

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591656

研究課題名（和文） 幹細胞動員因子を用いた関節軟骨靭帯再生
— 幹細胞を基盤とした再生医療 —

研究課題名（英文） Regenerative medicine for cartilage, bone and ligament using growth factors mobilizing stem cell

研究代表者

黒田 良祐 (KURODA RYOSUKE)

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80379362

研究成果の概要（和文）：幹細胞や万能細胞の開発とともに主要臓器の再生の試みが盛んにおこなわれている。骨、関節軟骨、靭帯再生においては幹細胞からの細胞の動員、分化、血行の再開、血管新生が重要な役割を果たす。我々は顆粒球コロニー刺激因子 Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) という幹細胞動員因子が運動器（関節、軟骨、靭帯）の損傷時に発現すること、これによって幹細胞が動員され組織が修復されること、またこの因子を局所投与することで組織の修復、再生が促進されることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：It has been reported that stem cell and multi-potent cells such as iPS cells, ES cells contribute to tissue regeneration. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) has important role recruiting stem cells. Stem cells contribute to fix injury of locomotorium (bone, joint, cartilage, ligament etc.). We found that there were abundant vascular stem cells in injury site and G-CSF was one of the key factors to regenerate bone, cartilage and ligament.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：7305

キーワード：幹細胞・再生医療・運動器・顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)

1. 研究開始当初の背景

幹細胞や万能細胞の開発とともに主要臓器の再生の試みが盛んにおこなわれている。しかし人の生命に直接かわらない運動器の再生は遅々として進んでいない。骨・軟骨・靭帯の損傷は高頻度に起こる運動器の外傷であるが、外傷前の状態までの完全な治癒に至らぬ

事や、機能の回復に時間を要することが問題である。その治癒、再生においては幹細胞からの細胞の動員、分化、血行の再開、血管新生が重要な役割を果たす。ヒト末梢血-血管内皮前駆細胞の増殖・誘導に不可欠な要素として幹細胞動員因子・造血因子である顆粒球コロニー刺激因子 Granulocyte

colony-stimulating factor (G-CSF) がある。G-CSF は造血因子剤として、化学療法後や白血病の白血球の減少に対し日々の診療で広く使用されている。1997 年にG-CSF の血管新生への関与が報告され、また血管内皮細胞の細胞死を抑制し血管新生を促すことも報告された。さらに近年、各組織の幹細胞にこのG-CSF 受容体が存在することが明らかとなり、造血のみならず未分化幹細胞誘導因子や幹細胞動員因子として注目されている。そこで、

“G-CSF は造血細胞の増生や幹細胞の動員を通じて運動器組織の治癒を促進する” という仮説を前臨床試験的に立証すべく実験をおこなう。本研究の目的は、損傷した骨・軟骨・靭帯へのG-CSF 局所移植が損傷部位に与える影響を確認し、その作用である造血細胞の生着、幹細胞の分化などのメカニズムを解明すること、そしてさらには早期に機能的運動器の再生を目指すことである。

2. 研究の目的

幹細胞動員因子・造血因子である顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)) はヒト末梢血-血管内皮前駆細胞の増殖・誘導に不可欠な要素として認識されている。しかし運動器の再生にはいまだ臨床応用されていない。本研究の目的は幹細胞を基盤とした再生医療応用の視点から、幹細胞動員因子を用いた運動器 (骨・軟骨・靭帯) 再生の有用性を検討することである。

3. 研究の方法

- 1) ウサギの尺骨の骨欠損モデルを用いてG-CSFの骨再生促進への関与を検討した。
- 2) ラットの膝内側側副靭帯に1mmのギャップを作成し、人工的に膝関節内側側副靭帯損傷モデルを作成する。損傷部に顆粒球コロニー刺激因子を徐放させ、靭帯の治癒過程を観察した。
- 3) 膝前十字靭帯損傷モデルを用い、損傷部軟部組織の細胞解析を行った。

4. 研究成果

1) ウサギの尺骨の骨欠損モデルを用いてG-CSF が血管新生を介して骨再生促進にかかわることを確認し、またG-CSF によって循環する幹細胞が骨の修復再生に動員されたことを証明した。さらにG-CSF を投与した生体内の末梢血未分化細胞・循環幹細胞においてG-CSF receptor の発現が増加しており、また骨修復がおこっている局所においてもG-CSF receptor の有意な発現増加を確認した。また骨再生過程においてG-CSF receptor が

