

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592210

研究課題名(和文) 骨髄由来未分化間葉系細胞を用いた肩腱板断裂の非侵襲的治療の試み

研究課題名(英文) Non-invasive treatment of rotator cuff tear by using mesenchymal stem cells

研究代表者

松末 吉隆 (MATSUSUE, Yoshitaka)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：30209548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：サル腱板組織に4mmと8mmの断裂モデルを作成し、断裂サイズによる修復過程の違いについて組織学的に検討した。ともに断裂後早期では炎症性肉芽組織の活発な増殖を腱板断裂部に認めた。その後、4mmモデルで断裂部を架橋する線維が多数認められたが、8mmモデルでは断裂部は開大した。最終的に4mmモデルでは断裂部は修復されていたが、8mmモデルでは再断裂した。

8mmモデルに骨髄との交通を確立することで骨髄由来MSCが腱板修復に参加できるようにすると、効率的に腱板が修復されていた。さらに、脂肪・骨・軟骨の各細胞の分化することが確認された骨髄由来MSCを8mmモデルに注入したところ腱板の修復が促進されていた。

研究成果の概要(英文)：Four-mm and 8-mm width defects were created to the shoulder of cynomolgus monkeys to investigate critical size for spontaneous healing. Transosseous passageways were also created in adjacent to the 4-mm and 8-mm defects. Four-mm defects spontaneously healed, whereas the 8-mm defects did not. The present study demonstrated that creation of the transosseous passageway reversed the recurrence of 8-mm defects.

Bone marrow-derived MSCs were isolated. Eight-mm defects were created at the tendon insertion of the rotator cuff and were either left untreated (Null group) or injected with MSC (MSC group). The Null group showed most cartilage-rich reparative tissue covering the defect, owing to formation of excessive tendon extruding through the insufficient subchondral bone. Despite less amount of new reparative tissue produced, the MSC group demonstrated better quality of tendon repair with regular surface and reconstruction of trabecular subchondral bone.

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：腱板 修復 骨髄間葉系細胞 サル

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 肩関節は肩甲骨と上腕骨が構成しており、肩甲骨と上腕骨の間隙には関節腔が形成されている。関節の上方では肩甲骨と上腕骨は「腱板」という腱組織とその筋肉がつないでいる。更にその上方には肩峰という骨があり、腱板は肩峰と上腕骨の間隙を通過している。腱板はいわば「狭い通路」をすり抜けるように存在している。この「狭い通路」がすこしでも通りやすいように滑液という粘張・低摩擦性の液を蓄えた滑液包が腱板と肩峰の間に存在している。

(2) 関節軟骨と同様に加齢に伴う変化として滑液包による摩擦軽減の機能は低下し、腱板は退行性変化を免れることはできない。本研究の対象である「腱板断裂」は、外傷でも起こり得るが退行性変化を基礎に非外傷的に断裂してしまうことが圧倒的に多く、この為、他の運動器障害と同様に人口の高齢化に伴い、その罹患率も増加傾向にある。症状は疼痛と運動制限であるが、疼痛は多くの場合、特徴的な夜間痛となり睡眠障害の為に精神的にも衰弱すると言われている。疼痛に関しても、運動制限にしてもその最大の問題は、その症状が腱の断裂に起因している為に「自然回復」せず、持続することにある。

## 2. 研究の目的

腱板断裂の治療法については、100年以上前から種々の治療方法が試みられてきた。当初は断裂部位を外科的に展開し、一時的に縫合するという方法が試みられてきた。縫合方法について種々の方法が報告されてきたが、どの一次縫合の方法をもってしても、断裂腱板が治癒することはなかった。時代を経た近年の研究では、一次縫合で修復されない理由が明らかにされた。(i) 腱板の断裂部近傍では、非断裂部と比べて生存している細胞数が有意に少ない為に、組織修復に参加できる細胞数が不足している、(ii) 腱板の断裂部では血管の分布も有意に減少している為に、組織修復

に参加できる細胞を血流経路で動員することができない、などの事実が明らかにされている。すなわち、一次的縫合により物理的に縫合することはできても、生物学的に断裂腱板を修復する細胞が絶対的に不足していることが、当時の治療方法では修復不能であった理由とされている。

1940年代に断裂腱板の手術的治療方法について画期的な報告がなされた。それまでのように断裂部を一次的に縫合するのではなく、断端の遠位部は取り去った上で、腱板附着部に骨孔を作成し、この骨孔を通した縫合糸で腱板断端近位部を締結する、という方法である。McLaign法と呼ばれるこの方法は、その後腱板修復術のgolden standardとなり、今世紀に至っても踏襲されている。しかし、なぜMcLaign法だけが、断裂腱板の治療に成功したのか、についてはあまり検討されていない。我々はその縫合方法よりも骨髄に開けられた骨孔に注目した。

