題が解決されていない。人工半月板の開発もなされているが、病原性のない、十分な強度、耐久性を有したscaffoldsはいまだ開発されていない。その他として自家腱を半月板の代替材料として使用した、自家腱移植術も行われているが、組織学的に異なった材料であり、本来の機能を有するかは不明である。今後、病原性がなく組織学的に類似した代替材料が必要であると考えられる。半月板は複雑なコラーゲンネットワークと軟骨基質を含んだ構成体であり、この特異な構造によって多大な力学的ストレスに対する分散が可能になっている。ところが一度損傷を受けると容易には再生せず、修復させることは臨床的な課題となっている。また現在のところ複雑なコラーゲンネットワークの再現、組織学的特長を人工補填材料で再現することは不可能である。わが国では同種移植は困難な状況にあり、現実的には自家組織での修復を行う必要がある

BMPは近年遺伝子組み換え技術によって生産可能となり整形外科臨床で骨再生に利用されることは確実であるが、このBMPを半月板の組織学的再生に利用することはこれまでに全く行われていない。

我々は以前の研究により、BMPを腱内に注入すると内軟骨性骨化と同様の過程を経て腱内骨化が生じることを明らかにしていることから、時間的、量的制御によって腱内軟骨化を起し、半月板再建マテ

リアルに使用可能と考えた。



2. 研究の目的

BMPを用いて、半月板の代替材料となるような軟骨化腱の最適化及び軟骨化腱を用いて臨床に直結した動物実験モデルでの有用性を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

白色家兎 (3.2~4.0kg) の半腱様筋腱に対して rhBMP を注入する。移植後 7・10・14・21 日ごとに半腱様筋腱を採取、腱の形態を観察する。またレントゲン撮影、組織学的評価を行い、正常の半月板の大きさや類似した組織像を呈する rhBMP の量を検索する。軟 X 線装置 (ソフロン) を用いて BMP による腱内軟骨化を 7・10・14・21 日で撮影、測定し骨形成を評価する。採取した半腱様筋腱を H-E, toluidine blue 染色を行った。以上から軟骨形成形態の把握と発生時期、半月板として利用できる時期を検討した。

次に軟骨化腱を使用した半月板再建術の臨床応用に向けての実験的モデルの作成を行った。あらかじめ最適化された条件において作成された軟骨化腱を採取し、ウサギ膝内側半月板を切除した後、軟骨化腱を内側後方から関節内に翻転し、inside-out に関節包に縫着する。コントロールとして半腱様筋腱のみを関節内に縫着する。この半月板再建術モデルを 1, 2 ヶ月で屠殺した。

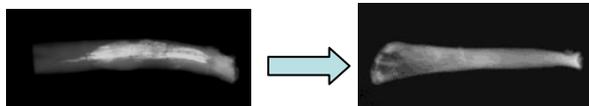
再建術膝を軟 X 線装置 (ソフロン) を用いてレントゲン撮影し、半月板内の異所性骨化の評価を行った。

その組織切片を H-E, toluidine blue 染色を行い、軟骨形成形態の把握と発生時期、

半月板として利用できる時期の検討をする。軟骨化腱を使用した半月板再建術の臨床応用に向けての実験的モデルの作成
 あらかじめ最適化された条件において作成された軟骨化腱を遠位付着部を残して採取する。ウサギ膝内側半月板を切除した後、軟骨化腱を内側後方から関節内に翻転し、inside-outに関節包に縫着する。コントロールとして腱のみを関節内に縫着する。この半月板再建術モデルを1、2ヶ月で屠殺し、レントゲン、半月板の評価、軟骨評価を行う。

4. 研究成果

白色家兎の半腱様筋腱に rhBMP を 10ug 注入し、注入後 7・10・14・21 日に組織採取してレントゲン及び組織学的評価を行った。注入後 7・10 日ではレントゲン上明らかな石灰化は認めなかった。注入後 14 日では腱内に点状の石灰化が出現し、21 日では腱内に彌慢性の骨化を認めた。

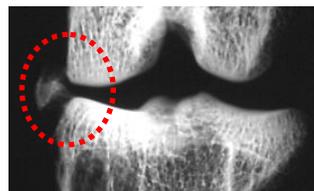


BMP 注入後2 週

10 日では石灰化なし

H-E 染色では、注入後 7 日では著明な変化は認めなかったが、10 日では腱内に細胞の増加を認めた。注入後 14 日では円形を呈する肥大軟骨様細胞の増殖を著明に認め、腱内に点状の石灰化が出現した。21 日では肥大軟骨様細胞は減少し、骨化部分を一部に認めた。一方、toluidine blue 染色では、注入後 7 日で軟骨基質を表す異染性を腱内の一部分に認めた。10 日では腱内全体に淡い異染性を認め、14 日では強く異染性を認めた。21 日では異染性を認める範囲は減少していた。これらの結果より rhBMP 注入後 10~14 日にかけて腱内に軟骨細胞の出現と軟骨基質産生がみられ、その後骨化に進