有意に増加することを確認した。

2) 免疫不全ラットの膝関節内側側副靭帯に1mmのギャップを作り、人工的に膝関節内側側副靭帯損傷モデルを作成し、靭帯損傷部にG-CSF を局所移植することにより、靭帯治癒促進が得られ、早期に機能的靭帯強度を獲得したことを証明した。

図1. 肉眼的所見：移植後2週、4週で損傷した靭帯を観察した。コントロール群では靭帯の治癒があまり認めないのに比較し、G-CSF を局所移植した群ではすると靭帯の治癒が肉眼的にも確認できた。

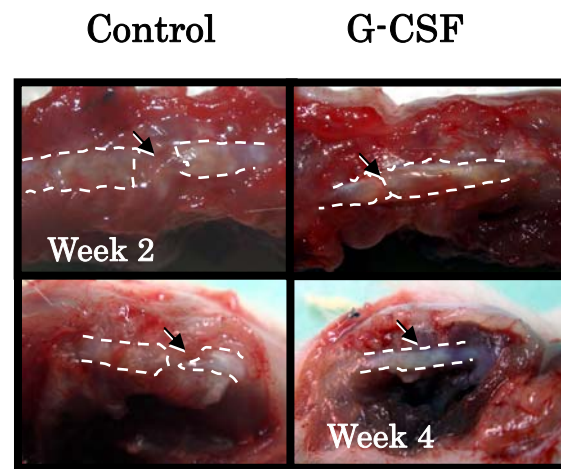


図2. それぞれN=6で靭帯の治癒率をみると4週でコントロール群では50%にしか治癒を認めないが、G-CSF 移植群では100%治癒していた

	Control	G-CSF
Week 2	16% (1/6)	33% (2/6)
Week 4	50% (3/6)	100% (6/6)

図3. 靭帯の成熟の指標となる Tenomodulin はG-CSF 移植群で優位に上昇した。

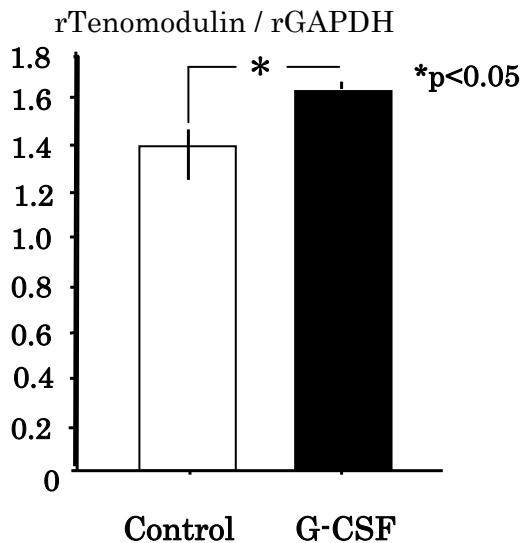
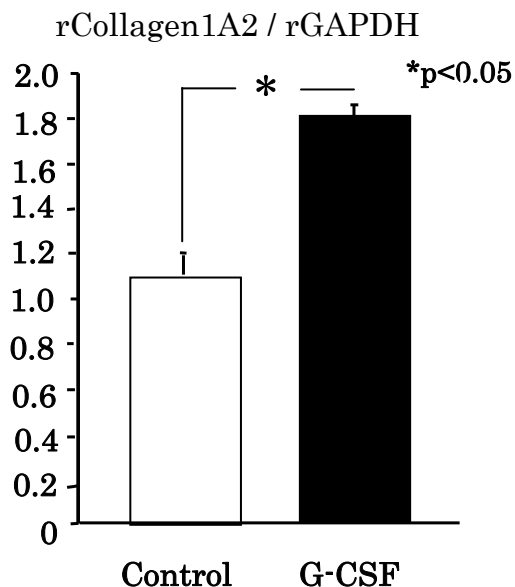


図4. 靱帯の成熟の指標となる Collagen1A2 も同様に G-CSF 移植群で優位に上昇し、G-CSF 投与群で靱帯の治癒・再生による成熟が示された。



3) 膝前十字靱帯損傷モデルを作成して実験を行なった。靱帯損傷部分には出血、急性炎症が起こっており、同時に様々な細胞が呼び込まれていることがわかった。その中に比較的高頻度で、高い増殖能、多能性を持つ幹細胞様の細胞が局在していることを確認した。さらにこの細胞群は G-CSF によって動員が可能な CD34 陽性細胞を多く含むことが明らかとなった。