本研究では断裂腱板の修復に参加する細胞の起源として、骨髄由来の未分化間葉系細胞(MSC)に注目し、より効率的な腱板修復方法の開発を目的として研究を遂行した。

## 3. 研究の方法

(1) サルを実験動物に用いて種々のサイズの腱板断裂を作成し、自然修復が起こらない最小断裂モデルを作成する。すなわち、腱板損傷においても、小さな断裂は肩峰下滑液包由来のMSCによって修復されるのではないかと、この仮説に基づき、サル腱板組織に4mmと8mmの断裂モデルを作成し、断裂サイズによる修復過程の違いについて組織学的に検討した。

(2) この最小断裂モデルに腱板断裂部に骨孔を作成し、骨髄と断裂部の交通を可能にらしめ、断裂腱板の修復が起こるかどうかを評価する。すなわち、自然修復しない腱板断裂のcritical sizeモデルに骨孔作成し、骨髄との交通を確立することで骨髄由来MSCが腱板修復に参加できるようにした実験群とsham手術したコントロール群を作成し、その

修復過程を組織学的に評価した。

(3) 「自然修復しない critical size の腱板断裂モデルでは、骨髄由来 MSC が断裂腱板を修復する」との我々の仮説が正しいならば、骨孔を開けるという侵襲的操作を加えなくても、必要分の MSC を局所に提供することにより修復されるはずである。すなわち、あらかじめ、骨髄穿刺により骨髄液を採取する。骨髄由来 MSC に特異的細胞表面マーカーに対するフローサイトメトリーによって骨髄由来 MSC を精製した。自然修復しない critical size の腱板断裂モデルである 8mm モデルに種々の濃度の骨髄由来 MSC 準備液を注射注入した。その後、経時的に組織を採取し、組織学的に断裂腱板の修復過程を評価した。

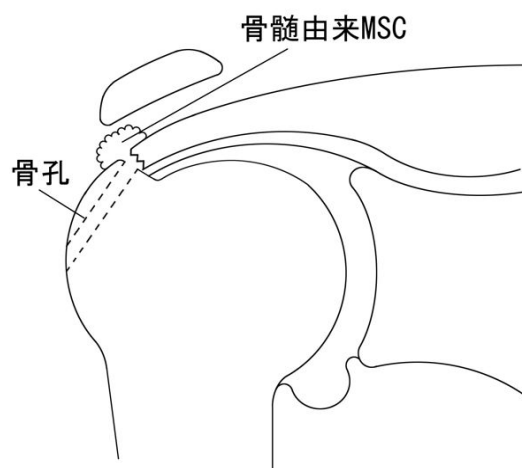
組織学的評価は I 型、III 型コラーゲンの免疫染色、弾性線維染色、BrdU 染色、トルイジンブルー染色で組織学的に断裂腱板の修復過程を評価した。また、腱修復過程で骨髄由来 MSC はアポトーシスを経て、減少していくことが予想される。Die I により生体染色された骨髄由来 MSC が注入後、どれくらいの期間、局所に存在しているのかを検討した。

#### 4. 研究成果

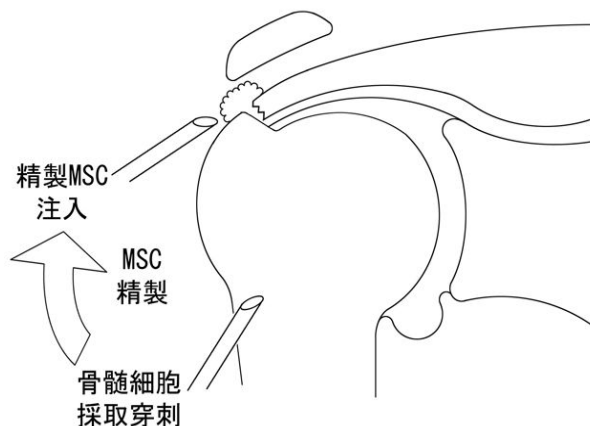
(1) サル腱板組織に 4mm と 8mm の断裂モデルを作成し、断裂サイズによる修復過程の違いについて組織学的に検討した。4mm モデル、8mm モデルともに 3 週目では、炎症性肉芽組織の活発な増殖を腱板断裂部に認めた。6 週目になると肉芽は癒痕組織に置き換わっていたが、4mm モデルでは癒痕組織内を横走して断裂部を架橋する線維が多数認められたが、8mm モデルでは断裂部は開大し、これを架橋する線維はほとんどみられなかった。12 週目になると、4mm モデルでは癒痕組織による断裂腱板の修復がみられたが、8mm モデルでは先細った、線維走行の一定しない不良癒痕が介在していた。24 週目になると 4mm モデルでは架橋癒痕のリモデリングが進み、断裂部は修復されていた。8mm モデルでは、再断

