

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591747

研究課題名（和文） 細胞シート工学を応用した前十字靭帯損傷の修復、再生に関する研究

研究課題名（英文） Experimental study for anterior cruciate ligament using cell sheet technology

研究代表者

三谷 玄弥 (MITANI GENYA)

東海大学 医学部 講師

研究者番号：80307280

研究成果の概要（和文）：前十字靭帯（以下 ACL）由来積層可細胞シートの作成、および吸収糸メッシュとの組み合わせによる立体的再生 ACL の作成に成功した。また、免疫組織学的検査、real time PCR の結果より Tenomodulin(以下 TnmD)が、ACL において特異的のマーカーとして使用されうること、また ACL 細胞シートが ACL としての phenotype を維持していることを確認した。また膝関節内の滑膜組織にも TnmD が発現していることから ACL 再生における cell source となりえることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Triple-layered ACL cell sheets and SCL-derived cell sheets were fabricated successfully without enzymatic digestion. Furthermore, 3-dimensional bioengineered ACL was fabricated by a combination of triple-layered ACL cell sheets and bioabsorbable mesh composite. Immunohistochemical examination and real-time PCR revealed that TnmD is a specific marker of the human ACL, and ACL sheets have a similar phenotype to the ACL. The superior expression of TnmD in synovial tissues, and synovium-derived cell sheets indicates that synovium is a potential cell source for ACL regeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：ACL、細胞シート、再生医療、前十字靭帯、Tenomodulin

## 1. 研究開始当初の背景

前十字靭帯（以下 ACL）損傷はスポーツ膝傷害のなかでも頻度が高く、米国では年間10万件の受傷が見積もられている。ACLはジャンプの着地や急な方向転換など、他の選手と接触しない減速動作により容易に

損傷する。したがって、そのような減速動作を繰り返すスポーツ ACL 損傷を放置してスポーツ活動を継続すると脛骨の前方亜脱臼による機能不全がスポーツ活動制限要素となる。ACL 損傷膝を放置するとスポー

ツ中の膝くずれ現象を繰り返すことにより機能不全はさらに悪化する。同時に膝関節の内側と外側に存在する線維性構造である半月板の損傷が続発または悪化し、関節面の損傷も加わって、関節機能低下の悪循環をきたし、最終的に膝関節の外傷性膝関節症に至る。通常、治療には自家半腱様筋腱や膝蓋腱を用いた ACL 再建手術が行われるが、技術の進歩した現在でもドナーサイトの疼痛、筋力低下、再々建時のドナー選択など解決すべき問題も多い。よってドナー採取を要しない再生医療の ACL 不全膝治療への応用が望まれる。しかし腱、靭帯の組織は細胞成分が乏しく再生が難しいこと、腱、靭帯細胞を特異的に同定する手法が一般的でないため癒痕組織との種別が困難なこと、などからこの分野の再生に対する研究は同じ整形外科領域の軟骨再生医療に比べ、未発達であった。

しかし 2006 年宿南らによって腱、靭帯固有に発現する糖タンパク Tenomodulin (TnmD) の存在が報告された。これにより従来困難であった健全靭帯、組織工学的靭帯、と癒痕組織の判別が可能となる可能性が考えられた。

アップセル TM は 1993 年 Okano らにより報告された特殊な培養皿であり、熱応答性ポリマーであるポリ N-イソプロピルアクリルアミド(PIPAAm)がナノインターフェース技術で表面に構築されている。通常培養皿上で培養された細胞は回収する際に何らかの酵素的処理が必要となるがアップセル TM 上で培養された細胞は培養温度から 20℃へ温度を下げるのみで細胞シートとして回収できる。これを用いた細胞シート工学は角膜、肝、心筋、食道などの分野で広く研究されており、中でも角膜においては既に臨床応用されている。

現在までに我々はこの細胞シート工学を用いて日本白色家兔、及びヒト軟骨、滑膜の細胞シートを作成することに成功し、臨床応用に向けたその基礎的研究を行っている。よってこの技術を応用した ACL 再生の研究を行う着想に至った。

## 2. 研究の目的

ACL 不全膝における細胞シート工学を応用した治療の可能性を検討するため ACL 細胞シート作製し、その有用性と問題点を把握することである。

## 3. 研究の方法

膝 ACL 再建術の際に郭清した遺残 ACL、及び人工膝関節置換術の際切除される健全 ACL を、患者本人の承諾を得て、本研究に使用する。それぞれの組織を免疫組織化学的に、遺伝子的に評価する。単離した ACL 由来細胞、滑膜組織を培養し、十分な細胞数が得られた時点で温度応答性培養皿に播種する。コンフルエントに達した時点で 20 度以下に温度を下げ、シート状に回収し、積層化する。

細胞シートが脆弱で剥がすことが困難であった場合、フィブリン糊にてコーティングし、把持を容易にする。

健全 ACL 線維、損傷された遺残 ACL、及び作成した ACL 細胞シートを TnmD の抗体 Anti-TnmD antibody で免疫染色を行い、遺残 ACL と ACL 細胞シートのヒト ACL 細胞としての形質維持の有無について検討する。

また損傷部位を取り除き酵素的に単離した遺残 ACL 由来細胞、および脂肪性滑膜、靭帯性滑膜、皮下脂肪組織は摘出後、Real time PCR 及びモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的に TnmD の発現について検討し、腱、靭帯への特異性を当研究機関でも確認をする。

ブタ ACL 部分損傷モデルにヒト ACL 損傷モデルに貼付し器官培養を行い、接着性、損傷被覆部の状態をコントロールと比較し評価する。また現在吸収糸として広く臨床に使用されているバイクリルメッシュを細胞シートの補強剤として用い靭帯様に整形し培養を継続し、その再生組織の性状を観察する。