むことが確認できた。20, 40ug では骨化形成が強く誘導されたために条件としては不適切と考えられた。注入後 14 日に見られる肥大軟骨細胞は骨化の前段階に出現することが広く知られている。よって半月板再生に用いる軟骨化腱を骨化させないために rhBMP 注入後 10 日の軟骨化腱を半月板の代替物として用いて半月板再建術を行った。再建術後 1、2ヶ月でのレントゲンで再建半月板内に高率に骨化が見られた。



半月板内に骨化あり

組織では主に関節包側に骨化が見られた。このことから関節外で軟骨化腱を誘導し、それを移植材料として半月板再建とする 2 期的手術では骨化まで誘導されることがわかった。よって低酸素環境下である関節内で BMP を作用させる 1 期的手術を計画し、実施している。

半腱様筋腱に rhBMP を注入し、関節外で軟骨化腱を誘導し、それを移植材料として半月板再建とする 2 期的手術を行ったが、骨化まで誘導される結果となった。これは BMP の作用が骨化誘導であり、一度スイッチが入ってしまうと骨化まで誘導される可能性があった。しかしながら低酸素下においては BMP が軟骨誘導されるという過去の報告があることから、関節内という低酸素環境で BMP を作用させることによって、骨化誘導されることなく軟骨で留まる可能性があった。また臨床の現場では半月板再建術は 1 期的に行うことから移植腱に直接 BMP を注入する 1 期的再建術のほうが理想的である。今後 1 期的再建術での検討を行う予定である。

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 8 件)

- ① Hoshi M, Takami M, Ieguchi M.
Pleomorphic malignant fibrous histiocytoma:
response of bone, lung, and brain metastases to
chemotherapy.
Radiat Med. 2008 Oct;26(8):499-503. 査読有
- ② Hoshi M, Ieguchi M, Takami M, Aono M,
Taguchi S, Kuroda T, Takaoka K. Clinical
Problems After Initial Unplanned Resection of
Sarcoma. Jpn J Clin Oncol 2008;38:701-709.
査読有
- ③ Hoshi M, Takami M, Kajikawa M, Teramura
K, Okamoto T, Yanagida I, Matsumura A. A
case of multiple skeletal lesions of brown
tumors, mimicking carcinoma metastases. Arch
Orthop Trauma Surg. 2008;128:149-54. 査読
有
- ④ Okamoto T, Yanagida I, Hoshi M,
Matsumura A, Namikawa T, Hashimoto
R, Noguchi K, Takami M. Clinical
management for spontaneous spinal epidural
hematoma: diagnosis and treatment. Spine J.
2008 ; 8: 534-537. 査読有
- ⑤ Izawa N, Matsumoto S, Manabe J, Tanizawa
T, Hoshi M, Shigemitsu T, Machinami R,
Kanda H, Takeuchi K, Miki Y, Arai M,
Shirahama S, Kawaguchi N. A Japanese patient
with Li-Fraumeni syndrome who had nine
primary malignancies associated with a
germline mutation of the p53 tumor-suppressor
gene. Int J Clin Oncol. 2008 ;13:78-82. 査読有
- ⑥ Hoshi M, Ieguchi M, Taguchi S, Sasaki K,
Inoue K, K Wakasa, K Takaoka. Liposarcoma
with radiologically biphasic patterns
Eur J Orthop Surg Traumatol 2008; 18:
409-413. 査読有
- ⑦ Hoshi M, Takami M, Hashimoto R,
Okamoto T, Yanagida I, Matsumura A,
Noguchi K. Spontaneous regression of
osteochondromas.
Skeletal Radiol. 2007 ;36:531-534. 査読有
- ⑧ Hashimoto Y, Yoshida G, Toyoda H,
Takaoka K. Generation of tendon-to-bone
interface "entheses" with use of recombinant
BMP-2 in a rabbit model. J Orthop Res.
2007 ;25:1415-24
査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① Naka Y; Hashimoto Y; Takaoka K
Meniscus reconstruction by a tendon
autograft with recombinant human bone
morphogenetic protein-2 in a rabbit
model the 55th ORS 2009.2.22 Las Vegas,
USA
- ② 仲哲史, 橋本祐介, 高岡邦夫 rhBMP
を用いた自家腱移植による半月板再建術の
試み 第 27 回日本運動器移植再生医学研
究会 2008.9.27 岐阜
- ③ 仲哲史, 橋本祐介, 高岡邦夫 rhBMP
を用いた自家腱移植による半月板再建術
第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会
2008.10.23 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星 学 (Hoshi Manabu)

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院
講師

研究者番号：50445037

(2) 分担研究者

なし

(3) 研究協力者

橋本 祐介 (Hashimoto Yusuke)

大阪市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：70243243