裂した。この結果を踏まえて、自然修復しない腱板断裂の critical size は 8mm モデルとした。

(2) これに骨孔作成し、骨髄との交通を確立することで骨髄由来 MSC が腱板修復に参加できるようにした実験群と sham 手術したコントロール群を作成し、その修復過程を組織学的に評価したところ、8mm モデルでも効率的に腱板が修復されていた。



(3) 骨髄由来 MSC に特異的細胞表面マーカーに対するフローサイトメトリーによって骨髄由来 MSC を精製した。MSC の多分化能を証明する為、脂肪・骨・軟骨の各細胞の分化することが確認された。自然修復しない critical size の腱板断裂モデルである 8mm モデルに種々の濃度の骨髄由来 MSC 準備液を注射注入したところ、濃度依存性に腱板の修復されていることがあきらかになった。



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9件)

Kumagai K, Kubo M, Imai S, Toyada F, Maeda T, Okumura N, Matsuura H, Matsusue Y. The COX-2 selective blocker etodolac inhibits TNF $\alpha$ -induced apoptosis in isolated rabbit articular chondrocytes. *Int J Mol Sci* 14:19705-19715, 2013. 査読有

Mori K, Kasahara T, Mimura T, Nishizawa K, Murakami Y, Matsusue Y. Prevalence, distribution, and morphology of thoracic ossification of the yellow ligament in Japanese: results of CT-based cross-sectional study. *Spine* 38:E1216-1222, 2013. 査読有

Mimura T, Kawasaki T, Yagi K, Mori K, Imai S, Matsusue Y. Pigmented villonodular synovitis causing osteonecrosis of the femoral head: a case report. *Case Rep Orthop* 2013:756954, 2013. 査読有

Kodama N, Imai S, Matsusue Y. A simple method for choosing treatment of distal radius fractures. *J Hand Surg Am* 38:1896-1905, 2013. 査読有

Kumagai K, Imai S, Toyoda F, Okumura N, Isoya E, Matsuura H, Matsusue Y. 17 $\beta$ -Estradiol inhibits doxorubicin-induced apoptosis via block of the volume-sensitive Cl<sup>-</sup> current in rabbit articular chondrocytes. *Br J Pharmacol* 166:702-720, 2012. 査読有

Mori K, Imai S, Shimizu J, Taga T, Ishida M, Matsusue Y. Spinal glioblastoma multiforme of the conus medullaris with holocordal spread in a child: a case report and review of the literature. *Spine J* 12:e1-6, 2012. 査読有

Takemura Y, Imai S, Kojima H, Katagi M, Yamakawa I, Kasahara T, Ueba H, Terashima T, Yasuda H, Chan L, Kimura H, Matsusue Y. Brain-derived neurotrophic factor from bone marrow-derived cells promotes post-injury repair of peripheral nerve. *PLoS One* 7:e44592, 2012. 査読有

Mimura T, Imai S, Okumura N, Li L, Nishizawa K, Araki S, Ueba H, Kubo M, Mori K, Matsusue Y.

Spatiotemporal control of proliferation and differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells recruited using collagen hydrogel for repair of articular cartilage defects. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 98B:360-368, 2011. 査読有

Mori K, Imai S, Saruhashi Y, Matsusue Y. Thoracoscopic en bloc extirpation for subperiosteal osteoid osteoma of thoracic vertebral body: a rare variety and its therapeutic consideration. *Spine J* 11:e13-18, 2011. 査読有

[学会発表](計20件)

尾田和広、森幹士、今井晋二、上中一泰、松末吉隆. ウサギ軟骨細胞より作製した scaffold-free construct による関節軟骨修復における骨髄由来細胞の影響. 第26回日本軟骨代謝学会. 2013.3.1~2, 豊中市