また靭帯の生理的環境であるメカニカルストレスが再生組織の性状、強度などに与える影響について検討する。

## 4. 研究成果

酵素的処理を要することなく温度応答性培養皿から温度変化のみで前十字靭帯（以下ACL）由来細胞シートの作成に成功した。（図1）

また上から重ねることでシート自体が有する接着性を利用し積層可細胞シートの作成にも成功した。他の組織と比べ脆弱性のあるACL細胞シートは cell shifter を用いることで回収する確率を上げることが出来た。また積層化 ACL 細胞シートと吸収糸メッシュとの組み合わせによる立体的再生 ACL の作成に成功した。（図2）

免疫組織学的検査にて、健全ACLに TnmD が発現していること、遺残 ACL の断端部はその発現が少ないことから TnmD の発現が ACL の靭帯としての phenotype 維持に関わっている可能性が示唆された。また作成された ACL 細胞シートが良好に TnmD を発現していることから、ACL 固有の phenotype を維持していることが示唆された。

また、免疫組織学的検査（図3）、および real time PCR（図4）の結果より膝関節内の脂肪性滑膜(SIF)、靭帯性滑膜（SCL）にも TnmD が発現していること(negative controlの皮下脂肪には発現なし)、靭帯周囲滑膜由来細胞シートの作成に成功したことから ACL 再生における cell source となりえることが示唆された。

図1 ACL細胞シートの作成

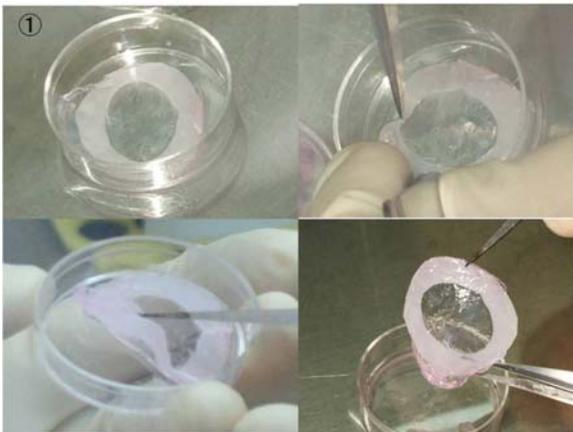


図2 作成された組織工学的ACL



図3 膝関節周囲組織の TnmD 発現  
ACL SCL

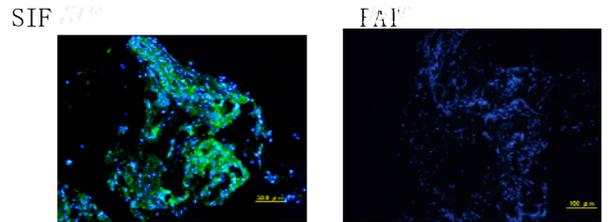
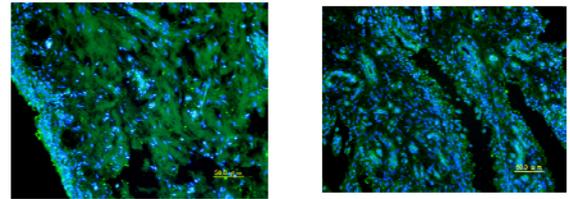
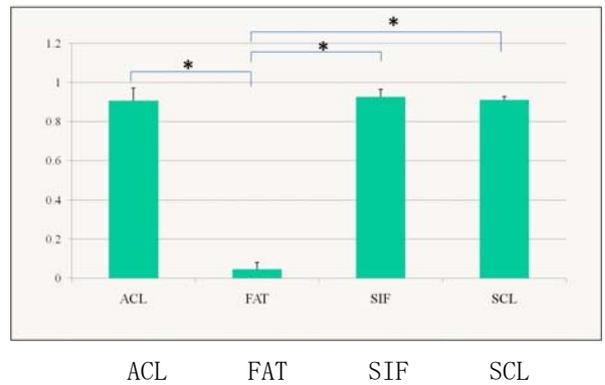


図4 Real time PCR



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1件)

①The properties of bioengineered chondrocyte sheets for cartilage regeneration BMC biotechnology 2009  
Genya Mitani, Masato Sato\*, Jeong IK Lee1, Nagatoshi Kaneshiro, Miya Ishihara, Naoshi Ota, Mami Kokubo, Hideaki Sakai, Tetsutaro Kikuchi and Joji Mochida

~~1件投稿中(ECM journal)~~

~~Experimental study on anterior cruciate ligament regeneration by cell sheet technology based on tenomodulin expression~~

[学会発表] (計4件)

- ①三谷 玄弥 平成23年3月  
第10回 日本再生医療学会総会  
ヒト膝関節内組織における Tenomodulin、Scleraxis の発現状況
- ②三谷 玄弥 平成22年10月  
第25回日本整形外科学会基礎学術集会
- ③三谷 玄弥 平成22年7月2nd JOSKAS  
ヒト膝関節内組織における Tenomodulin、Scleraxis の発現状況
- ④ヒト前十字靭帯細胞シート、滑膜組織における Tenomodulin の発現状況  
三谷 玄弥 平成21年10月  
第23回日本整形外科学会基礎学術集会  
再生医療に向けた前十字靭帯、滑膜由来細胞シートの検討

[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 三谷 玄弥(MITANI GENYA)  
東海大学・医学部・講師  
研究者番号：80307280

(2)研究分担者  
佐藤 正人(SATOU MASATO)  
東海大学・医学部・准教授  
研究者番号：10056335

査名 寿治(KUTUNA TOSHIHARU)

研究者番号：90328120

東海大学・医学部・講師

(3)連携研究者 なし  
( )

研究者番号：