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 5 件)

- ① 末梢血 CD34 陽性細胞移植による難治性骨折治療. 松本知之、新倉隆宏、黒田良祐 *Pharma Medica*: 査読無, 31(4):9-13:2013
- ② Acceleration of tendon-bone healing of anterior cruciate ligament graft using autologous ruptured tissue. Matsumoto T, Kubo S, Sasaki K, Kawakami Y, Oka S, Sasaki H, Takayama K, Tei K, Matsushita T, Mifune Y, Kurosaka M, Kuroda R. *Am J Sports Med*. 査読有, 2012 Jun;40(6):1296-302. doi: 10.1177/0363546512439026.
- ③ Local transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized human peripheral blood mononuclear cells for unhealing bone fractures. Fukui T, Matsumoto T, Mifune Y, Shoji T, Kuroda T, Kawakami Y, Kawamoto A, Ii M, Kawamata S, Kurosaka M, Asahara T, Kuroda R. *Cell Transplant*. 査読有 2012;21(4):707-21. doi: 10.3727/096368911X582769.
- ④ Local transplantation of G-CSF-mobilized CD34(+) cells in a patient with tibial nonunion: a case report. Kuroda R, Matsumoto T, Miwa M, Kawamoto A, Mifune Y, Fukui T, Kawakami Y, Niikura T, Lee SY, Oe K, Shoji T, Kuroda T, Horii M, Yokoyama A, Ono T, Koibuchi Y, Kawamata S, Fukushima M, Kurosaka M, Asahara T. *Cell Transplant*. 査読有 2011;20(9):1491-6. doi: 10.3727/096368910X550189
- ⑤ Bone regeneration properties of granulocyte colony-stimulating factor via neovascularization and osteogenesis. Ishida K, Matsumoto T, Sasaki K, Mifune Y, Tei K, Kubo S, Matsushita T, Takayama K, Akisue T, Tabata Y, Kurosaka M, Kuroda R. *Tissue Eng Part A*. 査読有, 2010 Oct;16(10):3271-84. doi: 10.1089/ten.tea.2009.0268.

[学会発表] (計 5 件)

- ① Ryosuke Kuroda, Local transplantation of G-CSF-mobilized CD34+ cells in Patients with non-union. The 16th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference (February 28, 2013) Bethesda, USA.

神戸大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50546588

- ② 黒田良祐、新倉隆宏、松本知之、李相亮、美舩泰、古賀敬章、川上洋平、黒坂昌弘
自家末梢血 CD34 陽性細胞による難治性骨折の治療. 第 31 回日本運動器移植・再生医学研究会 (2012 年 9 月 29 日) 弘前.
- ③ 黒田良祐、松本知之、岡真也、松崎時夫、松下雄彦、黒坂昌弘、ゼラチンハイドロゲルを用いた運動器再生の基礎研究. 第 118 回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会 (2012 年 4 月 7 日) 大阪.
- ④ 松本知之、新倉隆宏、福井友章、美舩泰、川上洋平、三輪雅彦、李相亮、大江啓介、川本篤彦、黒坂昌弘、浅原孝之、黒田良祐、末梢血細胞を用いた骨・血管再生療法による偽関節治. 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2011 年 10 月 21 日) 前橋.
- ⑤ 松本知之、久保晴司、佐々木謙、川上洋平、佐々木宏、高山孝治、岡真也、鄭克真、美舩泰、松下雄彦、黒坂昌弘、黒田良祐、膝前十字靭帯再建術における損傷部靭帯組織併用療法の可能性. 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2011 年 10 月 21 日) 前橋.

〔図書〕 (計 1 件)

- ① 整形外科のための DDS 技術. 黒田良祐、福井友章、石田一成、佐々木謙、田畑泰彦 Drag Delivery System:27 (4);283-8:2012

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 良祐 (KURODA RYOSUKE)
神戸大学・医学研究科・准教授
研究者番号：80379362

(2) 研究分担者

黒坂 昌弘 (KUROSAKA MASAHIRO)
神戸大学・医学研究科・教授
研究者番号：70170115

久保 晴司 (KUBO SEIJI)
神戸大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30452494
(平成 24 年 10 月 1 日 退職により研究分担者より外れる)

松下 雄彦 (MATSUSHITA TAKEHIKO)
神戸大学・医学部附属病院・特定助教
研究者番号：40467650

松本 知之 (MATSUMOTO TOMIYUKI)