松末吉隆. 関節軟骨修復術の進歩. 第15回名整会セミナー. 2013.4.25, 名古屋市

松末吉隆. 自家軟骨柱移植術の応用と課題. 第86回日本整形外科学会学術総会. 2013.5.23~26, 広島市

熊谷康佑、今井晋二、豊田太、奥村法昭、磯矢英士、松浦博、松末吉隆. ウサギ関節軟骨細胞のアポトーシス誘導における容積感受性 Cl<sup>-</sup>電流の関与とエストロゲンの役割. 第86回日本整形外科学会学術総会. 2013.5.23~26, 広島市

竹村宜記、今井晋二、小島秀人、笠原俊幸、児玉成人、櫻美和子、山川勇、寺島智也、木村博、松末吉隆. 骨髄細胞由来 BDNF の末梢神経再生における重要性. 第86回日本整形外科学会学術総会. 2013.5.23~26, 広島市

Matsusue Y, Kubo M, Uenaka K. Autogenous osteochondral graft transplantation for osteonecrosis of the knee; a novel method of eyeglass-plasty. 2013.9.15~18, Izmir, Turkey

Araki S, Imai S, Kubo M, Mimura T, Nishizawa K, Ueba H, Kumagai K, Matsusue Y. Evaluation of repair cartilage by bone marrow-derived mesenchymal stem cells for osteochondral defect in a non-human primate. 2013.9.15~18, Izmir, Turkey

熊谷康佑、今井晋二、久保充彦、前田勉、豊田太、松浦博、松末吉隆. ウサギ関節軟

骨細胞においてCOX-2選択的阻害剤はTNF-誘導性アポトーシスを抑制する. 第28回日本整形外科学会基礎学術集会. 2013.10.17~18, 千葉市

松末吉隆. 軟骨損傷に対する鏡視下手術. 第4回JOSKASセミナー. 2012.7.21, 宜野湾市

松末吉隆. 膝関節外科の進歩と課題. 第45回中国四国整形外科学会. 2012.11.10, 倉敷市

松末吉隆. MIOSに役立つ機能解剖3-「膝関節鏡」. 第18回日本最小侵襲整形外科学会. 2012.11.16~17, 奈良市

Matsusue Y, Kubo M, Uenaka K, Nakagawa Y. Joint preservation for osteonecrosis of the knee by autogenous osteochondral graft transplantation. A new technique of eyeglass-plasty. 第11回日仏整形外科合同会議. 2011.6.2~4, ボルドー

松末吉隆. 関節軟骨損傷に対する治療: 骨軟骨柱移植 vs Microfracture. 第3回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会. 2011.6.16~18, 札幌市

松末吉隆. 骨軟骨移植術のコツとピットフォール. 第3回JOSKASセミナー. 2011.6.18, 札幌市

Ueba H, Imai S, Araki S, Ishigaki H, Nishizawa K, Mimura T, Ogasawara K, Matsusue Y. Spontaneous healing of fibrocartilage at the insertion of rotator cuff and its enhancement by transosseous passageway in animal model of cynomolgus monkey. OARSI World Congress on Osteoarthritis. 2011.9.15~18, San Diego, CA

Araki S, Imai S, Kubo M, Mimura T, Nishizawa K, Ueba H, Matsusue Y. Detailed evaluation of chondral defect repair and autologous bone marrow derived mesenchymal cells transplantation. A nonhuman primate model. OARSI World Congress on Osteoarthritis. 2011.9.15~18, San Diego, CA

上羽宏明、今井晋二、荒木勸、石垣宏仁、西澤和也、三村朋大、小笠原一誠、松末吉隆. カニクイザルを用いた腱板損傷モデル. 骨骨孔が与える影響. 第38回日本肩関節学会. 2011.10.7~8, 福岡市

荒木勸、今井晋二、久保充彦、三村朋大、

上羽宏明、西澤和也、松末吉隆. カニクイザルを用いた膝関節軟骨全層欠損の自己修復および骨髄間葉系細胞移植の検討. 第26回日本整形外科学会基礎学術集会. 2011.10.20~21, 前橋市

松末吉隆. 自家骨軟骨移植による関節機能再建について. 第17回日本最小侵襲整形外科学会. 2011.11.5~6, 前橋市

松末吉隆. 軟骨移植の進歩. 第23回中之島リウマチセミナー. 2011.12.18, 大阪市

〔図書〕(計1件)

松末吉隆 他. 永井書店. 軟骨移植の進歩: リウマチ病セミナーXX 243-253, 2012.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松末 吉隆 (MATSUSUE, Yoshitaka)  
滋賀医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 30209548

### (2) 研究分担者

今井 晋二 (IMAI, Shinji)  
滋賀医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 90283556